

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ТЮМЕНСКИЙ ИНДУСТРИАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

на правах рукописи

НИКИФОРОВ АРТУР СЕРГЕЕВИЧ

**БИОРЕМЕДИАЦИЯ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ЛУГОВЫХ ПОЧВ
ЮГА ТЮМЕНСКОЙ ОБЛАСТИ**

специальность 03.02.08 – экология (биология)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
доцент Ю.В.Сивков

Тюмень – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1. Характеристика и свойства нефтяных углеводородов.....	8
1.2. Пространственное распределение нефти в почве.....	11
1.3. Изменение свойств почвы при нефтеразливе	17
1.4. Методы восстановления нефтезагрязнённых почв	23
1.4.1. Технологии <i>ex situ</i>	24
1.4.2. Технологии <i>in situ</i>	33
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	50
2.1. Природно-климатическая характеристика района исследования.....	50
2.2. Характеристика почвы	51
2.3. Характеристика нефти.....	55
2.4. Программа лабораторных и полевых экспериментов.....	55
2.4.1. Схема лабораторного эксперимента	55
2.4.2. Схема полевого эксперимента.....	59
2.5. Методы исследований	61
2.5.1. Отбор проб и подготовка почвенных образцов	61
2.5.2. Методы оценки агрохимических и микробиологических показателей	61
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОПРЕПАРАТА	63
3.1. Обоснование выбора биопрепарата	63
3.2. Микробиологические исследования эффективности применения схем биоремедиации	66
3.3. Полевые исследования естественных процессов трансформации нефтезагрязнения в луговых почвах	72
3.4. Полевые исследования биodeградации нефтезагрязнения в луговых почвах в процессе биоремедиации	77
3.5. Исследование агрохимических показатели луговых почв в процессе биоремедиации	80

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ФИТОТОКСИЧНОСТИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ БИОРЕМЕДИАЦИОННЫХ МЕРОПРИЯТИЙ	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	105
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	107
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	136

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Почва является материальной основой устойчивого экономического и социального развития и одним из самых ценных природных ресурсов для нашей страны. На сегодняшний день вовлечены в сельскохозяйственный оборот и интенсивно используются все черноземы юга Тюменской области, поэтому возникла необходимость изыскания почв, наиболее близких к ним по плодородию с учетом региональных особенностей. К таким почвам относятся луговые почвы, площадь которых составляет около 1 млн. га юга Тюменской области, или 40 % от площади высокоплодородных почв (Ренев и др., 2017).

В то же время, на территории Тюменской области располагаются объекты нефтегазовой отрасли и разливы нефти в процессе разведки, разработки, сбора, переработки, хранения и сбыта нефтепродуктов, аварий, неправильной эксплуатации и технического обслуживания оборудования, которые могут вызвать серьёзные экологические проблемы для почвы, грунтовых вод и воздуха. Кроме того, природоохранные меры и системы оценки несовершенны, устаревшие технологии борьбы с загрязнением и восстановления нарушенных земель приводят к большому количеству серьезно загрязненных почв.

Деструкция нефти в окружающей среде – сложный многофакторный процесс, на который оказывают влияние состав, концентрация и срок действия загрязнителя, тип почвы, многообразие и изменчивость внешних факторов, под воздействием которых находится экосистема. Это объясняет появление большого количества разнообразных (иногда противоречивых) результатов при ремедиации почвы биологическими методами (Плешакова и др., 2008).

Биоремедиация считается неразрушающей, экономически эффективной технологией очистки, которая направлена на ускорение естественной биодеструкции загрязняющих веществ путем оптимизации ограничивающих условий. Успешное внедрение технологий

биоремедиации на загрязненных территориях зависит от характеристик загрязненного участка и сложной системы многих факторов, которые влияют на процессы биологического разложения углеводородов нефти. Основные факторы, которые ограничивают общую скорость биodeградации, могут быть сгруппированы как: характеристики почвы, характеристики загрязнителя, биодоступность загрязнителя и количество микроорганизмов (Орлов, Аммосова, 1994; Alexander, 1995; Пиковский, 1993; Гайворонский, Колесников, 2008; Гриднева, Куликова, 2009; Водянова и др., 2010). Чтобы принять и реализовать некоторую стратегию биоремедиации, чрезвычайно важно рассмотреть и понять эти ограничивающие факторы.

Потенциальная опасность, которую нефтяные углеводороды представляют для человека и окружающей среды, обуславливает актуальность исследования процессов их биodeградации и биотрансформации в загрязненной почве для разработки методов биоремедиации таких почв до уровней, обеспечивающих их безопасное использование в сельскохозяйственных и других целях.

Цель исследований – разработка способов повышения эффективности применения биопрепаратов для ремедиации нефтезагрязнённых луговых почв в условиях юга Тюменской области.

Задачи исследований:

- определить влияние применения различных компонентных составов для биоремедиации нефтезагрязненных луговых почв;
- оценить влияние мелиорантов на динамику численности углеводородокисляющей микрофлоры нефтезагрязненных почв;
- провести анализ изменения агрохимических свойств луговых почв в процессе микробной биоремедиации;
- выявить методом биотестирования уровень токсического воздействия применяемых схем биоремедиации на растения.

Научная новизна. Впервые в условиях северной лесостепной

подзоны юга Тюменской области изучены способы повышения эффективности микробной биоремедиации нефтезагрязнённых луговых почв. Установлено, что применение биопрепаратов в сочетании с гуматами и сорбентом способствует интенсификации микробной биodeградации нефтезагрязнения почвы за счёт активного роста углеводородоокисляющих микроорганизмов. Предлагаемые в работе методы биостимуляции углеводородоокисляющей микрофлоры способствуют улучшению агрохимических свойств и снижению остаточного содержания нефти. Определены границы устойчивости *Secale cereale* L. к нефтезагрязнению.

Практическая значимость работы. Разработаны рекомендации по биоремедиации почв, загрязненных нефтью в условиях юга Тюменской области на примере луговых почв. Основные результаты работы апробированы в образовательном процессе кафедры техносферной безопасности ФГБОУ ВО «Тюменский индустриальный университет» в рамках освоения дисциплины «Рекультивация и ландшафтный дизайн», а также при проектировании и непосредственном проведении восстановительных работ нефтезагрязненных участков компании ООО «Научно-исследовательский институт экологии нефтегазовой промышленности» и могут быть использованы в производственной деятельности природоохранных организаций при планировании и проведении биоремедиации нефтезагрязненных луговых почв.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Применение биопрепаратов в сочетании с мелиорантами способствует интенсификации микробной биodeградации нефтезагрязнения почвы за счёт активного роста углеводородоокисляющих микроорганизмов, а также поддержания их жизнеспособности в процессе биоремедиации.

2. Предлагаемые методы биостимуляции углеводородоокисляющей микрофлоры способствуют улучшению агрохимических свойств почвы и снижению остаточного содержания нефтепродуктов в нефтезагрязненных

луговых почвах на 93-95 %.

3. Остаточное содержание нефтепродуктов ниже 2,28 г/кг не оказывает существенное влияние на всхожесть семян *Secale cereale L.* в нефтезагрязненной почве.

Апробация работы и публикации. Результаты исследований были представлены на I Всероссийской научно-практической конференции «Техносферная безопасность. Современные реалии» (Махачкала, 2020); национальной научно-практической конференции «Нефть и газ: технологии и инновации» (Тюмень, 2019); Международной научно-практической конференции «Арктика: современные подходы к производственной и экологической безопасности в нефтегазовом секторе» (Тюмень, 2019) и др.

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 2 – в изданиях индексируемых Scopus и Web of Science, получен патент на изобретение «Способ исследования пространственного распределения нефти в поровом пространстве грунтов и других пористых сред».

Личный вклад автора. Диссертационная работа является результатом самостоятельных исследований автора. Соискателем разработана программа и методика исследований; проведены лабораторные и полевые эксперименты; произведен отбор почвенных и растительных образцов, статистически обработан и проанализирован экспериментальный материал, проведена апробация результатов исследования, подготовлены публикации, написана диссертация.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы. Текст изложен на 142 страницах машинописного текста; содержит 9 таблиц, 26 рисунков, 5 приложений. Список литературы содержит 266 источников, в том числе 111 – на иностранных языках.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика и свойства нефтяных углеводородов

Нефть – это флюид, который в основном состоит из различных сложных углеводородных смесей. Это смесь сотен углеводородов, чьи отдельные химические свойства сильно различаются. Относительная плотность нефти, как правило, находится в пределах от 0,83 до 0,96, однако смолистые нефти имеют плотность, близкую к единице, а, так называемые, белые нефти из газоконденсатных месторождений очень легки ($\rho=0,75-0,77$). Температура застывания нефти имеет широкий диапазон, лежащий от минус 62 до +35°C. Кинематическая вязкость нефти изменяется в довольно широких пределах от 2 до 300 мм²/с при нормальных условиях. В среднем вязкость нефти редко превышает 40-60 мм²/с (Магеррамов и др., 2009). Кроме того, состав и свойства сырой нефти могут изменяться в зависимости от местоположения и возраста нефтяного месторождения, а также могут варьировать в зависимости от глубины внутри отдельной скважины.

Когда нефть попадает в окружающую среду, её соединения подвергаются физическим, химическим и биологическим изменениям, которые в совокупности называются выветриванием (Бабаев, Мовсумзаде, 2009; Кирий и др., 2014; Баландина и др., 2014). Степень разложения различных типов нефтяных углеводородов при этих изменениях зависит от физических и химических свойств этих углеводородов.

Соединения в сырой нефти можно разделить на три основных класса, состоящие из насыщенных углеводородов, ароматических углеводородов и полярных органических соединений. Нефть также содержит такие элементы, как азот, сера и кислород, которые составляют менее 3%_{об}, а также менее 1%_{об} – фосфор и тяжелые металлы, такие как ванадий и никель (Химия нефти, 1984).

Предельные углеводороды включают в себя алканы, которые содержат одинарные связи между атомами углерода и имеют формулы C_nH_{2n+2} , алкены, которые содержат одну или несколько двойных связей между атомами и имеют формулы C_nH_{2n} и циклоалканы, содержащие атомы углерода в циклических структурах (Органическая химия Ч.1, 2012).

Алкановые углеводороды относятся к основным компонентам нефти. Содержание их в нефти составляет от 40 до 50 %, а в некоторых видах нефти – до 70%. Нафтены или циклоалканы находятся в нефти в преобладающем количестве. В некоторых видах нефти их количество доходит до 75-80 %. Такими являются бакинские, некоторые американские нефти (Черножуков, Обрядчиков, 1946).

Структура предельных углеводородных молекул состоит из углерод-углеродной и углерод-водородной связи, которая легко разрушается. Кроме того, у них относительно низкая температура кипения, поэтому насыщенные углеводороды могут постепенно «выветриваться» из почвы за счет фотодеструкции и испарения.

Арены или ароматические углеводороды относятся к основным компонентам нефти, но их содержание в нефти меньше, чем алканов и нафтенос – от 15 до 50 %. Среднее содержание аренов в малопарафинистых нефтях составляет 37,4 %, среднепарафинистых 30,6 %, высокопарафинистых 20,8 % (Магеррамов и др., 2009).

Ароматические углеводороды имеют более сложную молекулярную структуру и обладают повышенной устойчивостью. Сложность бензольного кольца и его более высокая температура кипения значительно увеличивают трудности удаления аренов из почвы. Полициклические ароматические углеводороды представляет собой типичные стойкие органические загрязнители, которые широко распространены в различных современных экологических системах (Пиковский, 1993; Bayatetal, 2015).

Ароматические углеводороды считаются наиболее острым токсичным компонентом нефтепродуктов, а также связаны с хроническим

и канцерогенным эффектом (Anderson, et al., 1974; Логинова и др., 2011). Их структура различается по количеству бензольных колец, которое может варьироваться от одного до пяти. Наиболее легкие моноароматические соединения (одно кольцо) включают такие соединения как бензол, толуол, этилбензол и ксилол. Ароматические соединения с двумя или более кольцами называются полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ)(Органическая химия Ч.2, 2012).

Среди трех видов углеводородных соединений неуглеводородные соединения имеют максимальное число атомов углерода. Это высокомолекулярные гетероатомные соединения, в состав которых одновременно входят углерод, водород, кислород, сера, азот и металлы (Коронелли, 1996). Суммарное содержание их в нефтях в зависимости от их типа и плотности колеблется от долей процентов до 45 %. Они нерастворимы в воде и имеют относительно высокую температуру плавления и кипения, поэтому их трудно удалить из почвы, что приводит к очевидной экологической токсичности и мутагенности (Исмаилов, 1990). Кроме того неуглеводородные соединения содержат небольшое количество тяжелых металлов, таких как ванадий (0,04 %) и никель (0,01 %) (Бахшиева, 1991).

Таким образом, естественное остаточное загрязнение почвы в основном представляют собой полициклические ароматические углеводороды и неуглеводородные соединения (Исмаилов, 1988; Азнаурьян, Колесников, 2007). Они обладают наибольшей устойчивостью к воздействию микроорганизмов и наименьшей степенью биodeградации по отношению к исходному содержанию: 30 – 45 % для нафтенных и от 0 до 30 % для пентаароматических углеводородов, асфальтенов и смол (Кодина, 1988).

Кроме нефти, загрязнителями почвы на нефтяных и газовых месторождениях также являются буровые сточные воды. В настоящее время большинство отечественных нефтяных месторождений вступили в

средние и более поздние периоды добычи нефти, когда содержание воды в сырой нефти достигает 70-80 %, а иногда до 90 %. В процессе первичной подготовки нефти выделяется большое количество нефтесодержащих сточных вод. Если их не обезвреживать, они могут привести к серьезному загрязнению почвы и воды (Солнцева, 1998). По своему составу нефтепромысловые сточные воды содержат нефть, различные соли, органическое и неорганическое вещество и микроорганизмы. Этот вид сточных вод не только вызывает засоление почвы, но и нарушает качество почвенной среды (Абуталиева, 2008; Воеводина и др. 2015).

1.2. Пространственное распределение нефти в почве

Последствия углеводородного загрязнения почвы зависят от параметров разлива, процессов многофазного течения, улетучивания, растворения, геохимических реакций, биodeградации и сорбции. Междисциплинарное исследование этих процессов имеет решающее значение для успешной оценки процесса миграции углеводородов в грунтах.

Тяжесть последствий загрязнения почвы, как правило, зависит от свойств почвы. Знание процесса инфильтрации является необходимым условием для изучения миграции загрязняющих веществ в ненасыщенной или вадозной зоне. Данными вопросами занимались многие российские и зарубежные ученые (Пиковский, 1988; Солнцева, 1998; Аммосова, 1999; Логинов, 2000; Гилязов и др., 2003; Леднёв, 2008; Eastcott et al., 1989; Mackay and Roberts, 1985).

Разливы нефти на поверхность почвы включают в себя три основных процесса, которые определяют масштабы разлива и последующие воздействия на окружающую среду. Эти процессы представляют собой поверхностный поток, инфильтрацию и испарение (Геннадиев, 2009).

Миграция нефтепродуктов через почву происходит двумя

основными путями (Кузнецов, Градова, 2006; Трофимов и др., 2008):

1) инфильтрация в почву под действием силы тяжести и капиллярного давления;

2) в результате растворения в воздухе или воде отдельных соединений и компонентов нефти и нефтепродуктов.

Скорость инфильтрации нефти в почву зависит от различных факторов, основными из которых являются: количество влаги в почве, наличие и характер растительности, особенности ландшафта и климата, скорость выброса загрязнителя (катастрофическая или медленная утечка), фракционный состав почвы (например, песок в сравнении с глиной), а также физико-химические свойства нефти (Солнцева, 1998).

В процессе миграции нефти через почвенный слой, определённое количество её массы удерживается частицами почвы. Такое явление определяется как «остаточная нефтенасыщенность» или «нефтеёмкость почвы». В зависимости от устойчивости нефтепродуктов к биodeградации остаточная насыщенность может потенциально существовать в почве в течение многих лет (Мироненко, 2002). Изучение остаточной насыщенности играет важную роль, так как она определяет степень загрязнения почвы и может служить постоянным источником нефтезагрязнения воздуха или грунтовых вод (Hurtig et al., 1988).

Если разлив нефти или нефтепродуктов небольшой относительно объема доступного грунта, всё загрязнение преобразуется в остаточное нефтенасыщение, а его миграция обычно прекращается до достижения им грунтовых вод. Тем не менее, загрязнение грунтовых вод может произойти в случаях, когда дождевая либо талая вода, проникая через почву, содержащую остаточную нефтенасыщенность, будет приводить к нисходящей миграции водорастворимых соединений.

В случае крупного нефтеразлива миграция нефтезагрязнения вниз прекратится после достижения водонасыщенного горизонта (Кузнецов, Градова, 2006; Геннадиев и др., 2015). Если плотность загрязнителя

меньше, чем плотность воды, он имеет тенденцию «плавать» вдоль границы раздела между насыщенными водой и ненасыщенными зонами и распространяться горизонтально в блин-подобном слое, обычно в направлении уклона или потока подземных вод (Солнцева, 1998; Пиковский, 1988).

Если загрязняющее вещество имеет высокую плотность (полихлорированные бифенилы и другие хлорированные органические растворители обычно плотнее воды), оно будет продолжать двигаться вниз через водоносный горизонт грунтовых вод под действием силы тяжести до тех пор, пока не преобразуется в остаточное насыщение либо не встретит непроницаемый горизонт. (Кузнецов, Градова, 2006).

В реальности на процессы миграции нефти влияют многочисленные специфические, как для загрязнителя, так и для конкретного участка, факторы. В работах Серединой В.П. и др. (2008, 2009) показано влияние почвенно-геохимических барьеров на процессы миграции нефти и нефтепродуктов. Как следствие, распределение нефтепродуктов в поверхностном слое почвы может быть довольно сложным.

Процессы, влияющие на пространственное распределение в почве органических растворенных загрязнителей, таких как нефть, можно разделить на адвекцию, дисперсию и улетучивание, окисление-восстановление, адсорбцию, ионно-катионный обмен и растворение углеводородов в воде (Semple et al., 2003; Brassington et al., 2007).

Согласно Mackay и Roberts (1985), в песчаных и гравийных водоносных горизонтах доминирующим фактором миграции растворенного загрязняющего вещества является *адвекция*, процесс, с помощью которого растворенные вещества переносятся объемным движением проточной подземной воды. Скорость грунтовых вод колеблется от 1 до 1000 м/год, так что растворенные загрязняющие вещества распространяются при движении с грунтовой водой. Эти данные также подтверждены Oghenejoboh и Puyate (2010), которые исследовали

скорость диффузии сырой нефти с различными физическими свойствами в суглинисто-песчаных почвах. Скорость вертикальной диффузии всей исследованной сырой нефти была значительной в результате адвективного потока в дополнение к диффузионному потоку.

Дисперсия обусловлена двумя основными процессами: молекулярная диффузия в растворе и механическое перемешивание (Нариманидзе, 1993). Результатом этого процесса является общий чистый поток растворенных веществ из зоны высокой концентрации в зону с более низкой концентрацией (Barnes, Chuvilin, 2009). Диффузия в растворе – это процесс, при котором ионные или молекулярные составляющие движутся под влиянием их кинетической активности в направлении их градиента концентрации.

Летучесть относится к процессу переноса загрязнений из почвы в воздух. Это форма диффузии, которая происходит при движении молекул или ионов из области высокой концентрации в область с низкой концентрацией (Salanitro, 2001). Летучесть – чрезвычайно важное свойство для многих органических химических веществ, в то время как большинство ионных веществ обычно считаются нелетучими. К летучим компонентам нефти (бензиновая фракция) относят углеводороды с температурой кипения до 180 °С. Считается, что скорость самоочистки почв от летучих углеводородов за счет физического испарения достаточно высокая, и по некоторым данным может достигать до 75 % для легких нефтей и до 40 % – для средних нефтей в первые дни после разлива (Глазовская, Пиковский, 1980; Fingas, 1995). Однако, должного внимания к исследованию состава и содержания летучих компонентов нефти в почвах, как правило, не уделяется.

В работе Завгородней и Соколовой (2011) в результате исследования образцов почв, донных отложений и почвенных вод было идентифицировано около 100 летучих неполярных углеводородов, которые включали в себя н-алканы, изо-алканы, циклоалканы и ароматические

углеводороды. Также была отмечена высокая подвижность летучих нефтепродуктов, которая создаёт опасность вторичного загрязнения водоемов за счет выноса с поверхностными и почвенными водами с загрязненных территорий.

Окислительно-восстановительные процессы в почве определяются условиями в которых происходит деградация загрязнителя: некоторые соединения требуют аэробных условий для биodeградации, в то время как другие требуют анаэробных условий. Большой вклад в изучение окислительно-восстановительных процессов в почвах внесли И.П. Сердобольский, С.П. Ярков, И.С. Кауричев, Д.С. Орлов, В.И. Савич. Окислительно-восстановительный потенциал (Eh) является комплексным показателем того, какие процессы, а значит и условия преобладают в исследуемой среде (Кауричев, Орлов, 1982). Исследования окислительно-восстановительного потенциала луговых почв Tobol-Ишимского междуречья в работе Еремина (2008) величина ОВ-потенциала изменялся от 400 до 690 mV, что характерна для нормально аэрируемых и максимально аэробных условий.

Углеводороды нефти подвержены как аэробному, так и анаэробному окислению. Первая стадия биоразложения нерастворимых углеводородов является преимущественно аэробной, тогда как содержание органического углерода затем снижается за счет анаэробного действия. Взаимодействия между различными популяциями микробов могут иметь важное значение для деградации сложных соединений. В некоторых случаях, продукты, полученные в анаэробных условиях, требуют аэробных условий для дальнейшей деградации (Alexander et al., 1994).

Процессы разложения некоторых опасных соединений могут также включать восстановительные стадии (Кузнецов, Градова, 2006). Эти процессы наиболее быстро проходят в анаэробных условиях. Многие соединения, такие как хлорированные углеводороды, могут трансформироваться в анаэробных или чередующихся анаэробно-

аэробных условиях, но устойчивы к строго аэробным условиям (Wilson and Wilson, 1985).

Следовательно, изменение аэробных/анаэробных условий путем корректировки Eh может быть полезным инструментом инженерного управления для максимизации детоксикации и деградации некоторых соединений. Поддерживать анаэробные условия можно, ограничивая аэрацию инасыщая почву водой. Регулярная распашка почвы может поддерживать аэробные условия.

Несмотря на очевидную важность оценки окислительно-восстановительного потенциала (Eh) в агрономии, данному показателю уделено мало внимания в литературе, что можно объяснить следующими методологическими причинами (Husson, 2013):

- 1) высокая изменчивость Eh в пространстве и времени, особенно по сравнению с изменчивостью pH;
- 2) трудности измерения Eh в аэробных почвах;
- 3) зависимость Eh и pH.

Следовательно, измерения Eh трудно воспроизвести и интерпретировать, а результаты различных авторов трудно сравнивать.

Адсорбция является распространенным явлением во всех вязких веществах. Сырая нефть очень вязкая с небольшим процентом летучих фракций. Адсорбция сырой нефти связана с адгезией ионов загрязняющих веществ или молекул сырой нефти к поверхностным или твердым частицам почвы, что приводит к увеличению концентраций сырой нефти на поверхности почвы по отношению к содержанию её в почвенной влаге (Barnes, Chuvilin, 2009). Исследования Соколовой, Трофимова (2009), Liu et al (2013) показали, что сорбция является основным фактором, препятствующим полной биоремедиации углеводородов в почве, увеличивает их стойкость в почвенной матрице.

Катионный обмен можно рассматривать как частный случай процесса адсорбции, поскольку он всегда сопровождается концентрацией

какого-либо катиона на границе раздела фаз. Катионный обмен определяет кислотно-основную буферность почвы, а значит устойчивость к ионным компонентам нефти, таким как водорастворимые соли (Сулейманов, Назырова, 2007; Ступин, 2009).

Растворимость компонентов нефти в воде не велика (менее 5 %), однако ароматические углеводороды, такие как бензол, толуол, этилбензол и ксилол, как правило, являются наиболее водорастворимой фракцией нефти и других нефтяных соединений (Химия нефти, 1984). Бензол (в 10 раз более водорастворимый, чем этилбензол или ксилол) является наиболее водорастворимым из соединений ароматических углеводородов (бензол, толуол, этилбензол и ксилол) и часто является основным загрязнителем грунтовых вод, вызывающим обеспокоенность в местах нефтеразливов из-за его высокой токсичности и подвижности по сравнению с другими нефтяными углеводородами.

1.3. Изменение свойств почвы при нефтеразливе

Характер изменений в почвенной среде при загрязнении её нефтью и нефтепродуктами носит трудно прогнозируемый характер. Связано это с тем, что нефть не обладает строго определённым химическим составом (Пиковский, 1993). Однако анализ литературы позволил выявить некоторые характерные аспекты загрязнения почвы нефтью и нефтепродуктами.

В первую очередь, из-за малой плотности, более высокой вязкости и низкой эмульгирующей способности нефти, она легко впитывается поверхностью почвы, влияя на проницаемость и пористость почвы (Солнцева, 1998; Трофимов и др., 2000). Нефть богата углеродом и небольшим количеством соединений азота, поэтому он может изменять состав и структуру органического вещества почвы и воздействовать на соотношения C/N, C/P, солёность, pH и проводимость почвы (Цомбуева, 2017;). Тяжелые металлы (никель и ванадий) в нефтяных соединениях

(Saadat et al., 2014) и высокие концентрации соли в нефтедобывающей воде также могут оказывать негативное воздействие на почвенную среду (Соромотин и др, 1996).

Разливы нефти и нефтепродуктов на поверхность почвы предотвращают её аэрацию, влияют на температуру почвы, ее структуру, водный режим, плодородие, pH и приводят к нарушению жизнедеятельности почвенных микроорганизмов и сельскохозяйственных культур (Геннадиев и др., 1990). Другие последствия включают загрязнение грунтовых вод, снижение биоразнообразия растительности, потерю хозяйственных и промышленных водных ресурсов, сокращение рыболовной и сельскохозяйственной деятельности, и, как следствие, бедность и слабое развитие сельскохозяйственных районов.

Прежде всего, загрязнение почв нефтепродуктами влияет на гумусовый горизонт, окраска которого становится более темной. Количество углерода в гумусе значительно увеличивается, что приводит к ухудшению его свойств как питательного субстрата для растительности (Кувшинская и др. 2001; Ковалева, 2017; Федотова, Мелкозеров, 2017). Увеличивается количество охристых, ржаво-бурых пятен, примазок, Fe-Mn пленок по граням структурных отдельностей, возрастает степень сегрегации железа. Начинаются процессы оглеения почвы (Пиковский, Солнцева, 1981; Кувшинская и др., 2001; Андреева, 2005). По данным Н. П. Солнцевой (1998) и Т. А. Андреевой (2005) меняется характер границ между горизонтами: возникает волнистость, языковатость, при сильном загрязнении наблюдается размывание границ.

Органическое вещество, присутствующее в почве, играет очень важную роль, поскольку оно определяет качество почвенной среды. Данные литературы указывают на то, что загрязнение почв углеводородами нефти влияет на содержание органического углерода. В результате появления большого количества окисляемых органических веществ окислительно-восстановительный потенциал почвы изменяется, а

ее биологическая активность снижается. Это проявляется в значительном расширении отношения C: N: P, которое составляет 100:10:1. Значительное увеличение содержания органического углерода в почве под воздействием топочного мазута было также установлено Kucharski and Jastrzêbska (2005). Аналогичные результаты были получены Caravaca и Roldán (2003) и Riffaldi et al. (2006).

Нефть обволакивает нефтью почвенные частицы, что приводит к значительному увеличению гидрофобности почвы, она утрачивает способность впитывать и удерживать воду, происходит вытеснение воздуха из почвенных пор, и, в конечном итоге, нарушается водный и воздушный режимы почвы (Трофимов и др., 2000). Результаты исследования Gordon et al. (2018) показывают, что на сильно засушливых, загрязненных нефтью песчаных почвах, даже при значительном снижении концентрации углеводородов с течением времени, гидрофобность почвы и ее негативное влияние на водный режим сохраняются значительно дольше.

Характер влияния углеводородов на реакцию почвы, по крайней мере, так же изменчив, как и сама реакция почвы, поэтому результаты исследований этого вопроса различными авторами (Оборин, 1988; Пиковский, 1993; Солнцева, 1998; Гилязов, Гайсин, 2003 и др.) носят противоречивый характер. Результаты исследований нефтяных месторождений в Китае показали, что загрязнение нефтью повышает pH почвы (Wang et al., 2010; 2013). По их мнению, повышение значения pH в почве, загрязненной сырой нефтью могут быть вызваны двумя факторами. Во-первых, гидрофобная природа сырой нефти может вызвать потенциальную засуху в поверхностных и под поверхностных слоях загрязненной почвы, что может усугубить засоление и, следовательно, повысить значения pH. Во-вторых, было показано, что загрязнение нефтью в почве связано с накоплением обменных оснований (такого как Ca^{2+} , Na^{+}) и снижением обменной кислотности и эффективной емкости катионного обмена. Эти механизмы могут также лежать в основе повышения значений

pH в почве, загрязненной нефтью. Аналогичные результаты были получены и в работах других авторов (Коркина, 2015; Benka-Coker and Ekundayo, 1995; Ekundayo and Obuekwe, 2000; Osujietal., 2006; Agbogidietal., 2007).

Результаты других исследований (Акран, Екро, 2006; Леднев А.В., 2006, 2008) показывают снижение pH нефтезагрязненных почв. Снижение pH на загрязненных участках может быть результатом деятельности микроорганизмов, разлагающих углеводороды.

Нефтеразливы меняют альбедо поверхности, на которой они происходят, влияя на её температурный режим (Aislabie et al., 2004). Эта проблема особенно актуальна для регионов залегания многолетнемёрзлых пород. В работе Ершова и др. (2007) было доказано увеличение глубины сезонного оттаивания мёрзлых грунтов в районах нефтеразливов от 30 до 100 %, а также уменьшение глубины сезонного промерзания на 11-14 %.

Кроме того, в нефтезагрязненных почвах уменьшается доступность для растений элементов минерального питания (ЭМП): азота, фосфора, калия. Это происходит из-за их иммобилизации микроорганизмами под воздействием высокого соотношения углерода/азота, обволакивания нефтью почвенных частиц, которое препятствует миграции подвижных форм ЭМП в раствор, а также вследствие отрицательного влияния нефти на бактерии, участвующих в круговороте азота в почве (Хазиев и др., 1988; Исмаилов, 1988; Xu, Johnson, 1997).

Влияние нефти и нефтепродуктов на микробные популяции зависит от химического состава нефти и от вида микроорганизмов, присутствующих в почвенной среде. Популяции некоторых микробов увеличиваются. В нормальной обстановке микроорганизмы, которые могут существовать в условиях нефтезагрязнения, как правило, не развиты, в то время как на загрязненной почве, адаптируясь к новому типу окружающей среды, они могут производить определенную ферментную систему и постепенно формировать доминирующую популяцию с симбиотическим

или синергическим эффектом (Хазиев, Фатхиев, 1981; Давыдова, Тагасов, 2006; Chiara et al, 2009). Ряд исследований показал, что загрязнение углеводородами может изменить микробную популяцию, состав структуры сообщества и систему ферментов в почве, учитывая приоритет ингибирующего действия (Uzoije, Agunwamba, 2009). Как правило, такие микробы используют углеводороды нефти в качестве питательных веществ.

Неоднородность состава различных видов сырой нефти и нефтепродуктов влияет на характеристики ее биоразлагаемости. Тем не менее, некоторые виды сырой нефти содержат летучие бактериостатические соединения, которые должны быть удалены для того, чтобы микробные популяции могли расти (Atlas and Bartha, 1972; Atlas, 1975). С другой стороны, некоторые микробные популяции уменьшаются или показывают нейтральную реакцию на нефтяные углеводороды. Суммарное влияние нефтяных углеводородов на общее микробное разнообразие остается неясным.

Нефтезагрязнение препятствует нормальному росту сельскохозяйственных культур путем снижения скорости прорастания и фертильности и снижения устойчивости к вредителям и болезням (Wang et al., 2017). Кроме того, нефтяные соединения могут вступать в реакцию с неорганическим азотом и фосфором, ограничивая нитрификацию и удаляя фосфорную кислоту, поэтому эффективный азот и фосфор в почве будут уменьшаться, а питание сельскохозяйственных культур будет нарушено (Мосичев и др., 1982; Pinchin et al, 2013; Liao et al, 2015).

Существует прямая зависимость между количеством разливов нефти и накоплением марганца и железа в почве (Водяницкий и др., 2015). Исследования в этой области (Копылова, 2010) отмечают, что накопление ионов марганца и железа в почве оказывает токсичное действие на растения. Загрязнение сырой нефтью отрицательно сказывается на рост

растений из-за изменений в питательном состоянии почвы и нарушения микробной активности.

Высшие растения наиболее подвержены воздействию нефти и нефтепродуктов (Красильников, 1958; Работнов, 1978; Бигон и др., 1989; Звягинцев и др., 1992).

Гидрофобные частицы нефтепродуктов ухудшают процесс подачи воды к корням растений, что приводит к их физиологическим изменениям. В работе Назарова с соав. (2004) утверждается, что всхожесть семян растений в нефтезагрязненной почве определяется, в основном, доступностью для них воды и кислорода, а не токсичностью нефти.

В результате преобразования нефтепродуктов состав гумуса почвы резко меняется. Из-за увеличения концентрации углеродных остатков в нефтепродуктах окислительно-восстановительные условия и подвижность гуминовых компонентов изменяются в пределах профиля почвы.

Однако существуют экосистемы, где нефтяное загрязнение оказывает слабое негативное воздействие или влияет даже положительным образом на растения (Назаров, 2007). Так, в работе Глязнецовой Ю.С. (2012) было установлено, что 5 %-ная концентрация нефти оказывает стимулирующий эффект на всхожесть семян *Avena sativa*, рост растения, его выживаемость, что объясняется адаптивной ответной реакцией опытного растения и повышением его устойчивости к действию токсичных компонентов нефти.

Полициклические ароматические углеводороды в нефтяных загрязнениях имеют канцерогенные, мутагенные, тератогенные и другие токсические эффекты. Они могут попадать в организм людей и животных через дыхание, контакт с кожей и пищу, ухудшая нормальную функцию печени и почек и вызывая различные заболевания (Кондратьева и др., 2007; Дударев, 2009).

Наконец, нефтезагрязнение почвы может влиять и на качество атмосферы и гидросферы. В частности, низкокипящие и легкие

углеводороды могут легко попасть в атмосферу путем испарения, в поверхностные и подземные воды и, наконец, через пищевую цепь непосредственно в организм человека.

1.4. Методы восстановления нефтезагрязнённых почв

В ответ на растущую потребность реагировать на загрязнение окружающей среды в настоящее время разрабатывается множество новых технологий для очистки почвы, фильтрата, сточных вод и грунтовых вод, загрязненных нефтепродуктами, включая методы как *in situ*, так и *ex situ*.

Методы восстановления *in situ* не требуют земляных работ, и очистка загрязнителя осуществляется на месте без проведения земляных работ или переноса грунта в другое место. Методы *in situ* чаще всего используются для удаления хлорированных растворителей, тяжелых металлов и углеводородов с использованием (отдельно или в комбинации) микроорганизмов, растений, физических и химических методов (Ступин, 2009).

Для методов *ex situ* необходимы раскопки, что делает их сравнительно дорогими. При использовании методов *ex situ* вне площадки загрязняющее вещество переносится в другое место. Главным преимуществом этих методов является возможность контроля над системой (Haritash & Kaushik, 2009). Этот процесс подходит для восстановления загрязненных участков, таких как почвы, отложения или шламы, с трудно растворимыми загрязнителями, например, полициклическими ароматическими углеводородами.

В Российской Федерации работы по восстановлению нарушенных в результате хозяйственной и иной деятельности земель осуществляются в случаях, предусмотренных Земельным кодексом Российской Федерации, Лесным кодексом Российской Федерации, другими федеральными законами и проводятся в соответствии с «Правилами проведения

рекультивации и консервации земель».

В литературе приводится описание широкого спектра биологических, физических и химических методов, применяемых в целях ремедиации почвы, загрязненной нефтью и нефтепродуктами (Пиковский Ю.И., Солнцева Н.П., Кузнецов Ф.М., Гилязов М.Ю., Гайсин И.А., Леднёв А.В., Оборин А.А., Никифорова Е.М., Eve Riser-Roberts, Paul T.Kostecki и др.). Вопросы нефтяного загрязнения, а также рекультивации нефтезагрязненных земель Тюменской области отражены в трудах В.Н. Дядечко и др. (1990), А.В. Соромотина (2004; 2007), Гашева и др. (1992; 2012), М.Н.Казанцевой и др. (2001), Чижова Б.Е. (2000) и многих других. Восстановление загрязненной почвы является многоплановой проблемой не только из-за сложности факторов, которые могут повлиять на эффективность восстановительных работ, но также из-за необходимости выбора подходящих технологий для различных этапов обработки, требуемых для конкретного случая загрязнения.

1.4.1. Технологии *ex situ*

Выемка и утилизация нефтезагрязненного грунта

Выемка грунта— это общий подход к работе с загрязненной почвой. Выкопанный грунт может быть обработан на месте, обработан за пределами участка в отстойниках или шламонакопителях либо размещен на свалках без обработки(Ступин, 2009). После обработки он может быть возвращен на место раскопок. Раскопки легко выполнить, и они быстро удаляют загрязнение с площадки в течение нескольких часов, в отличие от других методов восстановления, которые могут потребовать значительное время. Изъятие нефтезагрязненного грунта осуществляется, как правило, при крупных утечках, когда требуются срочные, незамедлительные действия (Гилязов, 2008; Лобачева и др., 2012).

Данный метод очень прост, экономически эффективен и предотвращает возможное загрязнение грунтовых вод. Однако при выемке

возникает вопрос, что делать с загрязненной почвой, которая по существу переносит загрязнение с одного участка на другой (Славнина, 1984; Трофимов и др., 2000). Также к его основным недостаткам относится: возможное расположение на загрязненной территории зданий, подземных коммуникаций, канализации или водопровода; высокая стоимость транспортировки загрязненной почвы до конечного пункта назначения и возможное загрязнение (если почва сбрасывается без обработки) конечного пункта складирования.

Промывка почвы (элюирование)

Промывка почвы – это метод сепарационной обработки *ex situ*, при котором загрязняющие вещества в почве отделяются от незагрязненных частиц почвы с помощью методов физического разделения, химической экстракции или их комбинации.

Сначала загрязненные почвы обычно выкапывают (хотя существуют и системы промывки грунта *in situ* (Пиковский, 1993; Назаров и др., 2014)), а затем грунт просеивают, чтобы удалить крупные камни и частицы. Если имеется большое количество глины или других очень мелких частиц почвы, промывка почвы может быть ограничена способностью частиц почвы оседать после завершения промывки/экстракции (Kostecki, 2005).

Системы физического разделения включают в себя возможные технологические процессы:

- грохот;
- гидродинамическое разделение;
- пенная флотация;
- магнитная и электростатическая сепарации;
- истирание.

Промывка почвы наиболее эффективно используется на крупнозернистых и песчаных грунтах, которые содержат небольшое количество органического вещества. Этот метод наиболее эффективен для восстановления почв, которые были загрязнены тяжелыми металлами и

углеводородами нефти, а также может быть эффективным при работе с некоторыми летучими соединениями, кислотами, цианидами, ПАУ, ПХБ, пестицидами и гербицидами (Mann, 1999).

Во время промывки почвы восстановление загрязненной почвы происходит одним из следующих способов:

- Растворение или суспендирование загрязняющих веществ в воде. Процесс может быть ускорен путем добавления химических веществ, таких как растворители и поверхностно-активные вещества, в промывную воду.

- Концентрирование загрязняющих веществ в меньшем объеме почвы путем разделения частиц по размерам или гравитационного разделения. Этот процесс основан на знании того, что загрязняющие вещества, как органические, так и неорганические, обычно связываются с частицами ила, глины или органических веществ почвы. Эти частицы в свою очередь связаны с более крупными частицами песка и гравия в матрице посредством седиментации или других процессов. Процесс мойки позволяет разделить компоненты почвы по размеру частиц, удаляя более мелкие частицы и загрязнения из более крупных частиц почвы. Это приводит к концентрации загрязняющих веществ в гораздо меньшем объеме, который может быть эффективно удален или подвергнут дальнейшей очистке.

Гравитационное разделение применяется тогда, когда загрязняющие вещества имеют особенно высокий или низкий удельный вес, например тяжелые металлы и соединения металлов – свинец, оксид радия и т. д.

Имеются данные о применении технологии промывки почвы на месте. В этом случае технология включает в себя затопление зоны загрязнения подходящим раствором для удаления загрязняющих веществ из почвы. Вода или жидкий раствор впрыскиваются или проникают в зону загрязнения. Загрязнения мобилизуются путем солюбилизации, образования эмульсий или химической реакции с промывочными

растворами. После прохождения через зону загрязнения жидкость, содержащая загрязняющие вещества, собирается специальными скважинами и доставляется на поверхность для утилизации, рециркуляции или очистки и повторного впрыска.

Промывочная вода может быть дополнена рядом веществ, способствующих удалению загрязнений, таких как основные выщелачивающие агенты, поверхностно-активные вещества, кислоты или хелатирующие агенты (Плотникова и др., 2016).

В зависимости от параметров загрязнения применяются различные методы (различные моющие жидкости, соотношение почвы и воды, растворители, поверхностно-активные вещества и другие добавки). Сложные сочетания типов загрязняющих веществ (таких как смесь металлов, летучих и нелетучих органических соединений) и неравномерное распределение загрязняющих веществ в почвенном слое могут затруднить применение метода промывки почвы. В этих случаях наилучший подход может включать последовательные циклы очистки с применением различных способов промывки грунта, нацеленных на различные загрязнители.

К недостатками данной технологии относится то, что промывка почвы считается технологией передачи среды. Это значит, что полученные при её применении загрязненные сточные воды должны затем очищаться или утилизироваться соответствующим образом.

Сверхкритическая флюидная экстракция

Современные технологии восстановления могут быть не эффективны при очистке некоторых типов загрязненных почв. Это приводит к разработке и исследованию новых, эффективных и экономически выгодных технологий. Сверхкритическая флюидная экстракция является относительно новой технологией восстановления загрязненных почв. Это простой, быстрый и селективный процесс экстракции растворителем, в котором в качестве растворителя используется сверхкритическая жидкость

(McHugh, Krukonis, 2013). Сверхкритической жидкостью называется любое соединение при температуре и давлении выше критических значений (выше критической точки), в этой области свойства жидкости находятся между состоянием жидкости и газа. Например, плотность жидкости ближе к плотности жидкой фазы, а вязкость и проницаемость жидкости больше похожи на газовую фазу. Сверхкритические жидкости имеют нулевое поверхностное натяжение и легко проникают в твердую матрицу (Akgerman, 1993).

В сверхкритическом состоянии жидкости очень чувствительны к малейшим изменениям температуры и давления, поэтому, вероятно, что при определённых давлении и температуре жидкость поглощает загрязняющее вещество, а при других условиях эта жидкость избавляется от того же загрязнителя. Таким образом, давление и температура являются двумя основными факторами в этом процессе. Сверхкритическая экстракция жидкости зависит от плотности жидкости, которой, в свою очередь, можно управлять, контролируя давление и температуру системы.

Диоксид углерода достигает сверхкритического состояния при давлении 73 атм. и температура 304 К (31 °C) (Hawthorne, Grabanski, 2000). Это означает, что использование CO₂ для экстракции не требует слишком много энергии, чтобы удерживать жидкость выше сверхкритических условий.

Потенциальное преимущество сверхкритической флюидной экстракции заключается в том, что растворимость целевых аналитов может меняться на несколько порядков путем регулирования давления и температуры экстракции (Milleretal., 1996). Кроме того, кинетика процессов десорбции может быть улучшена простым изменением температуры, используемой для экстракции. В отличие от экстрагирования органическими растворителями, которые могут извлекать значительную долю органического вещества почвы, метод сверхкритической флюидной экстракции с чистым CO₂ может извлекать гидрофобные загрязнители

(например, ПАУ, ПХД) без существенного влияния на органическое вещество почвы (Hawthorneetal., 1999). Другими преимуществами применения углекислого газа является его дешевизна, химическая стабильность, нетоксичность и невоспламеняемость. Чистый CO_2 в целом не является хорошим растворителем для углеводородных полимеров и других углеводородов с высокой молярной массой. Этан, этен и пропан могут быть альтернативами CO_2 , хотя они имеют недостатки в том, что они опасны из-за воспламеняемости и менее экологичны (Al-Marzouqietal., 2007).

Экстракция подкритической водой

Экстракция подкритической водой является экологически чистым методом экстракции, который можно использовать для восстановления почвы, загрязненной различными органическими соединениями. Этот процесс основан на контакте между нагретой водой под давлением и загрязненной почвенной матрицей, в которой органические загрязнители, связанные с почвой, переносятся в водную фазу путем последовательной десорбции, диффузии и растворения, а также элюирования растворенного вещества и его выведения потоком жидкости.

Этот процесс основан на изменении поляризации воды, которое происходит во время повышения температуры до докритической температуры (374 °C). Для поддержания воды в жидком состоянии система должна работать при давлении от 50 до 200 атм.

Повышение температуры выше 200 °C снижает диэлектрическую проницаемость воды. Точно так же температура оказывает аналогичное влияние на два других параметра, поверхностное натяжение и вязкость (Yangetal., 1998). Учитывая преимущества свойств горячей воды, растворимость некоторых ПАУ возрастает до пяти раз.

К сожалению, сверхкритическая вода требует температуры свыше 374 °C и давления более 218 атм. и характеризуется высокой коррозионной активностью, что затрудняет ее использование в больших масштабах.

Пиролиз

Пиролиз – это метод обезвреживания нефтесодержащих грунтов, шламов и материалов, при котором химическое разложение токсичных соединений происходит при использовании высокой температуры (более 430 °C), высокого давления и отсутствии кислорода (Venderbosch and Prins, 2010). Эта технология превращает загрязняющие вещества или токсичные материалы в органические жидкости, воду, уголь и топливный газ (Медведев, 2014).

Оборудование, используемое в пиролизе, состоит из вращающихся печей или печей с псевдоожиженным слоем. Это надежная технология, которая обеспечивает высокую гибкость конструкции и эксплуатации, высокую эффективность очистки от загрязняющих веществ, отсутствие образования CO₂, эффективное снижение массы и объема токсичных материалов, низкие эксплуатационные и эксплуатационные расходы, стабильную работу с органическими и неорганическими отходами, возможности производства энергии и эффективного извлечения материала и возможности реализации как в малых, так и в крупных масштабах (Inguanzo et al., 2002).

Однако эта технология не свободна от ограничений. Повышенное содержание влаги в почве увеличивает стоимость обработки, поэтому технология требует высушивания почвы до обработки. Некоторые газы, такие как CO, H₂, CH₄, которые выделяются в ходе эксплуатации, также требуют утилизации. Пиролиз не эффективен для разрушения или физического отделения неорганических веществ от загрязненной среды (Пиковский, 1993).

Интегрированная система биоремедиации «Biopile»

Biopile – это интегрированная система биоремедиации *ex situ*, объединяющая в себе несколько самостоятельных методов восстановления (Ramadassetal, 2015). Термин «Biopile» определяет систему биологической очистки, в которой загрязненная почва выкапывается и помещается в

большие кучи, чтобы обеспечить биологическое разложение загрязняющих веществ (Benyahia, et al. 2005). Загрязненный материал выкапывается и рекомбинируется или дополняется другими материалами, например питательными веществами, песком, опилками, древесной стружкой, компостом или другими аналогичными наполнителями для улучшения проницаемости и удержания влаги, а затем помещается в специальные конструкции (ячейки), чтобы поддерживать и стимулировать биологические реакции, необходимые для окисления углеводов (Hazen et al., 2003). В этих ячейках, расположенных над землей, происходит стимулирование аэробной или анаэробной микробной активности посредством контролируемой аэрации, внесения питательных веществ и влаги. Повышенная микробная активность приводит к деградации адсорбированных компонентов нефтепродуктов в результате микробного дыхания (Kratzke et al., 1998). Воздух подается в биоячейки через систему труб и насосов, которая либо нагнетает воздух в слой почвы (положительное давление), либо вытягивает воздух (отрицательное давление). Нагнетание воздуха в почву помогает поддерживать постоянную температуру и аэробные условия, а вытягивание воздуха из почвы может создавать анаэробные условия. Чтобы предотвратить вымывание загрязняющих веществ в почву или грунтовые воды, биоячейки конструируют в непроницаемых контейнерах (Lehr, Wiley, 2004).

Эффективность технологии зависит от нескольких параметров, которые сгруппированы в три категории (Snelgrove, 2010), а именно:

- 1) характеристики почвы;
- 2) характеристика загрязняющих веществ;
- 3) климатические условия.

Тип почвы очень важен, потому что вода, питательные вещества и воздух должны с некоторой легкостью мигрировать через поры почвы, чтобы стимулировать процессы микробной биodeградации загрязнения.

Текстура почвы влияет на ее проницаемость, содержание воды и плотность почвы. Высокопроницаемые почвы наиболее легко аэрируются и, следовательно, являются наиболее подходящими для использования в биоячейках. Характеристики загрязняющих веществ определяют их способность к «выветриванию» (летучесть, растворимость) и биodeградации, а климатические параметры определяют скорость этих процессов.

Технология Biopiles обладает рядом преимуществ (Delille et al., 2008):

- 1) технология относительно проста в разработке и реализации, так как использует комплекс простых процессов выветривания и биоразложения нефтепродуктов;
- 2) короткие сроки восстановления: обычно от 6 месяцев до 2 лет при оптимальных условиях;
- 3) конкурентоспособная стоимость: 30-90 долларов США / тонна загрязненной почвы;
- 4) эффективна для органических загрязнений с медленной скоростью биodeградации;

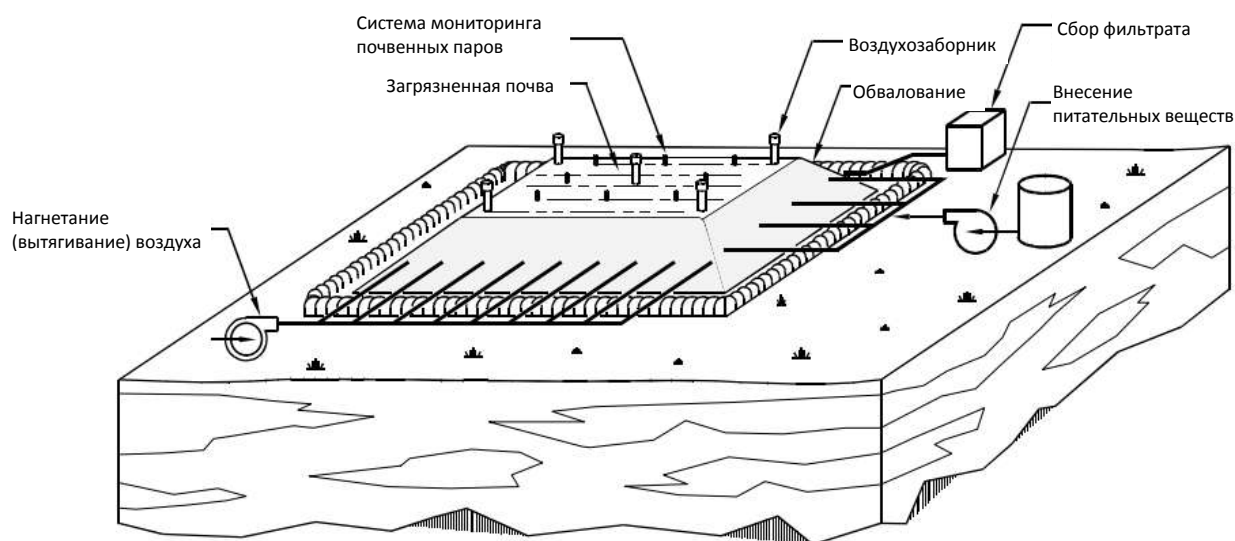


Рис. 1. Типичная система Biopile (EPA, 2004)

5) может быть спроектирована как закрытая система, что позволяет исключать вторичное загрязнение и контролировать выбросы паров;

6) может быть спроектирована так, чтобы быть потенциально эффективной для любой комбинации условий на площадке и параметров нефтезагрязнения.

Биоячейки имеют некоторые потенциальные ограничения. Например, некоторые химические вещества, такие как полихлорированные бифенилы и другие углеводороды, устойчивы к биоразложению, а летучие компоненты будут испаряться, а не разлагаться во время очистки. Также технология теряет свою эффективность при высоких концентрациях нефтезагрязнения (более 5 %), а наличие значительных концентраций тяжелых металлов, таких как свинец, медь и ртуть (более 2500 мг/кг) может препятствовать росту микроорганизмов (Kratzke et al., 1998).

1.4.2. Технологии *in situ*

Технологии *in situ* включают применение физических, химических или биологических процессов для разложения, удаления или иммобилизации загрязняющих веществ в подповерхностном слое без удаления загрязнённого грунта (Ступин, 2009).

По сравнению с выемкой грунта и методами восстановления *ex situ* использование этих технологий дает ряд преимуществ, таких как устранение глубокого загрязнения и, как правило, более низкая стоимость.

Технологии *in situ* подразделяются на три основные группы в зависимости от основного механизма, с помощью которого достигается восстановление почвы:

- физико-химические технологии;
- технологии биологической очистки;
- технологии термообработки;

Физико-химические технологии включают удаление паров почвы, капсулирование, промывку почвы, химическое окисление и

электрокинетическое разделение.

Биологическая обработка использует микроорганизмы, грибы или растительность для биodeградации, удаления или иммобилизации загрязнений в почве. Биологические технологии включают биовентиляцию, фиторемедиацию и контролируемое естественное самоочищение.

Термическая обработка использует тепло для отделения загрязняющих веществ от загрязненных сред за счет повышения их подвижности. Термическая обработка включает испарение; уничтожение загрязняющих веществ или загрязненных сред путем сжигания, разложения или детонации загрязнителей или загрязненных сред; или иммобилизации загрязнителей путем плавления и отверждения загрязненных сред.

Главной особенностью многих технологий восстановления *in situ* является внесение и извлечение жидкостей или других реагентов из почвы. Возможность контролировать процессы внесения и извлечения этих жидкостей или реагентов является ключевым фактором эффективности технологий *in situ*.

Экстракция почвенного пара

Экстракция почвенного пара *in situ* – это технология восстановления, в которой применяется вакуум, чтобы вызвать контролируемый подповерхностный воздушный поток для удаления летучих органических соединений и некоторых среднелетучих органических соединений из vadose zone на поверхность для обработки (Suthersan, 2016).

Конструкция системы обычно включает в себя установку воздушных компрессоров на добывающие скважины, которые обычно изготавливаются из перфорированных ПВХ труб для создания потока воздуха через почвенный слой. Загрязненный воздух подается на поверхность и проходит через сепаратор для удаления влаги перед очисткой воздуха. Очистку обычно проводят адсорбцией (активированный

уголь) или с помощью систем термического окисления (USA EPA 2006). Вода, образующаяся в сепараторе жидкости, также может потребовать очистки. Когда ожидаемые концентрации в воздушном потоке достаточно высоки (от 0,1 до 0,5% и более) иногда применяется отдельная система обработки конденсата. С целью увеличения радиуса действия добывающих скважин над поверхностью почвы часто укладывают бетонное, асфальтовое, геомембранное или другое покрытие с низкой проницаемостью.

Также имеется информация о применении данного метода *ex situ*. Он представляет собой полномасштабную технологию, при которой почва выкапывается и размещается над сетью надземных трубопроводов, в которых создаётся вакуум для стимулирования испарения летучих органических веществ (Nyman and Dupont, 2001).

Процесс экстракции почвенного пара обусловлен выделением летучих соединений из конденсированных фаз (сорбированных на частицах почвы, растворенных в поровой воде или неводной жидкости) в почвенный газ, протекающий через грунт. Процесс улетучивания определяется параметрами загрязнения и свойствами почвы.

Главным преимуществом данной технологии является то, что она легко сочетается с другими методами восстановления, такими как барботирование воздуха, и может использоваться, когда уровень грунтовых вод находится на глубине, где добывающие скважины могут вытягивать в них воду. Кроме того, технология проста в использовании.

Однако, несмотря на очевидные преимущества, существуют факторы, которые могут ограничивать применимость и эффективность процесса восстановления загрязненных почв.

Почва с низкой проницаемостью и высокой степенью насыщения потребует более высоких вакуумов, тем самым увеличивая затраты и затрудняя работу системы экстракции почвенного пара *in situ* (Castelo-Grande, Barbosa, 2003).

Отработанный воздух, полученный при использовании данной технологии, может потребовать очистки для устранения возможного вреда для человека и окружающей среды. Сточные воды, образующиеся в результате очистки отходящих газов, могут также потребовать очистки либо утилизации. Отработанный активированный уголь обязательно подлежит регенерации либо утилизации.

Использование отверждающих реагентов (метод капсулирования)

Метод капсулирования тесно связан с технологиями, которые используют физико-химические процессы для обезвреживания радиоактивных, и других опасных отходов. Технологии отверждения направлены на иммобилизацию загрязняющих веществ путем преобразования их в менее растворимые формы и капсулирования их с созданием прочной матрицы, формируя твердый материал, который может представлять собой монолитный блок, глиноподобный материал, гранулированные частицы или какую-либо другую физическую форму.

Технологии капсулирования снижают потенциальную опасность отходов путем преобразования загрязняющих веществ в менее растворимые, подвижные или токсичные формы (например, превращение четырёхвалентного хрома в трёхвалентный).

Химическая стабилизация основана на снижении подвижности загрязняющих веществ посредством физических или химических реакций с загрязняющим веществом, а не со структурой загрязняющих веществ (например, почвой или осадком), как это происходит при затвердевании. Подвижность органических и неорганических соединений может быть уменьшена с помощью различных реакций осаждения, комплексообразования и адсорбции.

Процесс капсулирования может быть осуществлен с использованием неорганических или полимерных связующих. Наиболее распространенными неорганическими связующими веществами являются портландцемент, пуццоланы (кремнеземные или глиноземистые

материалы, которые могут реагировать с гидроксидом кальция с образованием соединений с цементирующими свойствами) и смеси цемент/пुццолан.

Процесс капсулирования органических загрязнителей цементными составами является более сложным, чем обработка неорганических загрязнителей. Многие органические вещества мешают процессу гидратации и препятствуют отверждению цементного состава. К тому же в суровых климатических условиях России применение связующих веществ малоэффективно. Многократное замерзание и оттаивание, полученного таким способом материала, приводит к разрушению его структуры с последующим поступлением загрязняющих веществ в окружающую среду. Гораздо более широкое применение получило применение в качестве капсулирующего реагента негашеной строительной извести (Цхадая и др., 2010; Воробьева и др., 2013).

Большинство цементирующих процессов являются экзотермическими, и тепло, выделяемое в процессе отверждения, может испарять летучие компоненты нефти.

К основным недостаткам метода относится то, что загрязнения остаются в почве в почве, а не уничтожаются или удаляются. К тому же в результате внесения капсулирующего реагента объем обработанных отходов обычно значительно увеличивается.

Наиболее существенной проблемой при применении технологии капсулирования *in situ* для загрязненных почв является достижение полного и равномерного смешивания отверждающего реагента с загрязненной средой. Также долгосрочная эффективность метода капсулирования все еще не доказана.

Химическое окисление

Метод химического окисления при очистке почвы заключается в перемещении загрязнителя в более окисленное или благоприятное для окружающей среды состояние. Он предполагает использование

химических веществ для нейтрализации органических загрязнителей. Химические окислители, наиболее часто используемые на сегодняшний день, включают пероксид водорода, озон, диоксид хлора и перманганат калия. У каждого окислителя есть свои преимущества и недостатки, и, хотя они применимы к загрязнению почвы и некоторому загрязнению зоны источника, они применяются в основном для восстановления грунтовых вод (Huling, Pivetz, 2006).

Способ внесения окислителя зависит от глубины загрязнения, физического состояния окислителя (газ, жидкость, твердое вещество) и скорости его разложения. Экскаваторы, траншеекопатели и шнеки используются для внесения жидких и твердых окислителей в загрязненную почву или шлам. Жидкости могут доставляться также через скважины и траншеи.

Успешное применение определенного метода химической обработки на месте требует:

- эффективной химической реакции введенного химического вещества с загрязнителями с надлежащей скоростью и степенью;
- эффективного распределения реагентов по всей обрабатываемой зоне.

Основным препятствием для методов химической обработки *in situ* является доставка, распределение и массовый перенос химических веществ в подземную среду. Основная проблема химической промывки *in situ* – неопределенность многих процессов, которые будут происходить в подповерхностной среде (Siegristetal., 2001).

Электрокинетическая очистка

Электрокинетическая очистка почвы – это относительно новая технология, которая основывается на применении низко интенсивного постоянного тока через почву для отделения и извлечения тяжелых металлов, радионуклидов и органических загрязнителей из ненасыщенной почвы, шлама и отложений. Ток прикладывается к парам электродов,

которые устанавливаются в землю с каждой стороны загрязненной площадки. Во время электромиграции положительно заряженные химические вещества, такие как металлы, ионы аммония и некоторые органические соединения, движутся к катоду, а отрицательно заряженные химические вещества, такие как хлориды, цианиды, фтор, нитраты и отрицательно заряженные органические вещества, мигрируют к аноду. Электромиграция не требует адвективного потока поровой воды для перемещения химических веществ. В мелкозернистой почве электрический ток также вызывает электроосмос, который представляет собой электрически индуцированный гидравлический поток грунтовой или почвенной воды между электродами. Этот поток может нести нейтрально заряженные частицы с ним. Взвешенные, заряженные коллоиды и мицеллы также могут двигаться посредством электрокинетики в процессе электрофореза (Шевцова, 2003).

Для работы электрокинетики влажность почвы должна быть проводящей и достаточной для электромиграции, но, оптимально, не насыщенной. Эффективность удаления напрямую связана с растворимостью целевого загрязнителя (который может быть изменен с помощью поверхностно-активных веществ), его электрическим зарядом и его концентрацией относительно других ионов или загрязняющих веществ (Королёв, Романюха, 2006).

К неблагоприятным условиям в процессе очистки можно отнести почву с высокой катионообменной способностью, высокой буферной емкостью, высоким естественным содержанием органических веществ, минерализацией и очень низким содержанием влаги. Наличие подземных металлических конструкций или инженерных сетей также может отрицательно повлиять на эффективность технологии (Максимов и др., 2014).

Биовентиляция

Биовентиляция – это технология восстановления на месте, которая

использует местные микроорганизмы для биоразложения органических компонентов, адсорбированных на почвах в ненасыщенной зоне (Ступин, 2009). Доступность кислорода обычно контролирует скорость, с которой происходит аэробная биоремедиация *in situ*. Биовентиляция, которая сочетает вентиляцию почвы с биоремедиацией, часто является наиболее эффективным средством подачи кислорода в почву ненасыщенной зоны.

Были проведены лабораторные исследования обрабатываемости, которые показали, что биовентиляция может быть успешно применена к соединениям, начиная от легких углеводов, таких как бензин или дизельное топливо, и заканчивая более тяжелыми углеводородами, такими как мазут, а также другими летучими и полуметучими соединениями. Во многих случаях стимулирование биологической активности за счет добавления питательных веществ и влаги и оптимизации скоростей биовентиляции может привести к более значительному снижению загрязнения, чем одна только вентиляция (Lee и Swindoll, 1993).

В работе Leeson et al. (1993) исследовалось повышение эффективности биоремедиации нефтезагрязненных почв в холодном климате сочетанием биовентиляции с системой активного подогрева.

Основное преимущество обычного биовентилирования по сравнению с другими технологиями восстановления заключается в том, что это проверенная, экономически эффективная технология, которая способствует биологическому разложению углеводов нефти в почве в широком диапазоне условий участка.

Биовентиляция имеет широкое потенциальное применение, поскольку почвенные микроорганизмы способны разлагать большинство нефтепродуктов (включая бензин, топливо для реактивных двигателей, дизельное топливо и топочные масла) в аэробных условиях. Биовентиляционная технология имеет особое преимущество для почв, загрязненных малолетучими компонентами нефти, поскольку технологии, которые зависят от улетучивания, такие как экстракция почвенных паров,

имеют малую эффективность очистки таких почв.

Основные недостатки метода заключаются в том, что его можно применять только к загрязнению вадозной зоны, поддающемуся аэробной биodeградации (например, нефтяные углеводороды и хлорбензолы), и его эффективность ограничена на участках почвы с низкой воздухопроницаемостью и влажностью (USEPA, 1994).

Кроме того, особенности литологического строения, глубокие корневые зоны или антропоморфные особенности грунтов, могут направлять воздушный поток от загрязненных зон или ограничивать его.

Микробная биоремедиация

Биodeградация – это процесс, посредством которого микроорганизмы превращают или минерализуют органические загрязнители посредством метаболических или ферментативных процессов в менее вредные, неопасные вещества, которые затем включаются в естественные биогеохимические циклы (Калачникова, 1987). Биоремедиация представляет собой сложный процесс в клетках микроорганизмов, которые поглощают загрязняющие вещества, где, благодаря специфическим ферментам, происходит деградация загрязняющих веществ и их соответствующих метаболитов. Углеводороды нефти используются в качестве источника питательных веществ и энергии для роста микроорганизмов, и в то же время микроорганизмы разлагают их на нафтеновые кислоты, спирты, фенолы, гидропероксиды, карбонильные соединения, сложные эфиры и, в конечном итоге, на диоксид углерода и воду. Микроорганизмы могут происходить из самой загрязненной окружающей среды, или их можно культивировать из других районов. Этот процесс часто включает в себя манипулирование параметрами окружающей среды, чтобы стимулировать рост микроорганизмов и ускорять деградацию. Ограничение питательных веществ, малая популяция или отсутствие микробов со способностью к разложению, а также биодоступность загрязняющих веществ являются основными

факторами, которые могут влиять на эффективность биоремедиации.

В настоящее время можно выделить два основных направления биоремедиации почв (Янкевич, 2002; Aldrettetal, 1997):

- биостимуляция, которая предполагает стимулирование роста местных деградирующих микроорганизмов, путем внесения питательных веществ и других добавок.

- биоаугментация, включающая внесение бактерий, которые эффективно способствуют деградации нефти, к уже существующей микробной популяции;

Первое является более привлекательным из-за его низкой стоимости, минимального обслуживания и минимального воздействия на окружающую среду. Тем не менее, эта технология применима только в тех случаях, когда естественный уровень биodeградации выше, чем степень миграции загрязнения. Биостимуляция чаще используется в качестве дополнения к другим технологиям или после завершения инженерных работ по предотвращению миграции загрязнений с обрабатываемой территории. Биоаугментация применяется, когда необходимо выполнить очистку в течение короткого времени или когда уровень загрязнения превышает возможности самоочищения почвы.

Крупные аварийные разливы нефти в сочетании с ужесточением природоохранных требований стимулируют разработку и исследование бакпрепаратов – деструкторов нефти. В настоящее время выделено большое количество штаммов и видов бактерий, которые могут разлагать различные компоненты нефти и углеводородные соединения, представляющие наибольшую опасность для окружающей среды и здоровья человека.

Наиболее часто выделяемыми организмами в зонах углеводородного загрязнения являются гетеротрофные бактерии родов *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium* и *Nocardia*.

Виды *Pseudomonas*, по-видимому, являются наиболее распространенными и наиболее адаптируемыми к различным загрязнителям, тогда как виды *Corynebacterium* могут быть основными агентами для разложения гетероциклических соединений и углеводов в загрязненной водной среде (Салангинас, 2003; Курицын и др., 2011; Баландина, Еремченко, 2018).

Биоремедиация может применяться на месте, в почву непосредственно на месте загрязнения (*in situ*) или *ex situ*, на почве, которая была удалена с загрязненной области путем раскопок.

Хотя методы биоремедиации *in situ*, как правило, более предпочтительны, так как они подразумевают меньшие затраты и меньшее вмешательство в окружающую среду, они ограничены глубиной почвы, которую можно эффективно обрабатывать. Часто оптимальная диффузия кислорода в почве, которая является важным фактором успешного развития биodeградирующих микроорганизмов, возможна только для глубин до 0,3 м. Кроме того, на месте разлива требуется максимальное содержание 8% нефти в почве.

Методы *ex situ* включают выемку загрязненной почвы и помещение ее на непроницаемый барьер. Для этого требуется оборудование для проветривания, оборудование для обеспечения питательных веществ и, как правило, большой объем работы. Основными применимыми типами *ex situ* являются землевание, компостирование и биоочажки (*biopiles*).

На основании исследования литературных данных в области восстановления нефтезагрязнённых земель (Солнцева, 1998; Salanitro, 2001; Кирий и др., 2013) можно делать вывод, что основными факторами, которые необходимо учитывать при выборе подхода к биоремедиации, являются:

- тип загрязняющего углеводорода, общее количество нефтяных углеводородов в почве и «возраст» загрязнения;
- тип почвы, ее соленость, рН, температура и влажность;

- наличие питательных веществ (N, P, K), кислорода и микроэлементов в почве;
- наличие микробной популяции, способной деградировать загрязняющие вещества.

Биоремедиация загрязненной нефтью почвы зависит от времени загрязнения из-за процессов выветривания, которые снижают биодоступность загрязняющих веществ для микроорганизмов. Выветривание относится к результатам биологических, химических и физических процессов, которые могут влиять на тип углеводородов, которые остаются в почве (Loehr et al., 2001; Semple et al., 2003). Эти процессы усиливают сорбцию гидрофобных органических загрязнителей в почвенной матрице, снижая скорость и степень биodeградации. Кроме того, выветренная загрязненная нефтью почва обычно содержит фракцию соединений, состоящих в основном из высокомолекулярных углеводородов, которые не могут разлагаться местными микроорганизмами (Balba et al., 1998; Loehr et al., 2001).

Свежезагрязненная нефтью почва содержит большее количество насыщенных и алифатических углеводородов, которые наиболее подвержены микробной деградации. В то же время, в почве содержатся наиболее токсичные для аборигенных микроорганизмов соединения, что приводит к более длительному времени адаптации до разложения загрязнителя и даже к замедлению процесса биodeградации (Margesin et al., 2000; Loehr и др., 2001).

Температура почвенной среды является важнейшим фактором, определяющим скорость биодеструкции углеводородов, напрямую влияя на химический состав нефти, а также скорость биологических процессов в почве. Atlas (1975) установил, что при снижении температуры вязкость нефти и нефтепродуктов увеличивается, а летучесть токсичных низкомолекулярных углеводородов снижается, задерживая начало процесса биодеструкции. Температура также влияет на растворимость

углеводородов (Foghtetal, 1996).

Бактерии, участвующие в биодegradации органических загрязнителей, требуют среды с нейтральным pH, поэтому важно создать оптимальные условия в этом отношении. Например, если почва слишком кислотная, значение pH может быть увеличено добавлением извести.

Углеводороды легче деградируют в аэробных условиях, поэтому еще одним важным фактором является обеспечение достаточного количества кислорода в почве. Поэтому биоремедиация обычно применяется вместе с методами рыхления почвы.

Структура почвы может определять эффективность подачи воздуха, воды и питательных веществ, которые необходимы микроорганизмам. Поэтому, среди других материалов, вермикулит, солома или опилки могут быть добавлены в почву для улучшения ее структуры.

Соленость почвы может быть выражена с помощью электропроводности. Баланс между содержанием Na и $\text{Ca} + \text{Mg}$ в почве может быть скорректирован путем добавления гипса.

Микроорганизмы играют решающую роль в биоремедиации; поэтому их разнообразие, численность и структура сообществ в загрязненной среде позволяют понять судьбу любого метода биоремедиации при условии, что другие факторы окружающей среды, которые могут препятствовать деятельности микробов, поддерживаются в оптимальном диапазоне.

Технология биоремедиации имеет много преимуществ, таких как низкая стоимость, простота обработки на месте, экологичность, отсутствие вторичного загрязнения и удаление некоторых загрязняющих веществ с высокой эффективностью, привлекая много отечественных и зарубежных ученых. И хотя этот метод доказал свою эффективность, конкуренция между эндогенными и экзогенными микробными популяциями, риск внедрения патогенных организмов в окружающую среду и вероятность того, что инокулированные микроорганизмы могут не выжить в новой

среде, обуславливают необходимость дальнейшего изучения метода биоаугментации.

Фиторемедиация

Фиторемедиация – это технология *insitu*, основанная на синергетическом взаимодействии корней растений и почвенных микроорганизмов для разложения, переноса, дезактивации и фиксации загрязняющих соединений почвы и подземных вод (Cunningham et al., 1996; Синдиревасоавт., 2016). Основными тремя механизмами удаления загрязнений нефтью являются прямое поглощение, высвобождение секретов и ферментов, стимулирование микробной активности в области корней и усиление биологической трансформации.

Наиболее эффективна данная технология на участках с невысоким уровнем загрязнения органическими или металлическими соединениями, которые поддаются одному из пяти видов фиторемедиационных процессов: *фитотрансформация*, *ризосферная биоремедиация*, *фитостабилизация*, *фитоэкстракция* или *ризофильтрация* (Горшков, 2010; Киреева и др., 2011).

Фитотрансформация – это химическая модификация веществ окружающей среды как прямой результат метаболизма растений, часто приводящий к их инактивации, деградации (фитодеградации) или иммобилизации (фитостабилизации). В результате метаболизма некоторые растения могут осуществлять детоксикацию таких органических загрязнителей, как пестициды, взрывчатые вещества, растворители, промышленные химикаты и других ксенобиотических веществ. В других случаях микроорганизмы, живущие вместе с корнями растений, могут метаболизировать эти вещества в почве или воде. Эти сложные и трудноудаляемые соединения не могут быть расщеплены до основных молекул (вода, углекислый газ и т. д.) растениями, и, следовательно, термин «фитотрансформация» представляет изменение химической структуры без полного разрушения соединения. После поглощения

ксенобиотиков растительные ферменты увеличивают полярность ксенобиотиков путем добавления функциональных групп, таких как гидроксильные группы (Akenetal., 2010).

Ризосферная биоремедиация или ризодеградация – это усиленная биodeградация стойких органических загрязнителей корневыми бактериями и грибами под воздействием отдельных видов растений. Растительность может увеличить общее количество полезных грибов и бактерий в загрязненной почве от общего воздействия ризосферы. Кроме того, некоторые высвобождаемые из корня соединения обладают способностью индуцировать гены для ферментов, ответственных за микробный метаболизм стойких органических загрязнителей (Ступин, 2009).

Фитостабилизация – это снижение подвижности веществ в окружающей среде, например, путем ограничения вымывания веществ из почвы. Фитостабилизация направлена на долгосрочную стабилизацию и сдерживание загрязнения. Например, присутствие растений может уменьшить ветровую эрозию; или корни растения могут предотвратить водную эрозию, иммобилизовать загрязнители путем адсорбции или накопления и создать зону вокруг корней, где загрязняющее вещество может осаждаться и стабилизироваться. В отличие от фитоэкстракции, фитостабилизация фокусируется главным образом на секвестрации загрязняющих веществ в почве вблизи корней, но не в тканях растений. Загрязнители становятся менее биодоступными, а воздействие на животноводство, дикую природу и человека сокращаются (Akenetal., 2010).

Фитоэкстракция (или фитоаккумуляция) использует растения или водоросли для удаления загрязняющих веществ из почв, отложений или воды в биомассу растительного происхождения (организмы, которые берут большее количество загрязняющих веществ из почвы, называются гипераккумуляторами). Во время утилизации загрязняющие вещества обычно концентрируются в гораздо меньшем объеме растительного

вещества, чем в первоначально загрязненной почве или отложениях. Растения поглощают загрязняющие вещества через корневую систему и сохраняют их в корневой биомассе и/или транспортируют их в стебли и листья. Живое растение может продолжать поглощать загрязняющие вещества до тех пор, пока оно не будет собрано. После сбора урожая в почве останется более низкий уровень загрязнения, поэтому цикл выращивания/сбора урожая, как правило, должен повторяться через несколько культур для достижения значительной очистки. После этого очищенная почва может поддерживать другую растительность (Dietz, 2001).

Ризофилтрация относится к использованию корней растений для сорбции, концентрирования и осаждения металлических загрязнений из поверхностных или подземных вод. Корни растений способны сорбировать большие количества свинца и хрома из почвенной воды или из воды, которая проходит через корневую зону густо растущей растительности. Этот процесс очень похож на фитоэкстракцию в том, что он удаляет загрязняющие вещества, задерживая их в биомассе растений, которые можно собирать. (Dietz, 2001).

Фиторемедиация хорошо подходит для использования на очень больших полевых участках, где другие методы неэффективны или нерентабельны; на участках с низкими концентрациями загрязняющих веществ и в сочетании с другими технологиями, где растительность используется в качестве финального этапа восстановительных работ.

Несмотря на очевидные преимущества, технология фиторемедиации имеет и определенные недостатки. К ним относятся длительный период времени, который иногда требуется для очистки до уровней ниже допустимого, трудности с очисткой загрязнения глубиной более трех метров, возможное поглощение загрязняющих веществ в листья и выброс во время листопада, трудности с формированием растительности по причине высокой токсичности и возможная миграция загрязняющих

веществ за пределы участка под действием макропор или путем связывания с растворимыми экссудатами растений. Применение технологии ограничивается также растворимостью и доступностью поллютантов, а также степенью устойчивости растений к их воздействию, т.е. способностью выживать в неблагоприятных условиях загрязнения и наращивать биомассу и степень проективного покрытия (Коршунова, 2019).

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Природно-климатическая характеристика района исследования

Территория исследований располагается в районе северной лесостепи, климат умеренно теплый умеренно увлажнённый (Агроклиматические ресурсы Тюменской области, 1972). Климатические условия этой подзоны характеризуются благоприятными летними температурными условиями при меньшем количестве осадков. Водный режим здесь периодически промывной, и хотя почвы промерзают достаточно глубоко, но верховодки на автоморфных почвах не образуется или она кратковременна. Обусловлено это тем, что, во-первых, здесь почвообразующие породы имеют достаточно высокую водопроницаемость, поэтому при обильных осенних осадках почва не насыщается даже до полевой влагоемкости. Отсюда при их промерзании сплошной льдистости не образуется и талые воды даже через не оттаявший грунт частично по порам, ходам корней и трещинам проникают в глубь почвы (Волобуев, 1963), часть стекает по уклону местности. В годы с неглубоким промерзанием, затяжной и влажной весной промывной режим усиливается. Осенью лишь в исключительно влажные годы наблюдается глубокое проникновение влаги в почву. Сумма активных температур (выше 10°C) здесь достаточно высока, около 1900°C. Это определяет активное течение биологических процессов по всему профилю почв. Наличие травянистой растительности в сочетании с благоприятными температурными условиями и ограниченным увлажнением в летний период способствует формированию гумусовых веществ (Каретин, 1990).

Средняя скорость ветра района расположения исследуемого объекта приведена в таблице 1.

Таблица 1 – Средняя скорость ветра (м/сек)

Месяц	С	СВ	В	ЮВ	Ю	ЮЗ	З	СЗ
январь	2,5	2,2	2,5	3,4	3,8	3,9	3,8	3,4
июль	2,9	2,9	2,6	2,6	2,3	2,7	3,1	3,4

Среднегодовая температура воздуха составляет плюс 0,9 °С. Средняя многолетняя годовая температура воздуха плюс 0,3 °С, но в разные годы она колеблется от минус 18 °С до плюс 3,2 °С.

Следует отметить, что влияние климата на почвообразование глубоко и разнообразно, особенно в сочетании с другими меняющимися факторами почвообразования. Существенные коррективы на направление и интенсивность почвообразовательных процессов вносит цикличность климата, смена сухих и влажных циклов, что сказывается на режимах почв гидроморфного ряда, которые в подтайге и лесостепи значительно превосходят площади автоморфных почв (Каретин, 1990).

2.2. Характеристика почвы

Объектом исследования являются луговые почвы зоны северной лесостепи юга Тюменской области. Территория залегания исследуемых почв располагается в 30 км южнее г. Тюмени.

Луговые почвы занимают господствующее положение на водораздельных пространствах подтаежной и лесостепной зон Тобол-Ишимского междуречья. Они залегают самостоятельными крупными массивами, а также в сочетаниях и комплексах с чернозёмно-луговыми, лугово-болотными и торфяно-болотными почвами.

Луговые почвы распространены среди массивов черноземных почв и приурочены к лиманам, падам и другим понижениям рельефа на слабодренированных равнинах. Формируются они на лессовидных

породах под березовыми лесами паркового типа с хорошо развитым высокостебельным злаково-разнотравно-осоковым травяным покровом при постоянном увлажнении почвенно-грунтовыми водами разной степени минерализации, залегающими на глубине 1 – 3 м, и при затоплении пресными тальными водами местного стока в течение одной-трех недель весной. Уровень почвенно-грунтовых вод колеблется в зависимости от размеров паводка. При больших паводках он выше, при малых – ниже. В связи с этим луговые почвы имеют неустойчивый водный режим не только по сезонам, но и по годам. Сильное увлажнение весной с промыванием до грунтовой воды сменяется летом и осенью восходящими токами влаги от грунтовых вод. При продолжительных паводках происходит заболачивание почв, при непродолжительных – остепнение. Современный солевой профиль и свойства почв неустойчивы. В почвах преобладающее развитие получили дерновый и глеевый процессы (Почвы СССР, 1979).

Реакция среды в луговых почвах изменяется от слабокислой в верхней части профиля до слабощелочной в нижней, в солонцеватых – от слабощелочной в верхней и до щелочной в средней и нижней частях профиля (Каретин, 1982).

На луговых почвах, которые в подзоне подтайги занимают значительную площадь, господствуют парковые березовые леса почти без примесей осины. Травяной покров хорошо развит и представлен высокостебельными осоково-злаково-разнотравными ассоциациями. Береза низких бонитетов, коряжистая. (Каретин, 1990).

В результате изучения морфологических характеристик, в соответствии с классификацией Л.Н. Каретина, почва исследуемой территории была охарактеризована как Луговая выщелоченная среднemocная малогумусная среднесуглинистая. Почвообразующими породами являются покровные суглинки и глины.

Профиль исследуемой почвы представлен на рисунке 2.

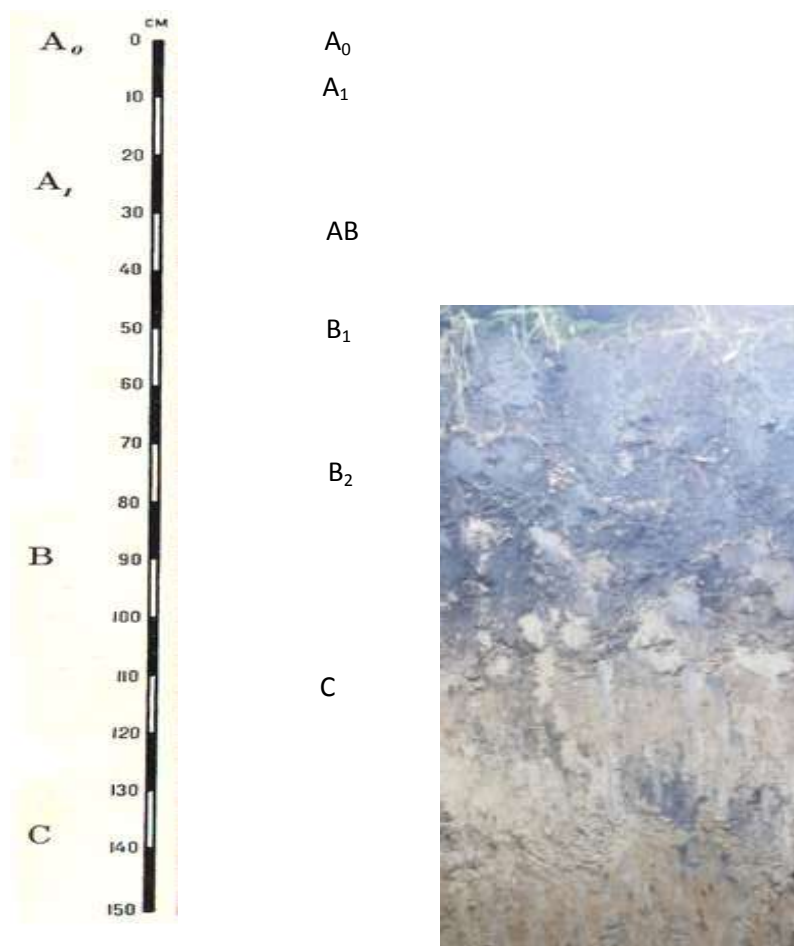


Рис. 2 – Почвенный профиль на исследуемом участке

Профиль почвы имеет следующее морфологическое строение:

A_0 гумусовый дерновый горизонт мощностью 0-3 см, черный, прочно связан мелкими корнями;

A_1 гумусово-аккумулятивный горизонт мощностью 3-33 см, черный, комковатый, плотный, среднесуглинистый, переход заметный;

AB переходный горизонт мощностью 33-50 см, буровато-темно-серый, комковатый, уплотнен, тяжелосуглинистый, переход заметный;

B_{1g} иллювиальный горизонт мощностью 50-73 см, сизовато-бурый с охристыми пятнами железа, комковатый, влажный, среднесуглинистый, встречаются единичные затеки гумуса, переход постепенный;

B_{2g} иллювиальный горизонт мощностью 73-110 см, сизовато-бурый с охристыми пятнами железа, комковатый, сырой, тяжелосуглинистый, переход постепенный;

С_{кг} почвообразующая порода мощностью 110-150 см, белесовато-буровато-сизый с включениями железа и карбоната кальция, комковатый, глинистый, мажется, стоит вода.

Содержание гумуса в луговых почвах колеблется от 4 до 9% и более. Распределение гумуса по профилю носит потеквидный характер, языки и карманы могут проникать до глубины 100 – 200 см. Луговые почвы плодородны, используются в сельском хозяйстве не только как естественные сенокосы, но и под посевы зерновых и овощных культур.

Результаты анализа агрохимических свойств исследуемой почвы приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Агрохимические показатели исследуемой почвы (2017 г.)

№ п/п	Показатель	Значение	Погрешность
1	Азот общий	0,14%	-
2	Водородный показатель pH	6,5 ед.	±0,1
3	Массовая доля органического вещества	6,08%	±1,2
4	Фосфор валовой	0,01%	-
5	Калий валовой	0,07%	-
6	Нитратный азот	менее 2,8 мг/кг	-
7	Подвижный фосфор	60,49 мг/кг	± 7,26
8	Подвижный калий	60,53 мг/кг	± 9,08

Результаты агрохимического анализа показали, что исследуемая почва характеризуется высоким содержанием гумуса 5-7%; содержание подвижного фосфора по методу Кирсанова среднее и варьирует в пределах 53-68 мг/кг; содержание калия низкое и составляет порядка 51-70 мг/кг; содержание нитратов менее 2,8 мг/кг. Реакция среды в верхней части профиля нейтральная рН_{KCl} 6,5. Фоновое содержание нефтепродуктов составляет 40 мг/кг.

2.3. Характеристика нефти

Одним из немаловажных факторов влияющих как на экологические последствия, так и на процесс биodeградации в окружающей среде является характеристика загрязнителя. Когда нефть попадает в окружающую среду, её соединения подвергаются физическим, химическим и биологическим изменениям, которые в совокупности называются выветриванием (Бабаев, Мовсумзаде, 2009; Кирий и др., 2014; Баландина и др., 2014). Степень разложения нефти при этих изменениях зависит от физических и химических свойств.

На территории юга Тюменской области располагается крупная сеть магистральных нефтепроводов, которые являются потенциальными источниками аварийных разливов нефти, поэтому в работе для исследований была взята нефть из магистрального нефтепровода Шаим-Тюмень. Данная нефть имеет плотность $838 - 854 \text{ кг/м}^3$, кинематическую вязкость 8,5 сСт и температуру застывания минус 14 °С. Также в нефти кроме основного продукта присутствуют механические примеси (не более 0,02 %), сера (не более 0,75 %) и хлористые соли (до 26 мг/дм^3).

2.4. Программа лабораторных и полевых экспериментов

Программа исследований включала три этапа: лабораторный, полевой мелкоделяночный эксперимент и вегетационный эксперимент по оценке фитотоксичности почвы.

Лабораторный этап включал исследования по выбору нефтедеструктора и микробиологические исследования по оценке эффективности применения различных мелиорантов.

2.4.1. Схема лабораторного эксперимента

Эксперимент был заложен в июне 2016 года и состоял из двух

основных этапов.

На первом этапе исследования проводились с целью обоснования выбора нефтеструктора. Для проведения экспериментов были взяты два биопрепарата:

1) «Дестройл» (ТУ 9291-022-13684916-2008)— широко распространенный в Западной Сибири препарат-нефтеструктор. Этот биологический препарат на основе *Acinetobacter sp.* представляет собой порошок или пасту, состоящие из клеток микроорганизма, обладающих углеводородоокисляющей активностью с концентрацией не менее 100000000 клеток в 1 грамме препарата, остатков питательной среды. Препарат, обладая высоко выраженной окисляющей активностью в отношении углеводов нефти и нефтепродуктов, переводит их в экологически нейтральные соединения, способствует ускорению рекультивации почвы.

Объектами применения могут быть загрязненные нефтью и нефтепродуктами грунтовые поверхности, водоемы, промстоки предприятий и т.д. Оптимальные условия нефтеокисляющего действия препарата: температура $24\pm 5^{\circ}\text{C}$, pH среды 6,0-8,0.

Применение препарата предусматривает оценку характера и количества загрязнения, выбор способа применения препарата и, при необходимости, приготовление рабочей суспензии препарата. Бактериальный штамм, положенный в основу бакпрепарата Дестройл, по заявлению производителя, не патогенен.

2) «Бак-Верад» (ТУ 9291-003-81279053-2014)—представляет собою ассоциацию бактерий, микробиологический реагент или биодеструктор нефтяных углеводов, предназначенный для экологически безопасной очистки почвенных покровов и водных объектов от загрязнения нефтяными углеводородами.

Биоценоз биопрепарата представлен отделами микрофлоры: *Bacillus*, *Atherobacter*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*.

В работах по рекультивации земель биопрепарат Бак-Верад должен применяться для биологической очистки почвы от нефтяного загрязнения на месте загрязнения или для рекультивации нефтешламов на специально оборудованных площадках. Допустимый pH среды в пределах 4 до 9 (оптимально нейтральный).

Температура окружающего воздуха +5 до +36 °C, оптимальная +10 до +36 °C. Если температура окружающего воздуха опускается ниже +5 °C, рост бактерий замедляется вплоть до полной остановки биологической активности, формирования спор и перехода в спящее состояние.

В ходе экспериментов в чашках Петри на поверхности воды создавалась нефтяная плёнка, после чего вносились биопрепараты в равном количестве. Оценка эффективности нефтедеструкции проводилась через 24 часа. В качестве критерия эффективности оценивалось изменение площади нефтяного пятна. Эксперименты проводились в трёхкратной повторности.

На втором этапе лабораторных экспериментов проводились микробиологические исследования по оценке эффективности применения различных мелиорантов.

При постановке эксперимента было взято 5 сосудов с луговой почвой. Почву загрязняли товарной нефти, тщательно перемешивали, затем в разные варианты вносили биопрепарат, известь, сорбент и гумат калия по схеме:

- 1) Контроль (с внесением нефти до 5% загрязнения);
- 2) Нефть + бакпрепарат (вариант П1);
- 3) Нефть + бакпрепарат + известь (вариант П2);
- 4) Нефть + бакпрепарат + известь + сорбент (вариант П3);
- 5) Нефть + бакпрепарат + известь + гумат калия (вариант П4).

При планировании опытов предполагался одинаковый уровень загрязнения нефтью всех исследуемых образцов, равный примерно 5,0 %

от массы почвы. В ходе эксперимента поддерживалась постоянная влажность почвы на уровне 25 %.

Количество внесенного бакпрепарата (Бак-Верад) определялось в соответствии с нормами расхода, определёнными производителем. Количество вносимой извести определялось в соответствии с рекомендациями Чижова Б.Е. (2000) и на основании кислотности солевой вытяжки исследуемой почвы. В качестве мелиорантов и для стимуляции углеводородокисляющих бактерий в почву вносились гумат калия и модифицированный вермикулит.

На протяжении опыта определяли общую численность микрофлоры и численность углеводородокисляющей микрофлоры (УОМ). Общую численность определяли посевом на мясопептонный агар (МПА), численность УОМ – на минеральную агаризованную среду Мюнца с 1 % нефти в качестве единственного источника углерода и энергии (Романенко, Кузнецов, 1974).

С определенной периодичностью из каждого опытного сосуда отбирали смешанный образец почвы. Из образца брали навеску почвы 1 г, вносили в пробирку со стерильным физраствором, добавляли каплю ТВИН-80 и энергично встряхивали в течение 1 минуты для разрушения почвенных комочков и десорбции микробных клеток с поверхности почвенных частиц. Затем взвесь отстаивали в течение 10 минут. Приготовленную взвесь последовательно разбавляли в 10, 100, 1000 и более раз (Звягинцев и др., 1980). На агаризованные среды в чашки Петри делали посев из кратных разведений, нанося на поверхность среды 0,1 мл жидкости и равномерно распределяя ее по поверхности агара стерильным шпателем. Чашки с посевами на МПА термостатировали при температуре 28-30°С в течение 3-5 суток, затем подсчитывали число колоний и описывали микробное разнообразие. На среде Мюнца учет вели на 7-10 сутки после посева, так как формирование колоний на ней происходит дольше, вследствие бедного состава среды. Содержание микрофлоры в

почве выражали в тысячах или миллионах колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 г воздушно-сухой почвы.

Пересчет на воздушно-сухую почву делали для адекватного сравнения образцов с разной влажностью.

Влажность определяли параллельно в день посева. Навеску почвы 10-15 г того же образца высушивали при 85-90°C до постоянного веса, затем по разнице веса делали расчет влажности почвы.

Частичное определение таксономической принадлежности микроорганизмов делали на основе описания внешнего вида колоний и микроскопических особенностей клетки, используя определитель Берджи.

2.4.2. Схема полевого эксперимента

Полевой мелкоделяночный эксперимент проводился в двух направлениях: первое заключалось в постановке модельного эксперимента с исследованием процессов естественного самоочищения нефтезагрязненной почвы (опыт проведен в 2016 – 2019 гг.), а второе – в применении технологии биоремедиации (опыт проведен в 2017 – 2019 гг.).

На втором этапе проведен мелкоделяночный полевой эксперимент по изучению методов биоремедиации по схеме, аналогичной лабораторным микробиологическим исследованиям в четырёхкратной повторности. Реперные участки размерами 1×1 м были предварительно подготовлены: удалена растительность и проведено дискование. На подготовленные участки нефть и рабочие водные суспензии биопрепаратов были внесены в почву методом дождевания и проведено рыхление для равномерного распределения их в верхнем слое (20 см).

При планировании опытов предполагался одинаковый уровень загрязнения нефтью на всех исследуемых площадках, равный примерно 5,0% от массы почвы. Дозу нефти для загрязнения рассчитывали с учетом плотности сложения почвы и плотности нефти на глубину промачивания 20 см. Эти дозы составили для луговой почвы 5,0 л/м². Количество,

внесенного бакпрепарата определялось в соответствии с нормами расхода, определёнными производителем и составило 0,03 л на один участок. Препарат разбавлялся водой из природного источника, таким образом, и в таком соотношении, чтобы полученный раствор равномерно орошал весь запланированный объём. Количество вносимой извести определялось в соответствии с рекомендациями Чижова Б.Е. (2000) и на основании кислотности солевой вытяжки исследуемой почвы. Норма составила 0,1 кг/м². Сорбент С-Верад (модифицированный вермикулит) вносился в количестве 0,1 кг на 1 м². Количество гумата калия составило 30 мл/м², разведённых в соотношении 1:300 с водой.

Контролем являлась нефтезагрязненная почва без применения добавок.

Отбор проб производился дважды за вегетационный период с 2017 по 2019 гг. Кроме того, в первый год эксперимента отбор образцов почвы для определения содержания нефтепродуктов производился через 7, 12, 25 и 40 суток после начала эксперимента (рис. 3).

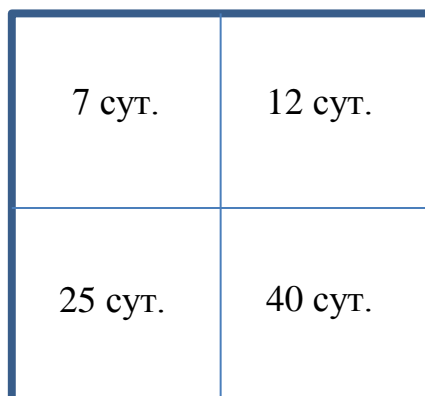


Рис.3 – Схема отбора проб в первый год эксперимента

Отобранные образцы исследовались на остаточное содержание нефтепродуктов, а также агрохимические показатели: рН, азот, фосфор, калий, массовая доля органического вещества.

В вегетационном опыте для оценки фитотоксичности почвы в

качестве тест-объекта применялась рожь озимая (*Secale cereale* L.). Основными параметрами, которые оценивались в процессе биотестирования на фитотоксичность, были фитомасса, всхожесть и энергия прорастания семян.

2.5. Методы исследований

2.5.1. Отбор проб и подготовка почвенных образцов

Отбор проб осуществлялся на основании ГОСТ 17.4.4.02-2017 «Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа».

Для исследования агрохимических свойств почвы образцы отбирались из пахотного слоя на глубину 0-20 см. Масса смешанных образцов составляла 1 кг.

Для исследования на нефтепродукты точечные пробы отбирались послойно с глубины 0-20 и 20-40 см массой не более 200 г каждая.

Точечные пробы отбирались с каждого участка методом конверта при помощи шпателя и почвенного бура Качинского. Объединенная проба формировалась путем смешивания точечных проб, отобранных на каждой пробной площадке.

Пробы, отобранные почвы для химического анализа высушивали до воздушно-сухого состояния по ГОСТ 5180. Воздушно-сухие пробы хранились в матерчатых мешочках.

2.5.2. Методы оценки агрохимических и микробиологических показателей

Агрохимические показатели определялись в соответствии с общепринятыми методиками:

1. Общий азот – ГОСТ 26107-84. Почвы. Методы определения.
2. Нитратный азот определялся ионометрическим методом по ГОСТ

26951-86.

3. Обменный аммоний по методу ЦИНАО (ГОСТ 2626489-85)
4. pH солевой вытяжки по методу ЦИНАО (ГОСТ 26483-85).
5. Массовая доля органического вещества по методу Тюрина в модификации ЦИНАО (ГОСТ 26213-91).
6. Содержание валовых форм фосфора и калия определялись по ГОСТ 26261-84.
7. Подвижные соединения фосфора и калия определялись по методу Чирикова в модификации ЦИНАО (ГОСТ 26204-91).
8. Анализ содержания нефтепродуктов проводился флуориметрическим методом измерения массовой доли нефтепродуктов в почве с помощью «Флюората-02м» (ПНД Ф 16.1:2.21–98).
9. Микробиологические исследования проводились в аккредитованной лаборатории по рекомендациям, разработанным В.И. Романенко, С.И. Кузнецов (1974) и Д.Г. Звягинцевым и др. (1980).
10. Оценка всхожести и энергии прорастания проводилась в соответствии с ГОСТ 12038-84.

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью программы MathCAD 15. Для проверки статистически значимых различий между выборками использовался t -критерий Стьюдента.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОПРЕПАРАТА

3.1. Обоснование выбора биопрепарата

Для более интенсивного восстановления нефтезагрязненных почв не достаточна активизация местной микрофлоры и применение сорбентов, необходимо применение биопрепаратов способных в короткие сроки снизить концентрацию нефти в почве. Сейчас производители предлагают довольно большое количество современных биопрепаратов активно разлагающих нефть. Для определения эффективности работы биопрепаратов был проведен лабораторный эксперимент по изучению работы биопрепаратов «Дестройл» и «Бак-Верад».

Для постановки опыта использовалась нефть из нефтепровода Тюмень-Шаим, биопрепараты Дестройл и Бак-Верад, чашки Петри. В шесть чашек Петри было добавлено по 4 мл дистиллированной воды, затем в центр чашки Петри с дистиллированной водой было добавлено 0,002 мл нефти (одна капля). После этого в первые три чашки Петри был внесен препарат Дестройл в следующем объеме: в чашку Петри №1 – 0,002 мл; в чашку Петри №2 – 0,025 мл и в чашку Петри №3 – 0,050 мл. Аналогичным образом был внесен Бак-Верад, с нумерацией чашек Петри последовательно №4, №5 и №6 (рис. 4).

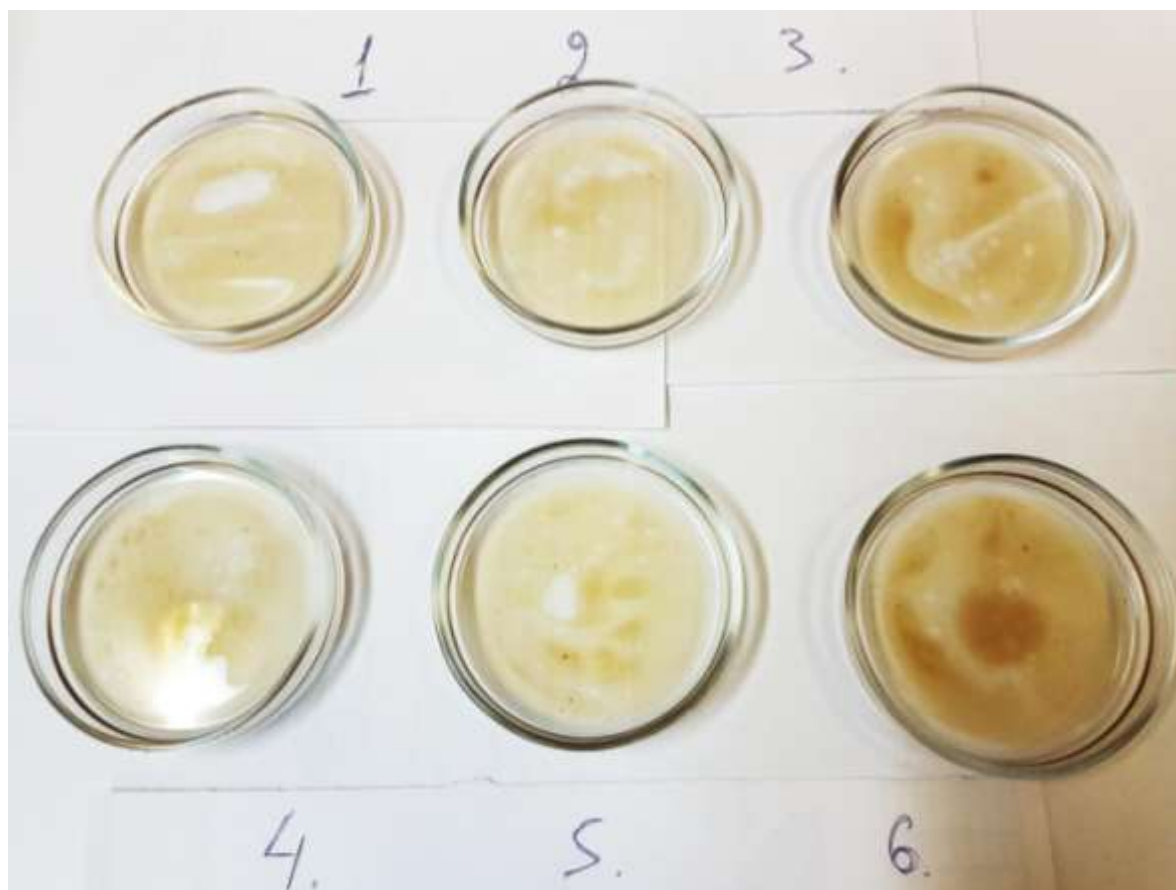


Рис. 4 – Начало эксперимента с применением биопрепаратов Дестройл и Бак-Верад

Через 24 часа после постановки эксперимента визуально была установлена эффективность работы биопрепаратов (рис. 5). Результаты эксперимента, проведенного в трёхкратной повторности, показали большее (в 2,04 раза) снижение площади нефтяного пятна с Бак-Верадом ($11,16 \text{ см}^2$), чем Дестройлом ($5,46 \text{ см}^2$), на основании чего был выбран препарат «Бак-Верад» для проведения дальнейших исследований.

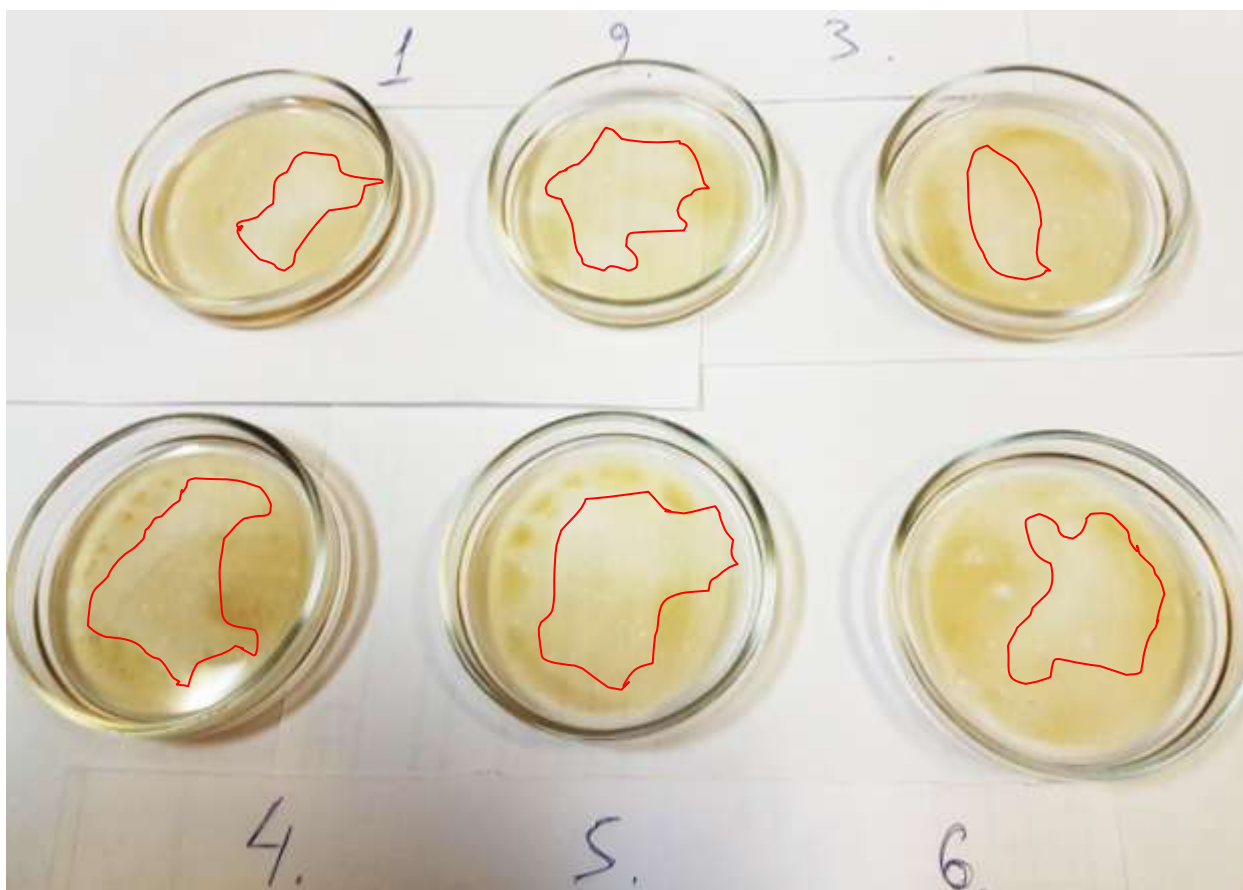


Рис 5 – Результаты применением биопрепаратов Дестройл и Бак-Верад через 24 после начала эксперимента

Для подтверждения полученных данных был проведен еще один эксперимент, который заключался в том, что в чашке Петри сформировали два пятна нефти (две капли нефти на каждое пятно, примерно по 0,004 мл) в которые были добавлены биопрепараты Дестройл и Бак-Верад примерно по 0,01 мл. Через 24 часа провели визуальный осмотр. В результате данные полученные при первом эксперименте подтвердились (рис. 6), также была отмечена более эффективная работа биопрепарата Бак-Верад. Визуально отмечается большее осветление пятна, сам эпицентр внесенных бактерий на несколько тонов светлее, чем у биопрепарата Дестройл.



Рис. 6 – Результаты применением биопрепаратов Дестройл и Бак-Верадна
пятнах нефти через 24 после начала эксперимента

Таким образом, можно сделать вывод о более высокой эффективности деструкции нефти Бак-Верадом по отношению к биопрепарату Дестройл.

3.2. Микробиологические исследования эффективности применения схем биоремедиации

3.2.1. Микрофлора биопрепарата

Из жидкого биопрепарата на МПА высевалась микрофлора численностью порядка 35-40 млн. КОЕ/см³. Всего высевалось 5-6 культур (Рисунок 7), наиболее внешне опознаваемыми были три культуры родов *Bacillus*, *Rhodococcus* и *Pseudomonas*, описание которых представлено в таблице 3.

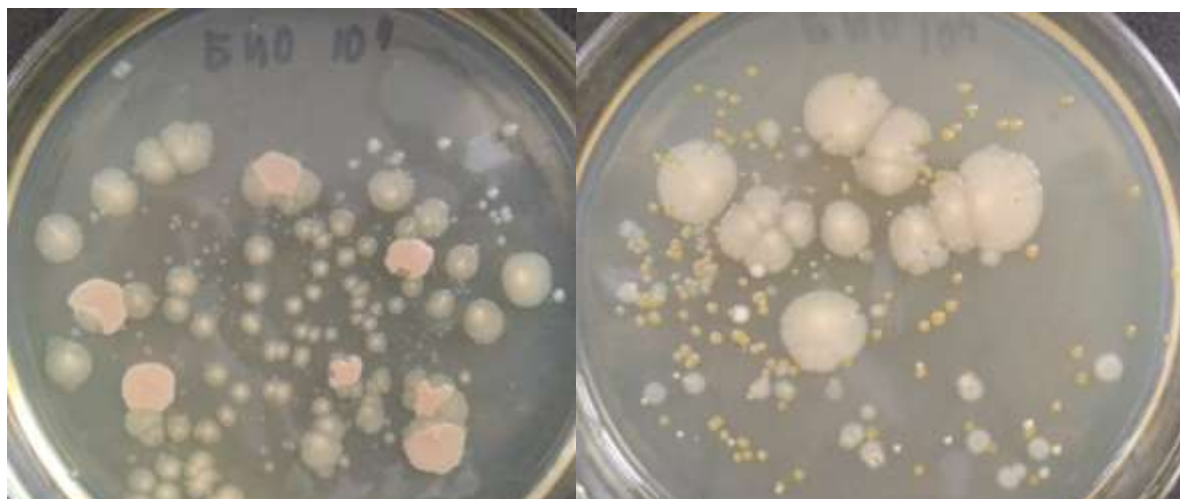





Рис. 7 – Общий вид микрофлоры жидкого биопрепарата при высевах на МПА

Таблица 3 – Описание наиболее характерных культур биопрепарата

Номер культуры	№ 1 (Bacillus)	№ 2 (Rhodococcus)	№ 3 (Pseudomonas)
Численность в биопрепарате, млн КОЕ/см ³	1,3-4,0	0,7	10-21
Описание колонии	Крупные серовато-белые полупрозрачные блестящие плоские колонии с волнистым краем, слизистой консистенции	Крупные светло-розовые или кремовые непрозрачные блестящие плоские округлые колонии с неровным краем, кремовой консистенции	Мелкие желтые непрозрачные блестящие выпуклые круглые колонии, с ровным краем, кремовой консистенции
Фото колоний			
Описание клеток	Мелкие неподвижные неспорообразующие палочки, одиночные или сдвоенные	Крупные прямые спорообразующие неподвижные палочки	Мелкие неподвижные неспорообразующие, либо короткие палочки, либо сдвоенные кокки

Остальные бактерии биопрепарата имели плохо узнаваемые колонии, внешне неотличимые от микрофлоры исходной почвы – грязно-белые округлые среднего размера, поэтому определить их динамику численности в почве отдельно от аборигенной микрофлоры не представлялось возможным.

3.2.2. Микрофлора исследуемых образцов почвы

Аммонифицирующая микрофлора исходной почвы, до внесения нефти и биопрепарата, насчитывала около 440 млн. КОЕ/г и была представлена в основном вегетативными формами родов *Arthrobacter* и подвижными неспорообразующими палочками нескольких видов, а также небольшим количеством бактерий родов *Micrococcus* и *Rhodococcus*. В количестве 10-16 млн. КОЕ/г почвы присутствовали несколько видов спорообразующих бактерий рода *Bacillus*. Микромицеты и актиномицеты на МПА не выявлены (рисунок 8).



Рисунок 8 – Общий вид микрофлоры исходной почвы при посевах на МПА

На протяжении опыта менялась как численность почвенной микрофлоры, так соотношение видов в ней и содержание бактерий, внесенных с биопрепаратом (рисунок 9, Приложение 1).

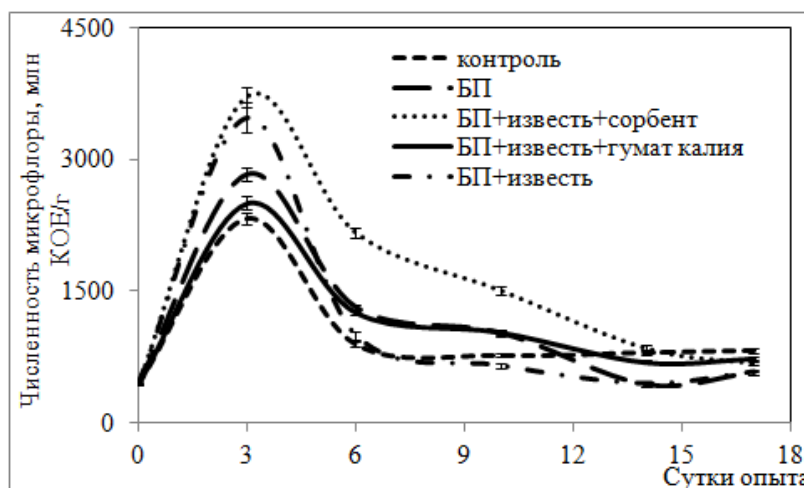


Рисунок 9 – Влияние мелиорантов разного состава на динамику численности микрофлоры при биодegradации нефтезагрязнения в луговой почве

Динамика роста микрофлоры во всех вариантах опыта представляла собой классическую S-образную кривую с экспоненциальной фазой до 3 суток, снижением численности после 6 суток и выходом на плато на 10-14 сутки. Рост общего количества микрофлоры отмечен сразу после внесения нефти и мелиорантов, без периода адаптации (либо этот период был пропущен и пришелся на 1-2 сутки). С 0,5 млрд КОЕ/г в начале эксперимента за 3 суток численность достигла 2,3-3,7 млрд КОЕ/г в разных вариантах. Такой активный рост может объясняться тем, что луговая почва обладает высоким потенциалом самовосстановления: высоким содержанием гуминовых веществ и многочисленной почвенной микрофлорой, способной, со временем, утилизировать 5 % нефтяное загрязнение самостоятельно. С 6 суток отмечено снижение численности. Такая закономерность была общей как в контроле, так и в опытных вариантах, однако для варианта с биопрепаратом, сорбентом и известью отмечена устойчивая повышенная численность почти на всем протяжении опыта. В варианте с биопрепаратом, а также при его сочетании с известью и гуматом калия, численность микрофлоры ненамного превышала контрольную, а к концу опыта разница между вариантами сглаживалась.

Оценка численности трех культур, внесенных с биопрепаратом, показал их разное поведение в почве (Рисунок 10, Приложение 2). Культура № 1 (*Bacillus*), содержащаяся в биопрепарате в количестве 1,3-4,0 млн. КОЕ/см³, менялась параллельно с общей численностью микрофлоры: размножалась на 3-6 сутки опыта, затем либо снижала численность в 3-20 раз, как в варианте № 2 (только биопрепарат в качестве мелиоранта), либо оказывалась за пределами обнаружения, как в вариантах №№ 3, 4 и 5.

Культура № 2 (*Rhodococcus*) была малочисленной в жидком биопрепарате (0,7 млн. КОЕ/см³). Ее содержание в ходе опыта было максимальным на 3-6 сутки, затем снижалось в вариантах с добавлением извести, сорбента и гумата калия, лишь в варианте с биопрепаратом без добавок возрастало на 10-17 сутки опыта.

Численность культуры № 3 (*Pseudomonas*) в разных вариантах менялось различно: при добавлении извести и извести с гуматом калия росла до 10 суток, затем снижалась. В опыте только с биопрепаратом - менялось несколько раз скачкообразно, при добавлении извести и сорбента возрастала к концу эксперимента. Возможно, вместе с культурой № 3 из биопрепарата была учтена почвенная микрофлора со сходного вида колониями, так как желтопигментные бактерии встречаются в почвах.

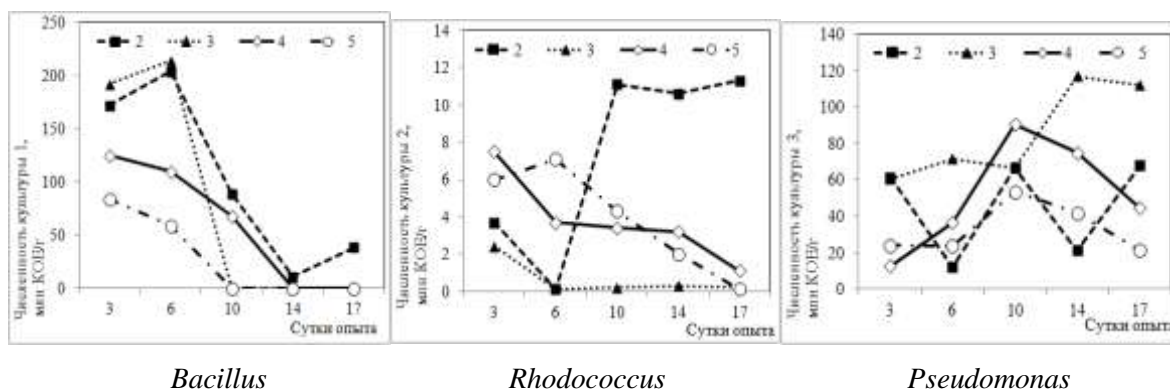


Рисунок 10 – Изменение численности трех культур из биопрепарата в разных вариантах опыта: 2 – биопрепарат, 3 –биопрепарат + известь + сорбент, 4 – биопрепарат + известь + гумат калия, 5 –биопрепарат + известь

Динамика численности углеводородокисляющей микрофлоры на среде Мюнца также представляла собой S-образную кривую с периодом экспоненциального роста с 0 до 3-6 суток и последующим плавным отмиранием культуры (Рис. 11, Приложение 3). Однако для каждого варианта были свои закономерности: аборигенная углеводородокисляющая микрофлора в контроле имела сглаженную форму кривой с двумя максимумами на 3 и 14 сутки. В варианте с биопрепаратом без добавок кривая численности УОМ имела 3 максимума – на 3, 10 и 17 сутки. Численность УОМ в вариантах с добавлением сорбента и извести либо только извести не превышала контрольные данные на всем протяжении опыта. Значимо отличался вариант с добавлением извести и гумата калия, в котором численность УОМ была в 2-3 раза выше, чем в других вариантах.

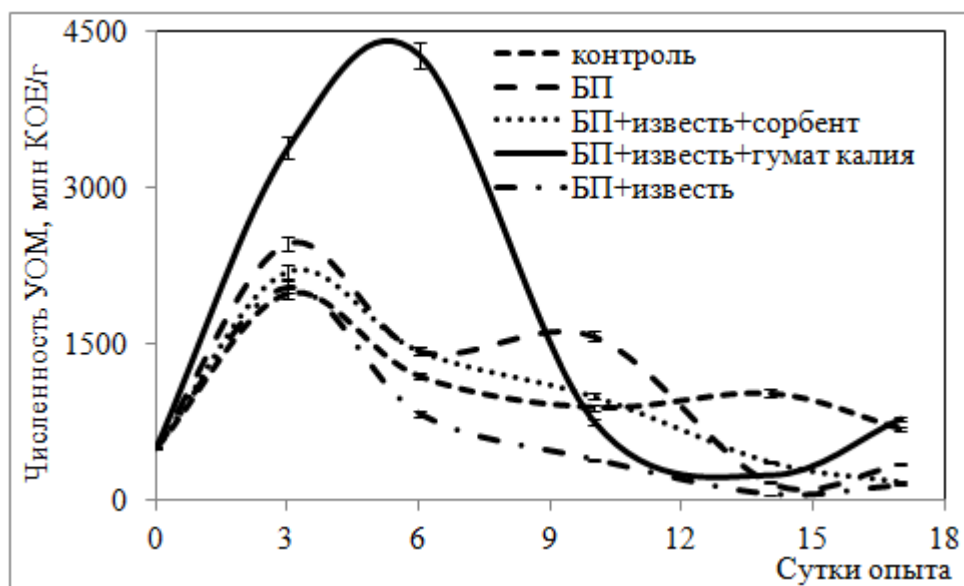


Рис. 11 – Динамика численности углеводородокисляющей микрофлоры при биодegradации нефтезагрязнения в луговой почве

Таким образом, наиболее активный рост почвенной микрофлоры отмечен в вариантах с добавлением жидкого биопрепарата, извести и сорбента либо гумата калия. Максимальной численности микрофлора

луговой почвы достигала на 3-6 сутки после внесения нефти и мелиорантов. Микрофлора биопрепарата относительно аборигенной микрофлоры была сравнительно немногочисленна – 6-15 %, в ряде случаев элиминировала к середине эксперимента.

3.3. Полевые исследования естественных процессов трансформации нефтезагрязнения в луговых почвах

Исследование проводилось с целью изучения процессов естественного самоочищения нефтезагрязненной луговой почвы юга Тюменской области в течение трехлетнего периода на искусственно созданных нефтеразливах. Реперные участки были заложены в 30 км к югу от г. Тюмени Российской Федерации.

Для эксперимента были выделены участки с размерами 1×1 м, представленные на рисунке 12. На площадках была проведена предварительная подготовка, которая заключалась в определении границ участков и удалении надземной части растительного покрова.

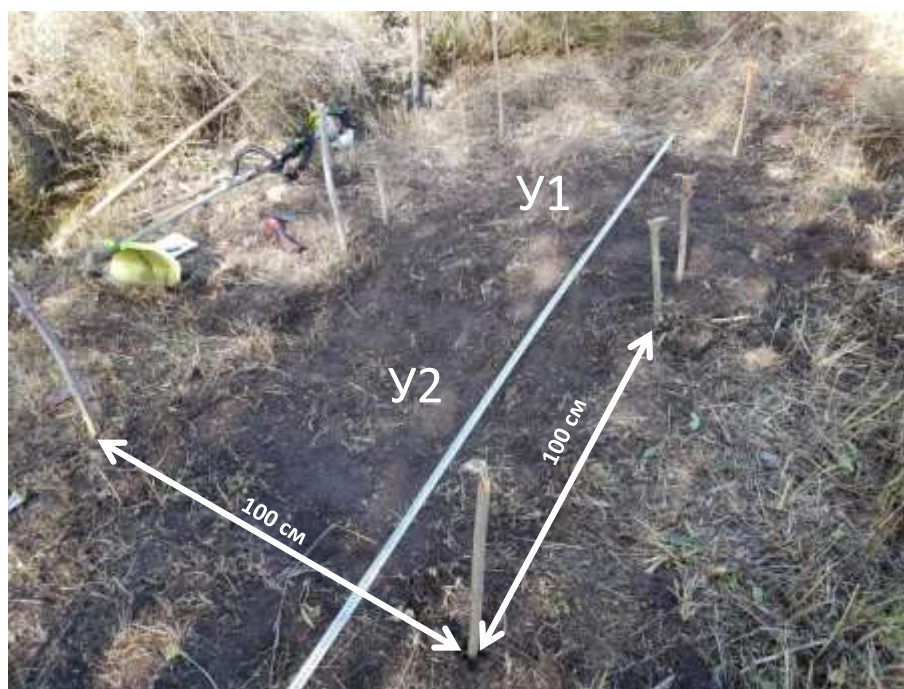


Рис. 12 – Определение границ и размеров реперных участков

На реперных участках площадью 1 м² каждый были смоделированы разливы товарной нефти в количестве 10 (вариант У1) и 20 (вариант У2) л/м², взятой с магистрального нефтепровода Шаим-Тюмень. Опыт был заложен в четырёхкратной повторности. После полного просачивания нефти, участки были огорожены.

Для лабораторных исследований на реперных участках в течение четырех лет проводился отбор почвенных образцов при помощи почвенного бура Качинского. Образцы почвы отбирались с участков ежегодно, с контрольным образцом на незагрязненной площадке. Пробы отбирались с двух горизонтов: 0-20 и 20-40 см.

Для прогнозирования степени воздействия возможных аварийных разливов нефти на компоненты природной среды, а в особенности на почву, являющуюся промежуточной средой между наземной и водной, необходимо изучать механизмы фильтрации нефти в ней. Загрязнение почвы неизбежно приведет к загрязнению сопредельных сред.

В начале постановки эксперимента визуально отмечалась гибель растительности, появился стойкий характерный нефтяной запах, изменился цвет почвы. Данные изменения сохранялись на протяжении нескольких дней, что связано с интенсивным испарением легкой фракции углеводородов. Через семь дней после начала эксперимента были отобраны образцы почвы для лабораторных исследований, и произведена фотофиксация.

В начале постановки эксперимента визуально отмечалась гибель растительности, появился стойкий характерный нефтяной запах, изменился цвет почвы, при отборе образцов на буре остается четкое маслянистое пятно, примерно до глубины 35-40 см.

Данные лабораторных исследований показывают приблизительно одинаковое содержание нефтепродуктов на участках У1 и У2, при том что объем разлитой нефти отличается в 2 раза (10 и 20 л/м²). Эти результаты можно объяснить сорбционными свойствами данного типа почв, и, по всей

видимости, они позволяют судить о процессах миграции, происходящих при разливах нефти. В данном случае можно сделать вывод, что скорость горизонтальной миграции нефти значительно выше вертикальной, так как площадь пятна разлива на участке У1 больше чем на участке У2.

Полученные значения концентрации нефтепродуктов в отобранных образцах соответствуют среднему уровню загрязнения (600-40000 мг/кг) по классификации Пиковского (2003).

Следующий этап наблюдений проходил через год после проведения первых исследований. На месте разлива участка У1 по-прежнему отсутствует растительность (рис. 13а), что говорит о том, что процессы самовосстановления почвы угнетены в долгосрочном периоде. Наблюдается стойкий запах углеводородов, почва имеет четкие границы нефтеразлива.



Рис. 13 –Застарелая модель нефтеразлива на реперных участках (через год после начала эксперимента)

Результаты анализа образцов почвы (таблица 4) показывают незначительное снижение остаточного содержания нефтепродуктов через год после начала эксперимента: 28,5-28,8 % в верхнем слое и 12,3-13,9 % в нижнем. Снижение остаточного содержания нефтепродуктов, по всей видимости, связано с процессами физико-химического выветривания. Эти результаты подтверждают то, что естественной микрофлоре необходимо

значительное время для адаптации к ксенобиотику. В нижнем горизонте (20-40 см) степень биодеструкции нефти ниже, чем в верхнем, что связано с формированием условий близких к анаэробным. Результаты экспериментальных исследований В.В. Головина (2006) также показали низкую скорость трансформации нефтяных углеводородов в луговых почвах.

Таблица 4 – Содержание нефтепродуктов в почве за весь период эксперимента, г/кг

Год эксперимента	ВариантУ1		ВариантУ2	
	0 – 20 см	20 – 40 см	0 – 20 см	20 – 40 см
2016	39,13±1,35	20,91±0,35	37,65±0,93	18,28±0,50
2017	27,98±0,78	18,35±0,14	26,80±0,34	15,75±0,20
2018	13,23±0,36	10,33±0,29	9,85±0,37	10,12±0,22
2019	5,47±0,20	3,58±0,14	3,22±0,10	2,38±0,13
НСР ₀₅	2,49	0,77	1,64	0,91

Динамика снижения концентрации углеводородов нефти в почвах во времени описывается уравнениями:

а) для варианта У1:

$$C_{t_{0-20}} = 846,5x^2 - 3E+06x + 3E+09; R^2 = 0,9917;$$

$$C_{t_{20-40}} = -1046,3x^2 + 4E+06x - 4E+09; R^2 = 0,9879;$$

б) для варианта У2:

$$C_{t_{0-20}} = 1055,5x^2 - 4E+06x + 4E+09; R^2 = 0,9818;$$

$$C_{t_{20-40}} = -1300,8x^2 + 5E+06x - 5E+09; R^2 = 0,9997;$$

где C_t – концентрация углеводородов нефти в почвах во времени для различной глубины, г/кг;

t – время, год;

R^2 – величина достоверности аппроксимации.

Основное снижение остаточного содержания нефтепродуктов на исследуемых участках произошло в 2018 и 2019 годах. К концу

вегетационного периода 2018 г. степень нефтеструкции составила в среднем 66,2 % в вариантеУ1 и 73,8 % в вариантеУ2. На конец эксперимента общее снижение составило в среднем 86,0 и 91,5 % для вариантовУ1 и У2 соответственно. В нижних горизонтах динамика снижения нефтепродуктов отличалась большей инерционностью в сравнении с верхними, что отражено на рисунке 14.

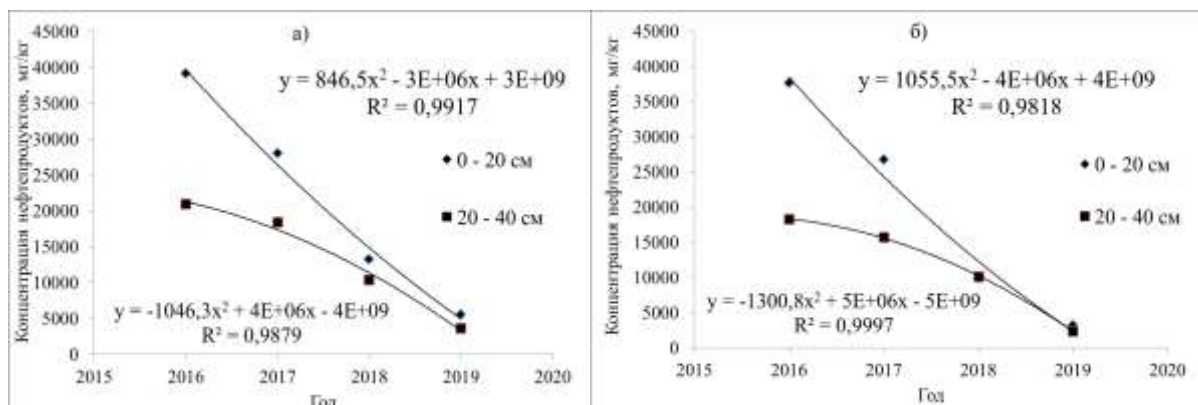


Рис. 14 – Динамика снижения остаточного содержания нефтепродуктов в процессе естественного самоочищения исследуемых почв на различной глубине: а) вариантУ1; б) вариантУ2

Результаты исследования показывают, что процесс естественного восстановления загрязненных нефтью луговых почв длителен и ставит вопрос о создании и внедрении современных технологий восстановления нарушенных территорий. Главным критерием эффективности ремедиационных мероприятий принято считать скорость разложения компонентов загрязнения с наименьшими экономическими затратами (Фахрутдинов и др., 2001).

3.4. Полевые исследования биodeградации нефтезагрязнения в луговых почвах в процессе биоремедиации

Биоремедиация – экологически чистая технология, в которой микроорганизмы используются для разложения загрязнителей окружающей среды до менее токсичных форм (Andreoni, Gianfreda, 2007; Watanabe, 2001; Robles-Gonzalez et al., 2008). Целью биоремедиации является минерализация органических загрязнителей в углекислый газ и воду, которые являются безвредными метаболитами (Seo et al., 2009). Биоремедиация представляет собой методику очистки от загрязнения путем усиления тех же процессов биodeградации, которые происходят в природе (Lakshmi et al., 2013).

Не смотря на то, что естественный процесс самоочищения почвы имеет некоторые преимущества над методами биоаугментации, при высоких уровнях загрязнения и низкой численности местных деградирующих микроорганизмов этот процесс может занять много времени либо вообще прекращаться (Yu et al., 2005; Плешакова, 2011). Также, на недавно образовавшихся нефтеразливах, естественной микрофлоре необходимо время для адаптации к ксенобиоту. Bento et al. (2003) при изучении эффективности биodeградации углеводородов нефти в почве, свежезагрязнённой дизельным топливом, отмечали, что природное самоочищение и биостимуляция значительно уступали по эффективности методам биоаугментации.

Исследование процесса биоремедиации, проведённого на нефтезагрязнённых луговых почвах, показало снижение остаточного содержания нефтепродуктов до 95 %. В первый год эксперимента отмечается большая потеря углеводородов в течение первой недели после начала опыта – от 15,60 до 43,08 % (таблица 5). Помимо положительного эффекта от действия от применяемых опытных вариантов, на начальном этапе значительную роль играют процессы улетучивания легких фракций

нефти, которым также способствовало проведенное рыхление почвы. Важная роль процессов улетучивания легких фракций нефти подтверждается в работах других авторов (Глазовская, Пиковский, 1980; Fingas, 1995).

Таблица 5 – Количество нефтепродуктов в почве исследуемых участков в течение первого сезона экспериментов, г/кг

Участки	Начало эксперимента	7 дней	12 дней	25 дней	40 дней
Контроль (нефтезагрязненная почва)	9,09	7,67	7,22	6,71	5,67
П1 (биопрепарат)	8,97	6,75	5,13	4,55	3,18
П2(биопрепарат+известь)	8,90	6,83	6,13	5,73	4,52
П3 (биопрепарат+известь+сорбент)	9,06	5,28	5,01	4,45	2,91
П4 (биопрепарат+известь+гумат калия)	8,87	5,25	5,11	4,05	3,66
НСР ₀₅	0,48	0,52	0,52	0,71	0,44

Основное различие между изучаемыми методами биоремедиации имело место в течение следующих 5 недель, когда биостимуляция приводила к значительному снижению нефтепродуктов (рис.15).

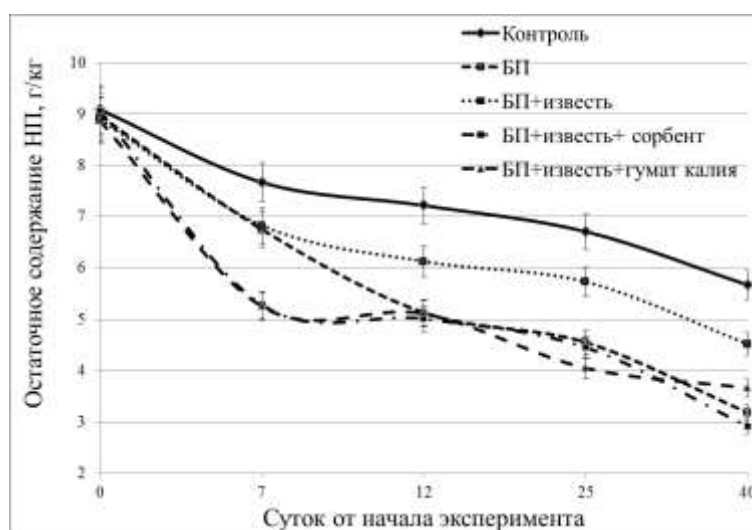


Рис.15 – Изменение остаточного содержания нефтепродуктов в почве исследуемых участков в первый год эксперимента

К концу первого сезона вегетации убыль углеводов составила в среднем 70,82 % – в вариантах ПЗ, 64,55 % – П1, 58,79 % – на П4 и 49,19 % – на площадках П2. На контрольной площадке снижение составило лишь 37,36%. Эти результаты значительно выше результатов, полученных в работе Гамзаевой (2019), где максимальная эффективность работы биопрепарата Бак-Верад в сочетании с фиторемедиацией составила 31 % в течение 12 месяцев в лабораторных условиях.

Сводные данные по снижению нефтепродуктов в луговых почвах на протяжении всего периода исследований приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Содержание НП в почве исследуемых участков, г/кг

Варианты	Начало эксперимента (июнь 2017 г.)	Конец вегетации			Снижение содержания нефтепродуктов, %
		2017 г.	2018 г.	2019 г.	
Контроль	9,09±0,23	5,67±0,17	3,97±0,18	2,54±0,10	75,36
Уч. П1	8,97±0,19	3,18±0,12	2,68±0,07	1,45±0,10	83,80
Уч. П2	8,90±0,12	4,52±0,14	2,28±0,12	1,19±0,04	86,62
Уч. ПЗ	9,06±0,13	2,64±0,12	2,28±0,08	0,46±0,02	94,98
Уч. П4	8,87±0,08	3,66±0,18	2,33±0,07	0,61±0,02	93,14
НСР ₀₅	0,48	0,44	0,34	0,20	-

Данные, приведенные в таблице, показывают, что биодegradация была наиболее интенсивной в первые два сезона. К концу второго сезона снижение нефтезагрязнения почвы составило от 67,31 до 74,88 % для участков, на которых применялись методы биостимуляции и 56,33 % – для контрольного варианта.

В конце третьего сезона максимальный уровень снижения нефтезагрязнения наблюдался на участках ПЗ и П4 – 95 % (0,46 мг/кг) и 93 % (0,61 мг/кг) соответственно.

Результаты эксперимента показали, что наибольшей эффективностью биодеструкции нефти обладают следующие варианты

опытов: «Бак-Верад+известь+сорбент» и «Бак-Верад+известь+гумат калия». К концу эксперимента снижение концентрации углеводов нефти на данных участках составило 95 % (0,46 мг/кг) и 93 % (0,61 мг/кг) соответственно. В связи с тем, что в Российской Федерации ПДК для нефти в почве не разработаны, данные уровни загрязнения в соответствии с классификацией Ю.И. Пиковского (1993) можно отнести к повышенному фону – для участка ПЗ и умеренному загрязнению (низкому) – для участка П4, что позволяет предложить данные восстановительные комплексы в качестве эффективной схемы биоремедиации нефтезагрязнённых луговых почв юга Тюменской области.

3.5. Влияние нефтезагрязнения на агрохимические показатели луговых почв

На деградацию нефтезагрязнения почвы и водоносных горизонтов могут влиять такие факторы окружающей среды, как растворенный кислород, pH, температура, токсиканты, окислительно-восстановительный потенциал, наличие неорганических питательных веществ (например, азота и фосфора), солёность, а также концентрация и характер органики. Количество и тип организмов, присутствующих в окружающей среде, также будут играть важную роль в процессе деградации.

Таким образом, биоремедиация нефтезагрязнённой почвы, как правило, включает мероприятия по оптимизации условий pH, температуры, влажности почвы, содержания кислорода в почве и концентрации питательных веществ для стимуляции роста организмов, которые будут метаболизировать конкретные присутствующие загрязнители. Оптимальные условия окружающей среды и нормы внесения питательных веществ, как правило, должны быть установлены в лабораторных исследованиях и небольших пилотных испытаниях в полевых условиях. Некоторые углеводородные соединения могут

разлагаться быстрее в аэробных условиях, а некоторые – в анаэробных условиях. Анаэробноз всегда присутствует на микроуровне в почве. Следовательно, восстановление может состоять из комбинации как аэробных, так и анаэробных методов ремедиации.

В одинаковых климатических условиях в гидроморфных почвах, наиболее типичным представителем которых являются луговые почвы, гидротермический режим складывается по-иному, а отсюда и ход биологических процессов. Почвенно-грунтовые воды в них, в отличие от подзолистых почв тайги, имеют довольно большую мощность и часто смыкаются с грунтовыми. За счет тепла, отдаваемого этими водами в зимний период, почвы или не промерзают вообще, или только на сравнительно небольшую глубину, а весной за счет тепла вод они оттаивают до массового снеготаяния. Поэтому талые воды при равнинном рельефе остаются в почвах и часто переувлажняют верхнюю часть их профиля (Каретин, 1990).

В летний период тепло расходуется на испарение и прогревание грунтовых вод. Поэтому почвыгреваются медленно, активные температуры проникают неглубоко. В целом в луговых почвах создается неблагоприятный гидротермический режим, хотя общий травянистый покров в сочетании со сравнительно благоприятным водным и тепловым режимами, при некотором ограничении последнего, более благоприятствует процессам гумификации, чем минерализации. Это обуславливает высокую гумусированность почв и высокое их потенциальное плодородие (Каретин, 1990).

В ходе экспериментов было проведено исследование агрохимических показателей чистой незагрязненной почвы, почвы, загрязнённой нефтепродуктами и почвы после внесения восстановительных комплексов (таблица 6).

Значения агрохимических показателей на начало эксперимента приведено в таблице 7.

Таблица 7 – Значения агрохимических показателей на начало эксперимента

Показатель	Фон	Контроль	П1	П2	П3	П4
NH_4^+ , мг/кг	4,41	6,24	6,87	7,33	7,48	7,94
P_2O_5 , мг/кг	60,49	117,92	95,91	264,43	284,72	333,21
K_2O , мг/кг	60,53	95,95	105,80	196,75	172,25	267,25
$\text{pH}_{\text{ккл}}$, ед.	6,5	6,5	6,7	6,6	6,5	6,4
Орг. вещество, %	6,08	7,98	6,18	9,08	9,70	8,10

Почва характеризуется довольно низким содержанием нитратного азота – менее 2,8 мг/кг на всех участках, однако в некоторых случаях это является благоприятным фактором для процесса нефтедеструкции. Согласно Amadi et al (2005), микроорганизмы, разлагающие нефть или использующие углеводороды, такие как *Azobacter spp*, обычно становятся более многочисленными, при уменьшении количества нитрифицирующих бактерий, таких как *Nitrosomonas spp*.

В начале полевого эксперимента было отмечено увеличение содержания аммонийного азота на всех участках на 29-44 % после нефтезагрязнения. Содержание подвижных форм фосфора и калия превышало содержание их в фоновой почве: от 4,4 до 5,5 раз – для фосфора и от 2,8 до 4,4 раза – для калия. Содержание подвижного фосфора в контрольном варианте в сравнении с чистой почвой было выше в 1,9 раза, калия – в 1,6. Реакция почвенной среды на всех участках находилась в пределах 6,4 – 6,6 единиц. Массовая доля органического вещества на всех нефтезагрязнённых участках также была выше значения фона в 1,3 – 1,5 раза. Увеличение содержания питательных веществ (азот, фосфор, калий) в результате нефтезагрязнения было отмечено в работе Akpan, Udoh (2013).

Обеспеченность почв биогенными элементами – азотом, фосфором и калием является важным фактором, определяющим скорость

биодеструкции углеводов нефти. Однако в условиях эксперимента питательные вещества в почву не вносились, в связи с тем, что применялась негашёная известь. Кальций способствует флокуляции, скоплению мелких частиц почвы и может препятствовать включению фосфата в почву (Weil, Brady, 2017). US EPA (1985) также сообщило, что добавление фосфатов может привести к осаждению фосфатов кальция и железа. При низких концентрациях в известковых почвах фосфор адсорбируется на карбонат кальция; при высоких концентрациях образуются минералы фосфата кальция, а фосфат недоступен микроорганизмам (Mattingly, 1975). Фосфат можно добавлять в песчаные (кварцевые) почвы, но не в карбонатные (Aggarwal et al., 1991). Кроме того, добавление избыточного азота может привести к увеличению солёности почвы, что увеличивает осмотическое напряжение и подавляет активность организмов, деградирующих углеводороды.

В течение трех лет проводилось исследование агрохимических свойств почвы. Динамика изменения агрохимических свойств луговых почв в ходе эксперимента сведены в таблице 8.

Таблица 8 – Значения почвенных агрохимических показателей исследуемых участков

Исследуемые участки	Аммонийный азот, мг/кг			Подвижный фосфор, мг/кг			Подвижный калий, мг/кг			рН, ед.			Массовая доля органического вещества, %		
	2017	2018	2019	2017	2018	2019	2017	2018	2019	2017	2018	2019	2017	2018	2019
Фон	4,41	-	-	60,49	-	-	60,53	-	-	6,5	-	-	6,08	-	-
Контроль	6,24	6,95	7,72	117,92	195,63	288,84	92,95	112,54	126,73	6,5	6,2	6,0	7,98	8,19	8,47
БП	6,87	7,33	8,11	95,91	175,68	264,77	105,80	117,31	129,23	6,7	6,5	6,2	6,18	7,04	7,19
БП + известь	7,33	6,96	6,29	264,43	255,85	257,20	196,75	185,30	182,00	6,6	6,4	6,4	9,08	8,24	6,27
БП + известь+ сорбент	7,48	6,48	4,98	284,72	233,17	211,81	172,25	146,87	110,68	6,5	6,4	6,5	9,70	8,53	7,65
БП + известь+ гумат калия	7,94	6,74	5,95	333,21	258,32	230,38	267,25	189,90	155,68	6,4	6,4	6,5	8,10	7,75	7,20
НСР ₀₅	0,49	0,34	0,14	19,15	18,57	21,28	15,90	14,30	13,30	0,12	0,11	0,10	0,10	0,11	0,11

pH почвы влияет на рост растений, прежде всего, через его влияние на доступность питательных веществ. Высокий или низкий pH вызывает дефицит питательных веществ, необходимых растениям для роста. Уровень pH важен не только для определения наличия многих питательных веществ в почве, но и для анализа процессов миграции и деградации многих загрязнителей почвы. Известно, что сильно кислые почвы обычно имеют высокие концентрации растворимого алюминия и марганца, которые токсичны для многих растений, а процессы фиксации и разложения азота в них сильно затруднены (Udoetok, 2012; Яковченко, Дрёмова, 2012).

Кроме того нейтральная среда является оптимальной для роста и развития бактерий в среде разлива нефти, которая позволит им выжить и использовать источник углерода для их роста и метаболизма. Оптимальный диапазон pH для биodeградации считается от 6,0 до 8,5 (Leahy and Colwell, 1990). Это подтверждается исследованиями других авторов. В работе Bamforth and Singleton (2005) показано как при изменении pH с 5,5 до нейтрального, эффективность микробного разложения фенантрена увеличилась с 40 до 80 %. Кроме того, рост *Sphingomonas paucimobilis* ингибировался pH среды при значении 5,2 по сравнению с нейтральным pH.

Как видно из табл.7, pH нефтезагрязненных участков, на которых не проводилась корректировка кислотности (нефтезагрязненный контроль и участок П1), оказался ниже, чем у фоновых не загрязненных почв и показал снижение на 0,5 единиц. Это говорит о том, что загрязнение нефтью приводит к снижению значения pH луговых почв. Данный вывод согласуется с результатами других авторов (Рогозина, Калимуллина, 2007, 2009; Amadi et al., 2005; Акран и Екро, 2006), которые наблюдали увеличение кислотности почвы после увеличения концентрации нефтезагрязнения.

На участках, где применялась коррекция кислотности (применялась известь), pH нефтезагрязненной почвы не изменился и сохранился на уровне 6,5 ед., что является характерной для луговых почв Тюменской области (Каретин, 1982; Ренев и др., 2017)(рис. 16).

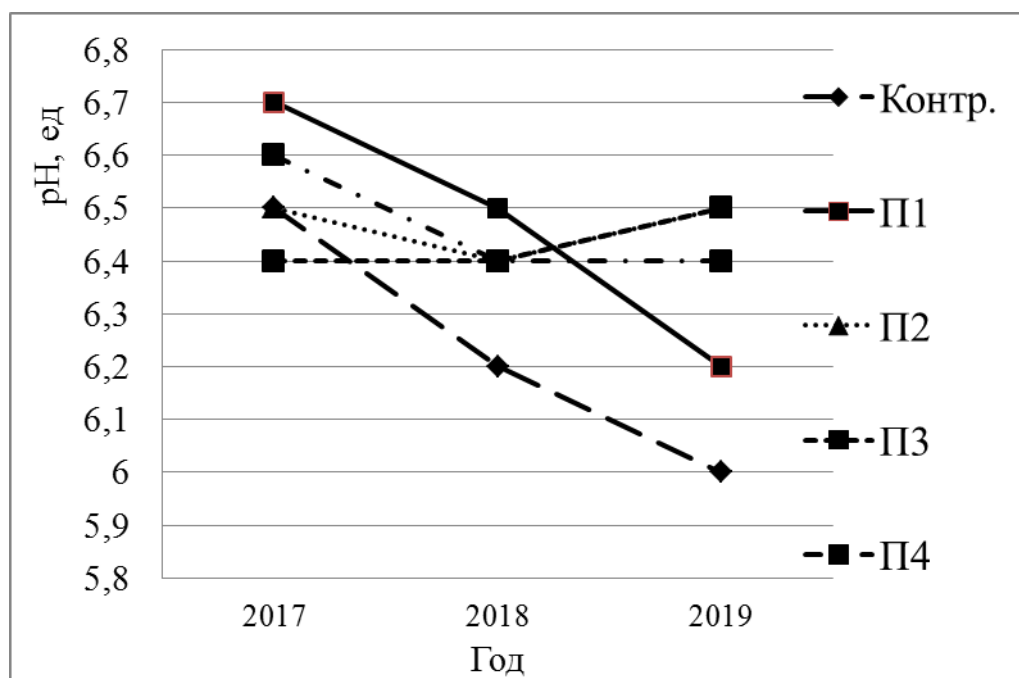


Рис.16 – Динамика изменения pH почвы

Исследование Khorasanizadeh (2013) показало, что кислотные pH (pH 5,0, 5,5, 6,0 и 6,5) приводят к более низкой биodeградации по сравнению с нейтральными или слабощелочными pH (pH 7,0, 7,5 и 8,0). Высокие значения pH приводят к большей биodeградации углеводородов нефти. Это позволяет предположить, что управление pH путем лимитирования может быть эффективным способом стимулирования биodeградации углеводородов нефти (Chesworth, 2008). Verstraete и соав. (1976) сообщили о почти удвоении скорости биodeградации бензина в кислой (pH 4,5) почве путем корректировки pH до 7,4. Однако при значительном повышении pH до 8,5 показатели значительно снизились. Кислотность почвы возможно регулировать аэрацией для стимуляции микробного окисления органических кислот, а также внесением негашеной извести для обеспечения буферной способности почвы.

Хотя нефть оказывает непосредственное влияние на понижение pH, более вероятно, что причиной разницы является образование органических кислот за счет микробного метаболизма. Результаты исследований

подтверждают корреляцию между содержанием нефтепродуктов в почве и её рН (рис. 17).

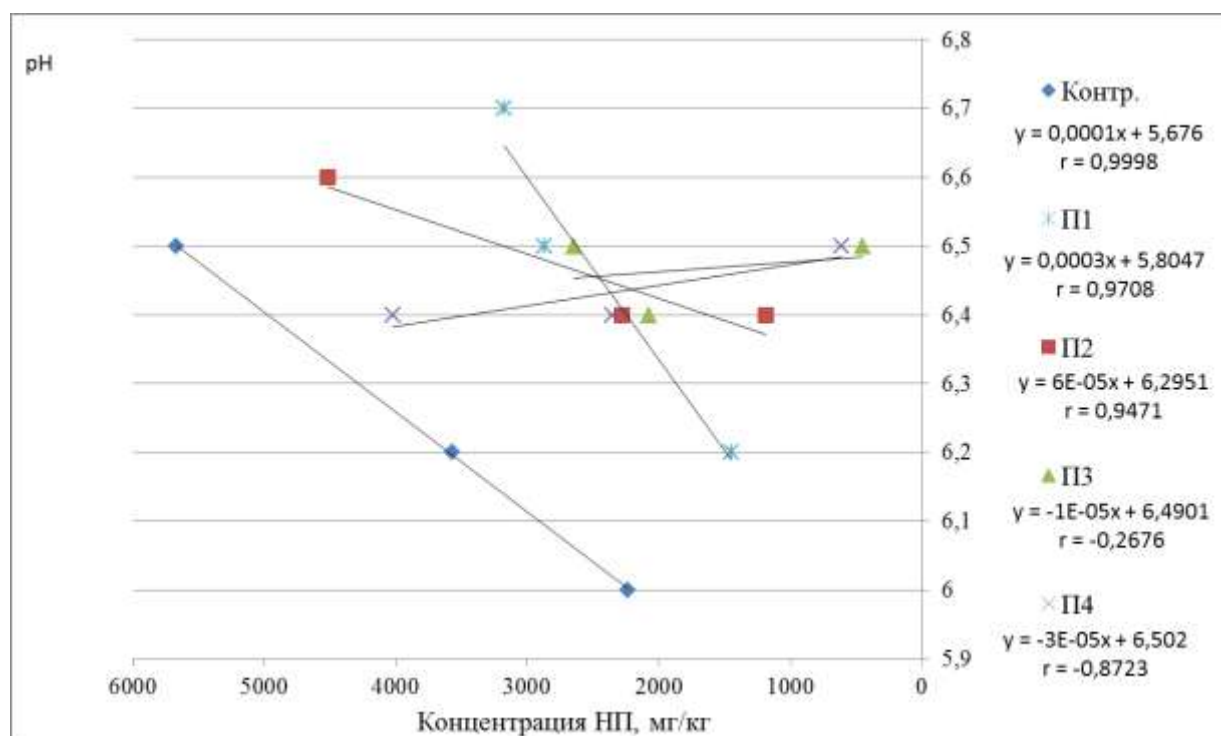


Рис.17 – Корреляция между концентрацией НП и рНпочвы

Кислая почва часто вызывает задержку роста и пожелтение листьев, что приводит к снижению роста и урожайности сельскохозяйственных культур при снижении уровня рН. Кроме того, растения, выращенные в неблагоприятных условиях рН, могут быть более подвержены болезням и грибковым атакам.

Органическое вещество

Органическое вещество в почве образуется из природных материалов, таких как растительные остатки, помёт животных и микробная биомасса. Органическое вещество почвы влияет на биодоступность питательных веществ, которая является одним из основных ограничивающих факторов в биоремедиации стойких органических загрязнителей в почве. По сравнению с другими характеристиками почвы органическое вещество почвы является

основным фактором, влияющим на распределение и биодоступность нефтяных углеводородов (Oje Obinna et al., 2015).

Результаты, полученные в ходе анализа массовой доли органического вещества, показывают, что общее содержание органического вещества в почве увеличивается в процессе загрязнения нефтью и нефтепродуктами. После загрязнения нефтью на всех участках содержание органического углерода в почве выросло на 31,25-59,54 % по сравнению с незагрязненной почвой. Это связано с тем, что наличие нефтяных углеводородов приводит к агрономическому добавлению содержания углерода в почву. Аналогичные результаты были получены Benka-Coker и Ekundayo (1995), которые отметили увеличение содержания органического углерода в загрязненных нефтью почвах в Южной Нигерии и Воеводиной с соавт. (2015) в черноземных почвах Южного Предуралья.

Применение опытных вариантов на участках П2, П3 и П4 привело к снижению количества органического вещества в нефтезагрязненных почвах (рис.18). В конце эксперимента, на всех участках кроме контроля и участка П1 значения органического углерода были значительно ниже, чем в начале эксперимента (11 – 31 %). Результаты исследований показали, что с увеличением времени окисляемый углерод, который также является функцией органического вещества, уменьшается, что является результатом превращения углерода в оксид углерода (CO_2) в процессе клеточного метаболизма. Эти результаты подтверждаются данными Suttonetal.(2014) в исследованиях биоремедиации почв, загрязненных углеводородами. В своей работе они отмечали снижение органического вещества в процессе биоремедиации почв загрязненных углеводородами до уровня полевого образца в течение 56 дней от начала эксперимента.

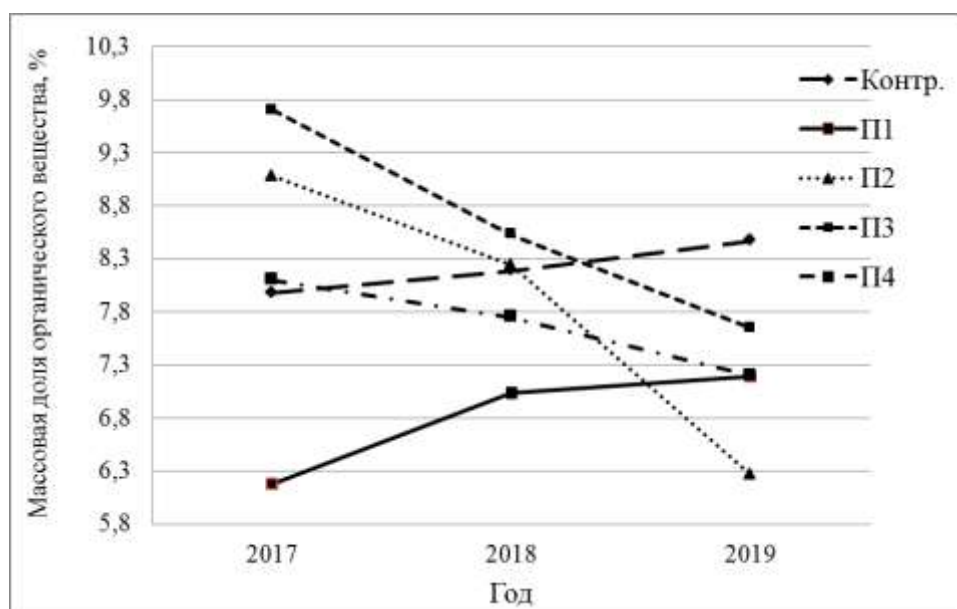


Рис.18 – Изменение массовой доли органического вещества

Результаты, приведённые на рис. 19, показывают положительную корреляцию между концентрацией загрязнения нефтью и содержанием органического углерода на всех участках кроме контроля ($r=-0,98$) и участка П1 ($r=-0,74$). Результат показывает снижение содержания органического углерода по мере уменьшения концентрации нефтепродуктов в почве.

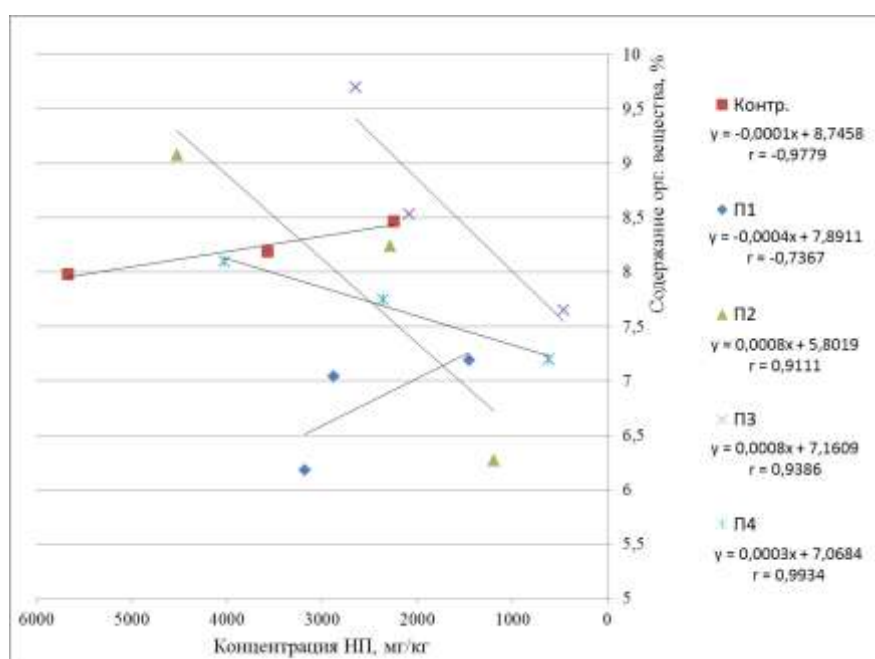


Рис.19 – Корреляция между концентрацией НП и содержанием органического вещества

Фосфор

Правильный рост культурных растений, несомненно, зависит от содержания питательных веществ в почве. По словам BaranS. et al. (2002), негативное воздействие нефти и нефтепродуктов, на почву состоит только в том, что они вызывают острую нехватку азота и фосфора, нарушают водный баланс и биологическое равновесие. Dimitrow and Markow (2000) доказали, что присутствие нефти в почве значительно снижало содержание доступных форм фосфора и калия, что было частично подтверждено исследованиями в данной работе.

Было обнаружено, что содержание фосфора выше в загрязненных почвах по сравнению с незагрязненными почвами. Согласно Akubugwo et al.(2009), загрязнение сырой нефтью может привести к повышению содержания фосфора в почве. Также на начальное содержание доступного фосфора могло повлиять добавление извести и гумата калия в почву.

По данным, полученным за 2017-2019 г., во всех вариантах, кроме контрольного и П1, наблюдалось снижение количества подвижного фосфора. Наибольшее снижение значения доступного фосфора наблюдалось на участках П3 и П4 – 30,86 и 25,61 % от исходного содержания соответственно. Вариант П2 практически не показал снижения – 2,73 %.

Снижение значения фосфора в вариантах П3 и П4 может быть вызвано двумя причинами. Во-первых, нефтяные углеводороды в сырой нефти увеличивают концентрацию углерода в почве, что может повлиять на равновесие питательных веществ в почве. Во-вторых, микроорганизмы в почве могут использовать значительные количества доступного фосфора для разложения углеводородов, присутствующих в почве. Аналогичные выводы делают Atlas et al. (1978) в своем исследовании, утверждая, что уменьшение доступного фосфора может быть связано с тем фактом, что он необходим для биоразложения. Однако на участке П2 при одинаковом исходном нефтезагрязнении снижения содержания фосфора не наблюдается.

На контрольном варианте и варианте П1 наблюдается увеличение

количества фосфора на 145 и 176 % соответственно. (рис.20). Это может быть связано с тем, что, недоступные формы фосфора в почвах могут медленно высвобождаться в подвижную форму при снижении pH почвы. (Illmer, Schinner, 1995; Yadav and Verma, 2012).

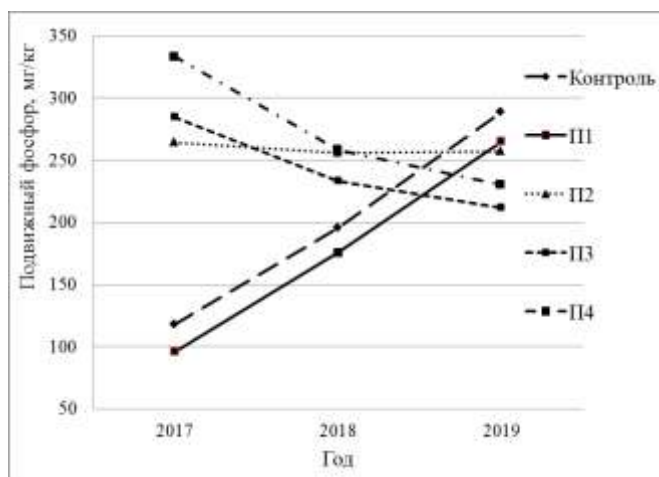


Рис.20 – Динамика изменения количества подвижного фосфора

Результаты на рис. 21 показывают сильную корреляцию между остаточным содержанием нефтепродуктов и содержанием подвижного фосфора.

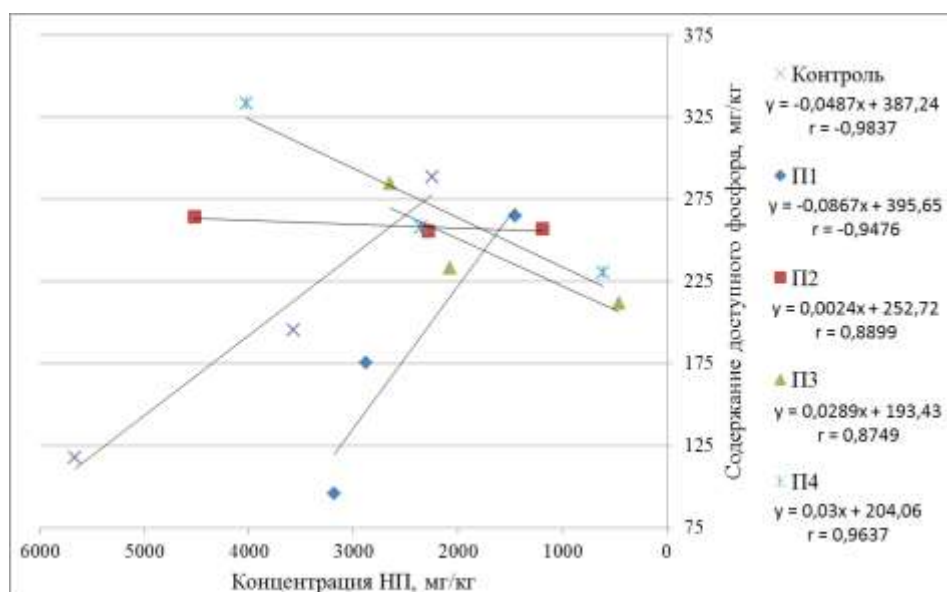


Рис.21 – Корреляция между концентрацией НП и содержанием подвижного фосфора

Согласно исследованиям Walworthi Reynolds (1995) в почве, инкубированной при 20 °С, исчезновение нефти значительно усиливалось добавлением 120 или 180 мг фосфора на килограмм почвы. Следовательно, влияние концентрации фосфора на микробную деградацию нефти также зависит от температуры. Максимальная деградация нефти произошла при содержании в почве фосфора от 185 до 215 мг/кг почвы в почве, инкубированной при 20 °С. При этом не было никаких признаков того, что более высокий уровень фосфора был вредным для биodeградации.

Данные результаты позволяют сделать вывод, что диапазон содержания фосфора, полученный в нашем исследовании (211,81-333,21 мг/кг) можно считать оптимальным уровнем содержания фосфора в почве.

Азот

Потребность во внесении питательных веществ в почву основана не только на потребности организмов в этих питательных веществах, но и на содержании уже имеющихся питательных веществ. Содержание доступных питательных веществ анализируются путем экстракции почвы, в процессе которой удаляется часть питательного вещества, равная той, которая доступна для организма. Этот подход обычно используется для питательных веществ, которые находятся в основном в неорганической фазе, таких как фосфор. Труднее определить биологическую доступность питательных веществ, присутствующих в основном в органической фазе, таких как азот, потому что органические соединения, в которых они содержатся, должны быть биологически разложены до неорганических компонентов, прежде чем питательные вещества могут быть использованы. Неорганический почвенный азот состоит главным образом из восстановленного аммония (NH_4^+) и окисленных нитратов (NO_3^-), которые могут использоваться в качестве источника азота большинством организмов (Завалини др., 2018). С энергетической точки зрения, аммоний является предпочтительным источником азота, потому что он находится в восстановленной форме,

которая является биохимически необходимой, тогда как нитраты должны быть восстановлены организмами до включения в аминокислоты и родственные соединения.

В результате проведенных исследований отмечается снижение содержания аммонийного азота на участках с восстановительным комплексом. Картина, наблюдаемая в изменении содержания аммонийного азота аналогична процессам, влияющим на изменение подвижного фосфора. Применение восстановительного комплекса приводит к снижению содержания аммонийного азота на 14,2 % для участка П2, 25,1 % для участка П4 и 33,4 % для участка П3. Снижение содержания аммонийного азота на данных участках, по всей видимости, связано с активизацией жизнедеятельности микроорганизмов. На контрольном варианте наблюдается увеличение содержания аммонийного азота на 19,2 % (рис. 22).

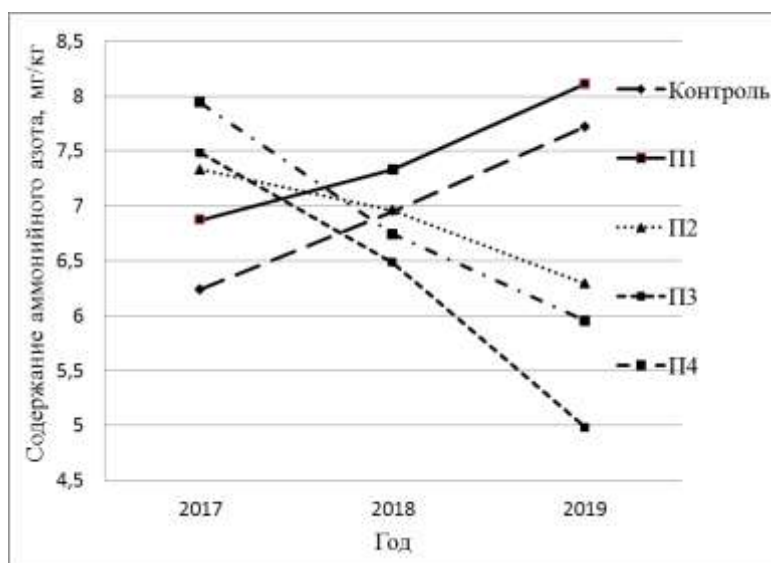


Рис. 22 – Динамика изменения содержания аммонийного азота в исследуемых почвах

Результаты, представленные на рис. 23, показывают тесную связь между остаточным содержанием нефтепродуктов и содержанием аммонийного азота в почве.

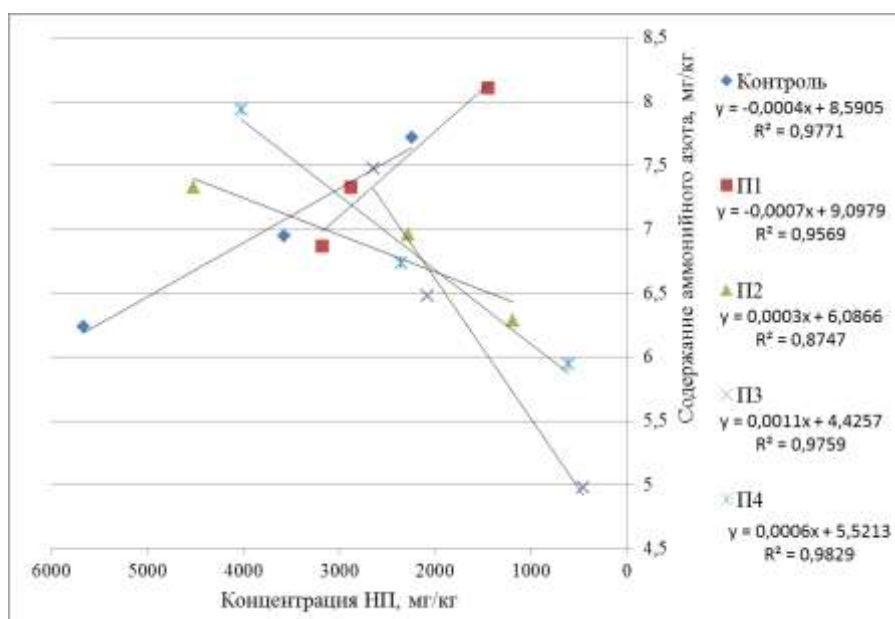


Рис. 23 – Корреляция между концентрацией НП и содержанием аммонийного азота

Калий

Согласно результатам динамики изменения содержания подвижного калия, приведённым в табл. 7, на участках П3 и П4 наблюдается увеличение содержания подвижного калия после загрязнения нефтью и последующее уменьшение его содержания после применения предлагаемых схем биоремедиации, что также подтверждается в работе Ekperusi и Aigbodion (2015). Аналогично с фосфором, снижение калия может быть связано с его утилизацией растениями и почвенными микроорганизмами. Тем не менее, в работе Ezeaku and Egbemba (2014) было показано, что низкий pH может привести к потере калия из-за реакций замещения в коллоидном комплексе почвы, что предполагает реакцию вытеснения в катионообменном Al^{3+} .

Динамика изменения, представленная на рис.24, показывает снижение содержания подвижного калия в ходе эксперимента, которое может быть связано с иммобилизацией питательных веществ вследствие образования комплексов в почве после деградации и поглощения. Снижение содержания подвижных форм калия также были отмечены в работах российских учёных (Гусейнов, Ахундов, 1975; Гилязов, 1980).

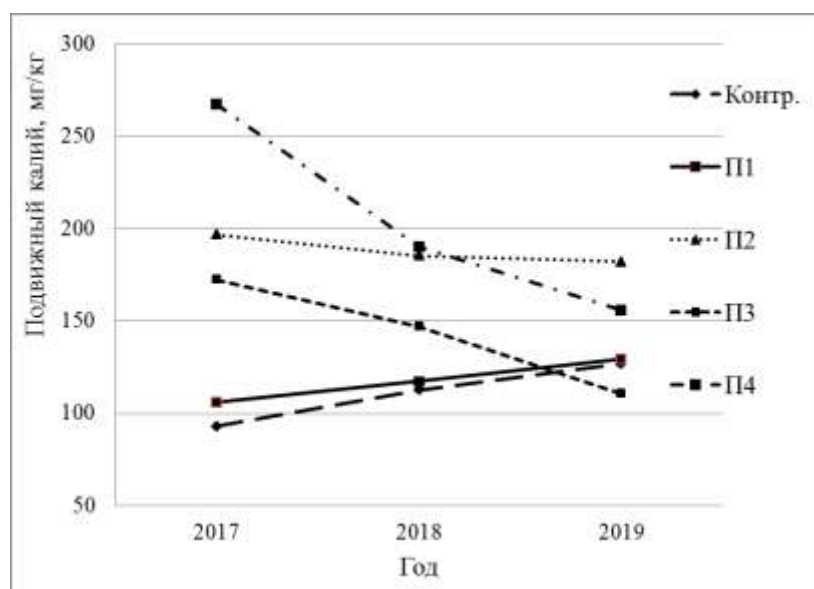


Рис.24 – Динамика изменения количества доступного калия в исследуемых образцах

Результаты, представленные на рис. 25, показывают сильную корреляцию между концентрацией загрязнения нефтью и содержанием подвижного калия, что в свою очередь подтверждает вывод о снижении содержания калия в почве в процессе биodeградации нефтезагрязнения.

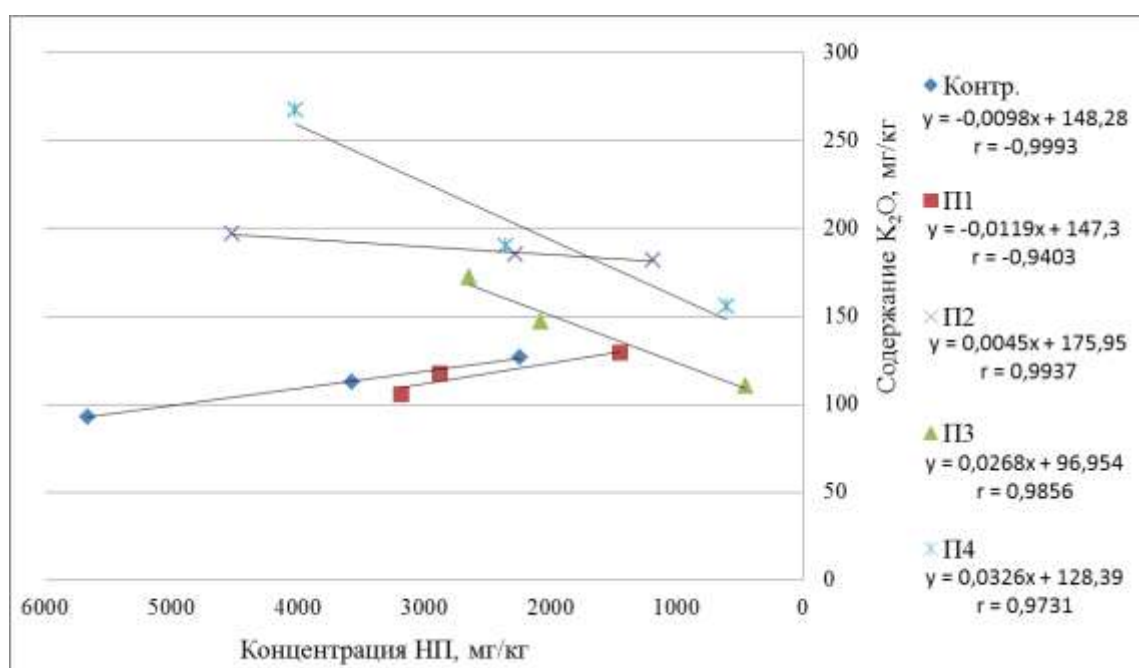


Рис. 25 – Корреляция между концентрацией НП и содержанием подвижного калия

Таким образом, в результате исследований агрохимических свойств луговых почв, проведенных в данной работе, можно сделать следующие выводы:

1. pH нефтезагрязненных участков, на которых не проводилась корректировка кислотности (контроль и участок П1), оказался ниже, чем у фоновых не загрязненных почв и показал статистически достоверное снижение на 0,5 единиц. Это говорит о том, что загрязнение нефтью приводит к снижению значения pH данных типов почв. На участках, где применялась коррекция кислотности, pH нефтезагрязненной почвы не изменился и сохранился на уровне 6,5 ед.

2. Содержание органического вещества в почве увеличивается в процессе загрязнения нефтью и нефтепродуктами. Применение мелиоративных добавок в сочетании с бактериальным препаратом снижает содержание органического вещества до полевого уровня.

3. Загрязнение нефтью привело к повышению содержания азота, фосфора и калия в исследуемых почвенных образцах. На протяжении трех лет наблюдается их постепенное снижение на участках, где применялись мелиоративные добавки, что, по всей видимости, связано с активизацией жизнедеятельности углеводородокисляющих микроорганизмов.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ФИТОТОКСИЧНОСТИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ БИОРЕМЕДИАЦИОННЫХ МЕРОПРИЯТИЙ

Хотя загрязняющие вещества и их концентрацию в почве можно быстро охарактеризовать химическим методом, общее качество почвы не может быть отражено только химическим анализом. Одних химических данных недостаточно для оценки биологического влияния, поскольку невозможно проанализировать все вещества и их синергетические эффекты, способствующие токсичности. Что касается экотоксичности загрязняющих веществ, биологический метод больше подходит для определения возможной опасности загрязняющих веществ в почве для экологии и окружающей среды (Заболотских и др., 2012; Петухов и др., 2013).

Некоторые авторы предположили, что стандарты восстановления почвы должны основываться на компонентах ВТЕХ (бензол, толуол, этилбензол и ксилол) в почвах, загрязненных сырой нефтью и нефтепродуктами (Salanitro et al., 2001). Это наиболее подвижные (выщелачиваемые) ароматические углеводороды, которые легко мигрируют в вадозную зону и грунтовые воды. В связи с этим биотесты на экотоксичность следует использовать в качестве дополнительных инструментов для мониторинга воздействия применяемых методов восстановления загрязненных участков земли. Кроме того, соответствующие экологические критерии оценки воздействия нефтяных углеводородов также являются важными конечными точками для оценки риска.

Изменение состава и содержания углеводородов нефти в почве в процессе биоремедиации приводит к изменению биологической токсичности почвы. Некоторые метаболические соединения нефти, такие как ароматические кетоны, альдегиды, карбоновые кислоты, жирные кислоты, сложные эфиры, также способствуют биотоксичности нефтяных загрязнителей (Lee, 2003).

Биотесты на токсичность для растений дают уникальные преимущества по сравнению с тестами на животных или микробах. Wang (1991) предположил, что общие преимущества испытаний на токсичность для растений включают:

- 1) готовность к испытаниям в том смысле, что семена могут быть приобретены оптом, а срок годности большинства из них составляет год или более;
- 2) готовая активация для тестирования (прорастание семян);
- 3) минимальные затраты на обслуживание между тестами.

Эти характеристики делают растения хорошо подходящими для оценки загрязненных почв.

Наиболее важным показателем эффективности биоремедиации почвы от нефтезагрязнения является урожайность растений, так как основным критерием качества почвы, по мнению многих исследователей, следует считать ее фитотоксичность (Гашева и др., 1990; Фомченков и др., 1996; Капелькина, 2001; Назаров, Иларионов, 2005). В условиях нефтезагрязнения растения, являясь чуткими индикаторами экологической обстановки, могут дать объективную информацию о процессах восстановления почвенного плодородия (Banks and Schultz, 2005).

Сухие семена растений, будучи в состоянии покоя, могут противостоять суровым условиям окружающей среды без потери жизнеспособности. Однако при увлажнении и в благоприятных условиях семена растений претерпевают быстрые изменения – происходит метаболизм, транспорт питательных веществ и деление клеток (Mayer and Poljakoff-Mayber, 1982), и в течение этого периода проросшие семена становятся очень чувствительным к стрессу окружающей среды. По этой причине всхожести семян и энергия прорастания являются наиболее распространенными показателями при оценке фитотоксичности.

На основе анализа литературных данных (Стихин, Денисов, 1977; Ревенкова, 1978; Кобянський, 1982; Зинченко и др., 2001; Евдокимова и

др., 2007; Muratovaetal, 2008; Евдокимова и др., 2009), наиболее подходящим биоиндикатором для оценки фитотоксичности почвы на различных этапах биоремедиации луговых почв юга Тюменской области была выбрана рожь озимая (*Secale cereal L.*). Это недорогое и простое в выращивании растение превосходит все другие покровные культуры на неплодородной, песчаной или кислой почве или на плохо подготовленной земле. Рожь достигает наибольшего плодородия, когда pH почвы выше 6,0, предпочтительно 6,5. Она широко адаптирована, но лучше всего растет в прохладных, умеренных зонах. Семена начинают прорасти при температуре 0,5-2,0 °C. (Антропов, Антропова, 1929; Цвелёв, 1976).

На первом этапе эксперимента фитотоксичность оценивалась в лабораторных условиях. Изучение фитотоксичности нефтезагрязненных почв проводилось с применением различных схем микробной биоремедиации. Для постановки эксперимента использовались вегетационные сосуды емкостью 2000 мл. Для каждого участка отбиралось по 100 семян, которые были предварительно проверены визуально, чтобы убедиться, что они однородного размера, и не повреждены. Затем семена дважды промывали этанолом (70%). Высев семян производился в почву на 12 и 40 сутки от начала эксперимента. Семена *Secale cereale L.* проращивали при комнатной температуре 20 ± 2 °C.

В ходе исследования экологическое состояние нефтезагрязненных почв оценивали по величине надземной биомассы растений, поскольку состояние растительного покрова в естественных природных условиях является важнейшим критерием, который, наряду с содержанием нефтепродуктов в почвах, диагностирует обратимость деградационных процессов и допустимую степень загрязнения почвы. Для оценки степени токсичности почвы в первом вегетационном сезоне в лабораторных условиях определяли показатели прорастания семян – всхожесть и энергию прорастания. Всхожесть семян рассчитывали как доля проросших семян, выраженная в процентах от общего количества семян, взятых для проращивания.

Всхожесть семян *Secale cereale* L. в незагрязненных почвах, которые использовались в качестве контроля, составила 92-94%. Энергию прорастания вычисляли как число семян, проросших за первые трое суток, выраженное в процентах от общего количества семян, взятых для проращивания. Исследования проводились в четырёхкратной повторности.

Различия в экотоксикологических эффектах, наблюдаемые между разными участками, можно объяснить различными методами биоремедиации, используемыми на них. Результаты агрохимических и углеводородных измерений в отношении исследуемых почв обеспечили уровень характеристик, необходимый для изучения различий в полученных показателях.

Результаты проведённых исследований показали, что образцы почвы, через 12 суток после постановки эксперимента, имеющие остаточное содержание нефтепродуктов от 5,01 до 7,22 г/кг, оказывают ингибирующее влияние на семена ржи, снижая скорость прорастания семян и роста растений и смещая фазы развития проростков. Это характеризуется низкими значениями *энергии прорастания* – на контроле она составила 1%, тогда как *всхожесть* – 12%. Наибольшие значения всхожести наблюдались в вариантах ПЗ и П4 – 40 и 45% соответственно, однако энергия прорастания в образце П4 в 2,8 раза выше, чем в образце ПЗ.

В образцах почвы через 40 суток после начала эксперимента остаточное содержание нефтепродуктов варьировало от 2,64 до 5,67 г/кг. Такое снижение уровня нефтезагрязнения оказало положительное влияние на показатели роста семян, особенно на энергию прорастания. В варианте П4 данный показатель вырос в среднем с 14 до 38 %, а в варианте ПЗ – с 5 до 16 %. Наибольшее увеличение всхожести (с 40 до 52 %) произошло в варианте ПЗ. В сосудах П2 и контрольном варианте достоверного изменения показателей роста выявлено не было. В вариантах П1 наблюдалось снижение всхожести с 27 до 11 %.

Также необходимо отметить различия в параметрах проростков. В обоих тестах средняя высота coleoptilia была ниже, чем на незагрязнённой

почве, однако различалась для разных схем биоремедиации. Наименьшая высота проростков наблюдалась на контрольном варианте и составляла в среднем 2,5 см. Средняя высота coleoptily для схем ПЗ и П4 составила 4,9 и 5,6 см соответственно, что в среднем на 34,7 и 25,3 % ниже, чем на чистой почве.

Данные о влиянии нефтезагрязненных почв на результаты энергии прорастания и всхожести семян на исследуемых схемах в лабораторных условиях приведены в таблице 9.

Таблица 9 – Значения энергии прорастания и всхожести семян *Secale cereale* L. в лабораторных условиях, %

Вариант	Время, прошедшее после разлива			
	12 суток		40 суток	
	энергия прорастания	всхожесть	энергия прорастания	всхожесть
Фон	92	94	88	92
Контроль	1	12	5	16
П1	4	27	4	24
П2	10	25	8	28
ПЗ	5	40	16	52
П4	14	45	38	56
НСР ₀₅	0,16	4	1	6

На основании результатов лабораторных исследований был поставлен полевой эксперимент. Схема проведения полевого эксперимента соответствовала схеме лабораторных исследований. Фитотоксичность нефтезагрязненной почвы оценивали по всхожести и величине надземной биомассы растений. Посев семян ржи озимой был осуществлен в начале августа для оценки полевой всхожести с последующей зимовкой и определением фитомассы на стадии колошения.

В полевом эксперименте были получены результаты, аналогичные с результатами лабораторных исследований. На процент всхожести семян ржи существенно повлияло содержание нефтепродуктов. Отмечается обратная зависимость всхожести семян от концентрации углеводородов нефти.

Сильная отрицательная корреляция между всхожестью семян ржи и содержанием нефтепродуктов также была установлена в работах Т.Г. Кольцовой с соав. (2014, 2015).

Всхожесть семян на участках ПЗ и П4 исследуемых почв существенно не отличалась от фона. Интересно отметить, что остаточное содержание нефтепродуктов, которое не оказывало существенного влияния на всхожесть семян ржи озимой, варьировало от 2,28 до 2,55 г/кг.

Отбор растений проводился на стадии колошения. Растения были собраны и высушены при 70 °С в течение 3 дней для определения массы сухого вещества. Количество растений, достигших стадии колошения, на незагрязненной почве составило 57 % от взошедших семян, на остальных участках не превышало 30 %. Наибольшая средняя масса растения наблюдалась в вариантах ПЗ и П4 и составила в среднем 1,61 и 1,55 г/растение соответственно. Наименьшее значение средней массы растения (1,22 г/растение) соответствовала контрольному варианту. Результаты полевого вегетационного эксперимента приведены на рисунке 26.

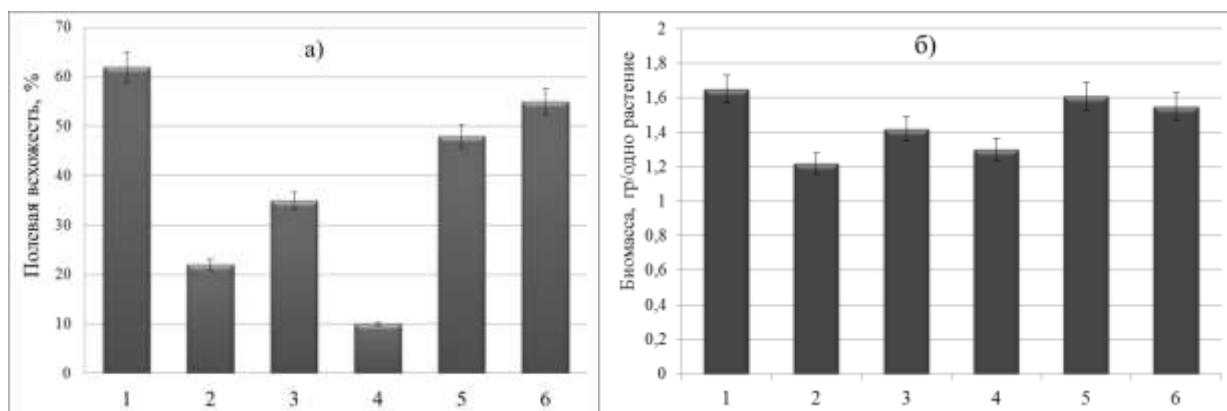


Рис.26 – Средняя полевая всхожесть (а) и средняя масса растений ржи озимой (б): 1 – фон; 2 – контроль; 3 – участок П1; 4 – участок П2; 5 – участок ПЗ; 6 – участок П4.

Результаты проведенных экспериментов подтверждают токсическое влияние нефтезагрязнения почвы на показатели роста и развития растений.

Наименьшая фитотоксичность наблюдалась в вариантах опыта с применением гумата калия и модифицированного вермикулита.

Ингибирование роста семян и ростков ржи может быть связано токсичностью некоторых углеводов нефти. Также загрязненная нефтью почва становится гидрофобной, что приводит к нарушениям в развитии корней и ростков и снижению доступности воды и питательных веществ для сельскохозяйственных культур.

Снижение токсичности на участке П4 может быть связано с применением гумата калия. Антидотный характер влияния гуматов также был изучен в работах Дагурова с соав. (2005), Мадякина с соав. (2012), Кулагина с соав. (2015), Минниковой с соав. (2019). В работе Stehlickova et al. (2009) проводилась биodeградация фенола бактериальным штаммом *Cupriavidus metallidurans* в присутствии гумата калия. Достигнутые результаты показали, что гумат оказывает положительное влияние на биodeградацию фенола и уменьшает время инкубации, необходимое для удаления фенола. В присутствии гумата наблюдались более высокие скорости биodeградации и более интенсивный рост по сравнению с культивированием без его добавления, так как гуминовые кислоты действуют в качестве поверхностно-активных веществ, помогая высвобождать ПАУ в водную среду и усиливая тем самым процессы микробного разложения.

На участке ПЗ в качестве вспомогательного компонента применялся сорбент на основе вермикулита. Вермикулит – это природный материал, который состоит из целого ряда пластин, разделенных воздушными зазорами или пустотами, что способствует адсорбции жидкостей, когда вермикулит используется в качестве субстрата. К основным свойствам вермикулита можно отнести:

- высокая базовая обменная емкость;
- влагоудерживающие и сорбционные свойства;
- высокий pH.

Хорошая аэрация не только обеспечивает растение необходимым кислородом и азотом, но и препятствует образованию гнили, развитию плесени, мха, грибков и различных патогенных микроорганизмов. В отличие от многих разрыхлителей, вермикулит совершенно не травмирует корни растений. Результаты исследования Ахиярова с соавт. (2015) показали, что внесение вермикулита улучшает водно-физические (водопроницаемость и водоудерживающая способность) свойства и повышает температуру грунта, что особенно актуально для относительно холодных луговых почв.

Таким образом, можно отметить, что мелиоративные схемы с применением гумата калия и вермикулита показывают достаточно высокую эффективность биоремедиации нефтезагрязненных луговых почв.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований по биоремедиации нефтезагрязненных луговых почв юга Тюменской области можно сделать следующие выводы:

1. В процессе естественного самоочищения луговые почвы имеют длительный период адаптации к нефтезагрязнению, о чем свидетельствует незначительное снижение концентрации нефтепродуктов в течение 12 месяцев после начала эксперимента (28,5-28,8 %). Наибольшее снижение остаточного содержания нефтепродуктов на исследуемых участках произошло только на третий (66,2 и 73,8 %) и четвертый (86,0 и 91,5 %) годы.

2. Наиболее активный рост почвенной микрофлоры отмечен в вариантах с внесением биопрепарата, извести и сорбента, либо гумата калия. Максимальной численности микрофлора луговой почвы достигала на 3-6 сутки после внесения нефти и мелиорантов.

3. Биоремедиация нефтезагрязненных луговых почв с использованием микробиологического препарата «Бак-Верад» в сочетании с различными добавками способствовали статистически достоверному снижению в них нефтепродуктов на 75 % (с 9,06 до 2,28 мг/кг) уже на второй год эксперимента и улучшению агрохимических свойств. Максимальная убыль углеводов по итогам трёхлетнего эксперимента составила 95 % на участке ПЗ (биопрепарат+известь+сорбент).

4. pH нефтезагрязненных участков, на которых не проводилась корректировка кислотности (контроль и вариант П1), показал статистически достоверное снижение на 0,5 единиц. Это говорит о том, что загрязнение нефтью приводит к снижению значения pH данных типов почв.

5. На протяжении трех лет исследования в вариантах с внесением биопрепарата, извести и сорбента, либо гумата калия наблюдалось снижение содержания аммонийного азота на 33,4 и 25,1 %, подвижного фосфора на 30,9 и 25,6 % и подвижного калия на 35,7 и 41,7% соответственно. По

аналогии с питательными веществами произошло снижение массовой доли органического вещества на 21,1 и 11,1 %. Данное снижение связано с активизацией жизнедеятельности углеводородоокисляющих микроорганизмов.

6. Нефтезагрязнение почвы оказало токсическое влияние на показатели роста и развития растений (*Secale cereale L.*): среднее значение энергии прорастания на контрольном варианте составляло 1%, а всхожесть семян – 12%. Применение мелиоративных схем привело к снижению фитотоксичности нефтезагрязненных почв. Наибольшие значения показателей энергии прорастания и всхожести семян отмечено в опытах с гуматом калия (16 и 52%) и вермикулитом (38 и 46%) на 40 сутки от начала эксперимента.

7. Остаточное содержание нефтепродуктов, которое не оказывало существенного влияния на всхожесть семян ржи озимой, варьировало от 2,28 до 2,55 мг/кг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абуталиева И.Р. Влияние добычи углеводородов на почвенный покров пустынной зоны Нижнего Поволжья / И.Р. Абуталиева // Вестник Астраханского государственного технического университета. – 2008. – № 6 (47). – С.200-203.
2. Агроклиматические ресурсы Тюменской области. – Л.: Гидрометеиздат, 1972. – 151с.
3. Азнаурьян Д.К. Оценка устойчивости биологических свойств почв Юга России к нефтезагрязнению /Д.К.Азнаурьян, С.И. Колесников //Изв. вузов. Сев.-Кавк. регион. Естеств. науки. – 2007. – № 6. – С. 93-94.
4. Антропов В.И. Рожь СССР и сопредельных стран / В.И.Антропов, В.Ф. Антропова. –Л., 1929. –189 с.
5. Аммосова Я.М. Нефтезагрязненные почвы / Я.М. Аммосова, С.Я.Трофимов, Н И.Суханова//Агрохимический вестник. – 1999. – №5. – С.38.
6. Андреева Т.А. Интегральная оценка воздействия нефтяного загрязнения на параметры химического и биологического состояния почв таежной зоны Западной Сибири: автореф. дис. ...канд. биол. наук : 03.00.27 / Андреева Татьяна Анатольевна. – Томск, 2005. – 15 с.
7. Афанасьева Т.В. Почвы СССР. Т.1. / Т.В. Афанасьева и др. – М.: Мысль, 1979. – 380 с.
8. Ахияров Б. Г. Использование Вермикулита при выращивании рассады овощных культур/ Б.Г. Ахияров,Р.Р. Исмагилов, Р.Р. Рахимов // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2015. – № 3 (53). –С. 67-70.
9. Бабаев Э. Р.Преобразование нефти в процессе ее микробиологической деградации в почве /Э.Р.Бабаев, М.Э. Мовсумзаде // Башкирский химический журнал. –2009. – № 3 (16). –С. 80-87.
10. Баландина А.В. Самовосстановление нефтезагрязненных почв /

- А.В.Баландина, Д.Б.Кузнецов, Л.В. Бурдова // Успехи современного естествознания. – 2014. – № 4. – С. 85-88.
- 11.Баландина А.В. Динамика численности микроорганизмов в нефтезагрязненной дерново-карбонатной почве в процессе ремедиации /А.В. Баландина, О.З. Еремченко //Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2018. – №. 3.
- 12.Батуева И. Ю.Химия нефти /И. Ю.Батуева и др. – Л.: Химия, 1984 – 360 с.
- 13.Бахшиева И.Т. Степень загрязнения, токсичность нефтезагрязненных земель Апширонского полуострова и прогноз возможности их рекультивации: автореф. дис... канд. с.-х. наук. / И.Т. Бахшиева. – Баку, 1991. – 22 с.
- 14.Бигон М.Экология. Особи популяции и сообщества. Том 2 /М.Бигон, Дж.Харпер, К.Таусенд. – М.: Мир, 1989. – 477 с.
- 15.Водяницкий Ю.Н. Влияние Fe(III) на биodeградацию нефти в переувлажненных почвах и осадках / Ю.Н.Водяницкий,С.Я. Трофимов, С.А. Шоба // Почвоведение. – 2015. – №7. –С. 877-886.
- 16.Водянова М.А. Анализ существующих микробиологических препаратов, используемых для биodeградации нефти в почве /М.А. Водянова,Е.И. Хабарова, Л.Г. Донерьян // Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал).– 2010. – № 7.–С. 253-258.
- 17.Воеводина Т.С. Влияние нефти на химические свойства чернозема обыкновенного Южного Предуралья / Т.С.Воеводина, А.М.Русанов, А.В.Васильченко // Вестник Оренбургского государственного университета.– 2015. – № 10 (185). – С. 157-161.
- 18.Волобуев В.Р. Экология почв / В.Р.Волобуев. – Баку: Изд-во АН АзССР, 1963. – 549 с.
- 19.Воробьева С.Ю.Подбор рецептуры обезвреживания шламов методом реагентного капсулирования / С.Ю.Воробьева,И.А. Мерициди,

- М.С.Шпинькова // Труды РГУ Нефти и Газа имени И.М. Губкина.– 2013. – № 1 (270). – С. 45-57.
20. Гайворонский В.Г. Моделирование загрязнения чернозема слитого и бурой лесной почвы мазутом с целью установления его экологически безопасной концентрации / В.Г.Гайворонский, С.И. Колесников //Изв. вузов. Сев.-Кавк. регион. Естеств. науки. – 2008. – № 4. – С. 86-88.
21. Гамзаева Р.С. Применение биодеструктора Бак-Верад на дерново-подзолистой почве, загрязненной нефтепродуктами / Р.С. Гамзаева // Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. – 2019. –№ 2 (55). –С. 38-45.
22. Гашев С. Н. Методика оценки фитопригодности нефтезагрязненных территорий (с рекомендациями к рекультивационным работам): Учебное пособие / С.Н. Гашев, М.Н.Казанцева, А.В. Соромотин. – Тюмень: Тюменский государственный университет, 1992.– 13 с.
23. Гашев С. Н. Влияние нефти на наземные экосистемы: от деградации к восстановлению (на примере нефтезагрязненных биогеоценозов в районе Среднего Приобья Тюменской области) / С.Н. Гашев, М.Н.Казанцева, А.В. Соромотин. – Saarbrucken: LAP LAMBERT, 2012. – 69 с.
24. Гашева М.Н. Состояние растительности как критерий нарушенности лесных биоценозов при нефтяном загрязнении / М.Н. Гашева, А.В. Соромотин, С.Н. Гашев // Экология. – 1990. – № 2. – С. 77–78.
25. Геннадиев А.Н. Динамика загрязнения почв полициклическими ароматическими углеводородами и индикация состояния почвенных экосистем / А.Н. Геннадиев и др. // Почвоведение – 1990. – № 10. – С. 75-85.
26. Геннадиев А.Н. Нефть и окружающая среда / А.Н. Геннадиев // Вестник Московского университета. Серия 5. География. –2009. – № 6. – С. 30-39.
27. Геннадиев А.Н., Пиковский Ю.И., Цибарт А.С., Смирнова М.А.

- Углеводороды в почвах: происхождение, состав, поведение (ОБЗОР) / А.Н. Геннадиев, Ю.И. Пиковский, А.С. Цибарт, М.А. Смирнова // Почвоведение. – 2015. – № 10. – С. 1195-1209.
28. Гилязов М.Ю. Изменение некоторых агрохимических свойств выщелоченного чернозема при загрязнении его нефтью / М.Ю. Гилязов // Агрохимия. – 1980. – Т. 12. – С. 72-75.
29. Гилязов М.Ю. Агроэкологическая характеристика и приемы рекультивации нефтезагрязненных черноземов Республики Татарстан: монография / М. Ю. Гилязов, И. А. Гайсин. – Казань : Фэн, 2003. – 227 с.
30. Гилязов М.К. Нефтезагрязненные почвы Республики Татарстан и приемы их рекультивации: монография / М.Ю. Гилязов, А.Х. Яппаров, И.А. Гайсин. – Казань: Центр инновационных технологий, 2008. – 244 с.
31. Глазовская М.А. Скорости самоочищения почв от нефти в различных природных зонах / М.А. Глазовская, Ю.И. Пиковский // Природа. – 1980. – № 5. – С. 118–119.
32. Глазовская М.А. Геохимия природных и техногенных ландшафтов: Учеб. пособие / М.А. Глазовская –М.: Географический факультет МГУ, 2007. – 350 с.
33. Глянцева Ю. С. Влияние нефтезагрязнения почв на рост и развитие растений / Ю. С. Глянцева // Биологическая рекультивация и мониторинг нарушенных земель : материалы IX Всероссийской научной конференции с международным участием, Екатеринбург, 20-25 августа 2012 г. – Екатеринбург: Издательство Уральского университета, 2012. – С. 36-41.
34. Горшков М.В. Экологический мониторинг / М.В. Горшков. – Владивосток: ТГЭУ, 2010. – 313 с.
35. Головин В.В. Оценка влияния нефти и нефтепродуктов на биогеоценозы Северного Прикаспия: автореф. дис... д-ра биол. наук /

- В.В. Головин. – М., 2006 – 48 с.
- 36.ГОСТ 17.4.4.02-2017. Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. – Москва : Стандартинформ, 2017. – 21 с.
- 37.ГОСТ 5180-2015. Грунты. Методы лабораторного определения физических характеристик. – Москва : Стандартинформ, 2015. – 20 с.
- 38.ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. – Москва : Стандартинформ, 2011. – 32 с.
- 39.ГОСТ Р 58596-2019. Почвы. Методы определения общего азота. – Москва : Стандартинформ, 2019. – 11 с.
- 40.ГОСТ 26951-86. Почвы. Определение нитратов ионометрическим методом. – Москва : Стандартинформ, 2015. – 10 с.
- 41.ГОСТ 26483-85. Почвы. Приготовление солевой вытяжки и определение ее pH по методу ЦИНАО. – Москва : Стандартинформ, 2015. – 6 с.
- 42.ГОСТ 26213-91. Почвы. Методы определения органического вещества. – Москва : Стандартинформ, 2018. – 8 с.
- 43.ГОСТ 26261-84. Почвы. Методы определения валового фосфора и валового калия. – Москва : Стандартинформ, 2018. – 13 с.
- 44.ГОСТ 26204-91. Почвы.Определение подвижных соединений фосфора и калия по методуЧирикова в модификации ЦИНАО.– Москва : Стандартинформ, 2018. – 8 с.
- 45.ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести (с Изменениями N 1, 2).– Москва : Стандартинформ, 2011. – 32 с.
- 46.Гриднева В.В.Деструкция нефтяных углеводородов микроорганизмами северного каспия в условиях пониженных температур / В.В. Гриднева, И.Ю. Куликова // Альманах современной науки и образования. – 2009. –№ 11 (30): в 2-х ч. Ч. I.– С. 116-118.

47. Гусейнов Д.М. Содержание подвижных питательных элементов в нефтепромысловых почвах Апшерона, подлежащих рекультивации / Д.М. Гусейнов, Ф.Г. Ахундов // Материалы докл. расшир. совещ. по окультуриванию и рекультивации почв Закавказья. Кировабад. – 1975. – С. 26.
48. Давыдова С.Л. Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами: Учеб. пособие / С.Л. Давыдова, В.И. Тагасов. – М.: Изд-во РУДН, 2006. – 156 с.
49. Дагуров А.В. О механизме антидотного действия гуматов по отношению к нефтепродуктам / А.В. Дагуров и др. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2005. – № 6(44). – С. 143-146.
50. Дударев А.А. Персистентные полихлорированные углеводороды и тяжелые металлы в арктической биосфере: основные закономерности экспозиции репродуктивное здоровье коренных жителей / А.А. Дударев // Биосфера. – 2009. – № 2 (1). – С. 186-202.
51. Дядечко В.Н. О биологической рекультивации нефтезагрязненных лесных почв Среднего Приобья / В.Н. Дядечко, Л.Е. Толстокорова, С.Н. Гашев, М.Н. Гашева, А.В. Соромотин, Е.Б. Жданова // Почвоведение. – 1990. – № 9. – С. 148-151.
52. Евдокимова Г.А. Воздействие загрязнения почв дизельным топливом на растения и ризосферную микробиоту / Г.А. Евдокимова, Н.П. Мозгова, М.В. Корнейкова, Е.М. Ахтулова, И.В. Михайлова // Агрохимия. – 2007. – № 12. – С. 49-55.
53. Евдокимова Г.А. Способы биоремедиации почв Кольского Севера при загрязнении дизельным топливом / Г.А. Евдокимова, Н.П. Мозгова, И.В. Михайлова // Агрохимия. – 2009. – № 6. – С. 61-66.
54. Еремин Д.И. Окислительно-восстановительный потенциал луговых почв Тобол-Ишимского междуречья Зауральского плато / Д.И. Еремин // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2008. – № 2. – С. 65-67.

- 55.Ершов Э.Д.Оценочный прогноз изменения глубины сезонного оттаивания и промерзания под влиянием нефтяного загрязнения / Э.Д.Ершов, Ю.А.Нефедьева,Р.Г. Мотенко, С.Ю. Пармузин // Материалы международной конференции Криогенные ресурсы полярных регионов. – Т. 2. – Салехард, 2007. – С. 217-220.
- 56.Заболотских В.В. Экспресс-диагностика токсичности почв, загрязненных нефтепродуктами / В.В.Заболотских, А.В.Васильев, С.Н. Танких // Изв. Самарского научного центра РАН. – 2012. – Т. 14. – № 1(3). – С. 734-738.
- 57.Завалин А.А. Азот в агросистеме на черноземных почвах / А.А. Завалин, О.А. Соколов, Н.Я. Шмырева. – М.: РАН, 2018. – 180 с.
- 58.Завгородняя Ю.А. Содержание летучих углеводородов в нефтезагрязненных ландшафтах Западной Сибири / Ю.А. Завгородняя, Д.С. Соколова //Электронный научный журнал «Георесурсы. Геоэнергетика. Геополитика». – 2011. – №1(3). – С. 1-10.
- 59.Захарова Н.Н. Посевные качества и полевая всхожесть семян яровой мягкой пшеницы / Н.Н. Захарова, Н.Г. Захаров // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2016. – №. 4 (36).– С.17-23.
- 60.Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Д.Г.Звягинцев, И.В.Асеева, И.П. Бабьева.–М.: Изд-во МГУ, 1980.– 224 с.
- 61.Звягинцев Д.Г. Роль микроорганизмов в биогеоценотических функциях почв / Д.Г.Звягинцев и др. // Почвоведение.–1992. –№ 6.– С. 63-77.
- 62.Земельный кодекс Российской Федерации от 25.10.2001 № 136-ФЗ (ред. от 27.12.2019).
- 63.Зинченко, А.И. Растениеводство: Учебник / А. И. Зинченко, В. Н. Салатенко, М. А. Белоножко. Под ред. А. И. Зинченко. – К.: Аграрное образование, 2001. –591 с.
- 64.Исмаилов Н.М. Микробиологическая и ферментативная активность

- нефтезагрязненных почв / Н.М. Исмаилов // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. – М.: Наука, 1988. – С. 42-56.
65. Исмаилов Н. М. Современное состояние методов рекультивации нефтезагрязненных земель / Н.М. Исмаилов, Ю.И. Пиковский // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. – М.: Наука, 1988. – С. 222-230.
66. Исмаилов Н.М. Процессы самоочищения нефтезагрязненных почв и пути их интенсификации: автореф. дис... д-ра биол. наук / Н.М. Исмаилов. – М., 1990 – 47 с.
67. Казанцева М. Н. Характеристика нефтяного загрязнения территории Мамонтовского месторождения нефти / М.Н. Казанцева, А.П. Казанцев, С.Н. Гашев // Вестник экологии, лесоведения и ландшафтоведения. – Тюмень: Изд-во ИПОС СО РАН. – 2001. – №. 2. – С. 86-90.
68. Калачникова И.Г. Влияние нефтяного загрязнения на экологию почв и почвенных микроорганизмов / И.Г. Калачникова и др. // Экология и популяционная генетика микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР. – 1987. – С. 23-26.
69. Капелькина Л.П. Экосистемный подход к установлению региональных нормативов допустимого остаточного уровня содержания нефтепродуктов в почвах болотных ландшафтов / Л.П. Капелькина // Тез. докл. конф. «Экобиотехнология. Борьба с нефтяным загрязнением окружающей среды». – Пущино, 29–30 января 2001 г. – С. 9-10.
70. Каретин Л.Н. Чернозёмные и луговые почвы Тобол-Ишимского междуречья. – Новосибирск: Наука, 1982. – 292.
71. Каретин Л.Н. Почвы Тюменской области. – Новосибирск: Наука, 1990. – 286 с.
72. Кауричев И.С. Окислительно-восстановительные процессы и их роль в генезисе и плодородии почв / И.С. Кауричев, Д.С. Орлов. – М: Колос, 1982. – 247 с.

- 73.Киреева Н.А. Фиторемедиация как способ очищения почв, загрязнённых тяжёлыми металлами / Н.А. Киреева, А.С. Григориади, Ф.Я. Багаутдинов // Теоретическая и прикладная экология. – 2011. – № 3. – С. 4-10.
- 74.Кирий О.А. Использование углеводородокисляющих бактерий при биоремедиации нефтезагрязнённых почв и вод: монография / О.А.Кирий и др. – Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета, 2013. – 140 с.
- 75.Кобянский, В. Д. Рожь: монография / В. Д. Кобянский. – М.: Колос, 1982. – 271 с.
- 76.КовалеваЕ.И. Экологические функции болотных экосистем (на примере острова Сахалин) / Е.И.Ковалева, А.С.Яковлев//Экология и промышленность России. – 2017. – Т.21, №12. – С.32-37.
- 77.КодинаЛ.А.Геохимическая диагностика нефтяного загрязненияпочвы / Л.А.Кодина// Восстановление загрязнённых почвенных экосистем. – М.: Наука, 1988. – С.112–122.
- 78.Колесниченко А.В. Процессы биodeградации в нефтезагрязнённых почвах / А.В. Колесниченко, А.И. Марченко, Т.П. Побежимова, В.В. Зыкова. – Москва: «Промэкобезопасность», 2004. – 194 с.
- 79.Кольцова Т.Г. Оценка фитотоксичности черноземных почв в условиях нефтяного загрязнения / Т.Г. Кольцова и др. //Вестник Казанского технологического университета. – 2014. – Т. 17. – №. 15. – С.261-267.
- 80.Кольцова Т.Г. Влияние нефтяного загрязнения на фитотоксичность дерново-карбонатных почв / Т.Г. Кольцова и др. //Вестник Казанского технологического университета. – 2015. – Т. 18. – №. 1.– С.376-382.
- 81.Кондратьева Л.М. Загрязнение р. Амур полиароматическими углеводородами / Л.М.Кондратьева, Н.К.Фишер, О.Ю.Стукова, Г.Ф. Золотухина // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. –2007. –№ 4. –С. 17-26.
- 82.Копылова Л.В. Аккумуляция железа и марганца в листьях древесных

- растений в техногенных районах Забайкальского края / Л.В. Копылова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2010. – № 1-3(12). – С.709-712.
83. Коркина Е.А. Самовосстановление нарушенных техногенезом почв Среднего Приобья: Монография / отв. ред. Г.Н.Гребенюк. – Нижневартовск: Изд-во НВГУ, 2015. – 158 с.
84. Королёв В.А. Электрокинетическая очистка почв от углеводородов как фактор улучшения качества ресурса геологического пространства урбанизированных территорий. / В.А.Королёв, О.В. Романюха // Материалы годичной сессии Научного совета РАН по проблемам геоэкологии, инженерной геологии и гидрогеологии. – М.: ГЕОС, 2006. – С. 128-131.
85. Коронелли Т.В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводородов в окружающей среде / Т.В.Коронелли // Прикладная биохимия и микробиология. – 1996. – Т. 32, № 6. – С.579-585.
86. Коршунова Т.Ю. Микробиологические технологии ликвидации нефтезагрязнений в различных климатических условиях: диссертация ... доктора биологических наук: 03.01.06 / Т.Ю. Коршунова. – Уфа, 2019 – 47 с.
87. Красильников Н.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения / Н.А.Красильников. – М., 1958. – 462 с.
88. Кувшинская Л. В. Техногенез при добыче нефти / Л. В. Кувшинская, Г. А. Воронов, С. А. Бузмаков // Геохимия биосферы : тез. III междунар. совещ. Ростов-на-Дону. Изд-во ростовского ун-та. – 2001. – С. 215.
89. Кузнецов А.Е. Научные основы экобиотехнологии: учебное пособие / А.Е.Кузнецов, Н.Б.Градова. – М.: Мир, 2006. – 504 с.
90. Кулагин А.А. О безопасности использования технологии рекультивации нефтезагрязненных, нарушенных и деградированных земель с применением гуминовых препаратов / А.А.Кулагин,

- И.Г.Ганеев, С.В.Сухова, З.У. Зиганшин // Известия Уфимского научного центра РАН.– 2015. – №4(1). – С. 83-85
- 91.Курицын А.В. Биоремедиация нефтезагрязненных грунтов на технологических площадках / А.В. Курицын,Т.В. Курицына, И.В. Катаева //Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т. 13. – № 1-5. – С.1271-1273.
- 92.Леднев А.В. Влияние нефтяного загрязнения на физико-химические свойства дерново-подзолистой суглинистой почвы / А.В. Леднев // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. Научный журнал Северо-Восточного научно-методического центра Россельхозакадемии.–2006.– № 8.– С.90-94.
- 93.Леднев А.В. Изменение свойств почв Среднего Предуралья под действием продуктов нефтедобычи и приемы их рекультивации. – Ижевск: ФГОУ ВПО Ижевская ГСХА, 2008. – 174 с.
- 94.Лесной кодекс Российской Федерации от 04.12.2006 № 200-ФЗ (ред. от 27.12.2018).
- 95.Лобачева Г.К. Способ создания биохимических барьеров путем рекультивации земель, загрязненных продуктами нефтепереработки / Лобачева Г. К. и др. // Вестник ВолГУ. – 2012. – №. 6 (10). – С.119-133.
- 96.Логинов О.Н. Биотехнологические методы очистки окружающей среды от техногенных загрязнений / О.Н. Логинов – Уфа: «Реактив», 2000. – 100 с.
- 97.Логинова О.О. Использование штаммов рода *Acinetobacter* для биоремедиации нефтезагрязненных почв на территории Воронежской области / О.О.Логинова,Т.Т. Данг,Е.В. Белоусова, М.Ю. Грабович // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2011. – № 2. – С. 127-133.
- 98.Магеррамов А.М. Нефтехимия и нефтепереработка. Учебник для высших учебных заведений / А.М.Магеррамов,Р.А. Ахмедова,Н.Ф. Ахмедова. –Баку: Издательство «Баки Университети», 2009. – 660 с.

99. Мадякин В.Ф. Технология детоксикации и рекультивации площадок нефтедобычи, выведенных из промышленного оборота / В.Ф. Мадякин и др. // Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – Т. 15. – № 24. – С. 118-121.
100. Максимов Е. А. Исследование технологии электрокинетической очистки грунтов от радионуклидов, тяжелых металлов и углеводородов / Е.А.Максимов, О.С. Пташкина-Гирина, В.В.Старших // Альтернативная энергетика и экология (ISJAEE). – 2014. – № 5. – С. 69-73.
101. Медведев А.В. Исследование возможности применения метода пиролиза для утилизации нефтяных отходов // Вестник евразийской науки. – 2014. – №. 5 (24).
102. Минникова Т.В. Влияние азотных и гуминовых удобрений на биохимическое состояние нефтезагрязненного чернозема / Т.В. Минникова, С.И.Колесников, Т.В.Денисова // Юг России: экология, развитие. – 2019. – №. 2. – С.189-201.
103. Мироненко В.А. Проблемы гидрогеоэкологии. В 3 т. Т. 3 (кн. 2). Прикладные исследования [Электронный ресурс] : [монография] / В.Г. Румынин, В.А. Мироненко. – 2-е изд., стер. – М.: Издательство Московского государственного горного университета, 2002 . – 508 с.
104. Мосичев М.С. Общая технология микробиологических производств / М.С.Мосичев, А.А. Складнее, В.Б. Котов. – М., 1982. – 264 с.
105. Назаров А.В. Способ фиторекультивации нефтезагрязненных почв / А.В.Назаров, С.А.Иларионов, В.А.Сергеев и др. Патент РФ № 2225086 С1. 2004.
106. Назаров А.В. Изучение причин фитотоксичности нефтезагрязненных почв / А.В. Назаров, С.А.Иларионов // Письма в Международный научный журнал «Альтернативная энергетика и экология». – 2005. – № 1. – С. 60–65.
107. Назаров А.В. Влияние нефтяного загрязнения почв на растения /

- А.В. Назаров // Вестник пермского университета. Биология. –2007. – № 5 (10). –С.134-141.
108. Назаров М.В. Рекультивация нефтезагрязненных грунтов в зоне деятельности нефтехимических предприятий /М.В.Назаров,М.С. Клявлин, В.Ю.Разумов // Нефтегазовое дело: Экология и промбезопасность. –2014, –т. 12, № 4. – С.167-171.
109. Нариманидзе Э.И. Особенности диффузии солей в почвах: автореф. дис... канд. биол. наук / Э.И. Нариманидзе. – М., 1993 – 26 с.
110. Орлов Д.С. Методы контроля почв, загрязненных нефтепродуктами /Д.С.Орлов, Я.М.Аммосова // Почвенно-экологический мониторинг. – М., 1994.–С. 219-231.
111. Петухов В.Н. Биотестирование почвы и воды, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, с помощью растений /В.Н.Петухов,В.М. Фомченков, В.А. Чугунов и др. // Прикл. биохимия и микробиология. – 2000. –Т. 36, № 6. – С.652–655.
112. Пиковский Ю.И. Трансформация техногенных потоков нефти в почвенных экосистемах / Ю.И. Пиковский //Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. –М.: Наука, 1988. – С.7-22.
113. Пиковский Ю. И. Природные техногенные потоки углеводов в окружающей среде. –М.: Изд-во Моск. ун-та, 1993.– 208 с.
114. Плешакова Е.В. Сравнение эффективности интродукции нефтеокисляющего штамма *Dietzia maris* и стимуляции естественных микробных сообществ для ремедиации загрязнённой почвы /Е.В.Плешакова,Е.В. Дубровская, О.В.Турковская // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44, № 4. – С. 430-437.
115. Плотникова М.Д. Перспективы использования водных композиций поверхностно-активных веществ для очистки нефтезагрязненных грунтов /М.Д.Плотникова,М.Г. Щербань, Н.А. Медведева // Географический вестник. –2016. –№ 3 (38). –С.114-121.
116. ПНД Ф 16.1:2.2.22-98. Количественный химический анализ почв.

- Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в минеральных, органогенных, органоминеральных почвах и донных отложениях методом ИК-спектроскопии.
117. Постановление Правительства РФ от 10.07.2018 №800 (ред. от 07.03.2019) «О проведении рекультивации и консервации земель».
118. Работнов Т.А. Фитоценология. – М.: Изд.-во МГУ, 1978. – 383 с.
119. Ревенкова А.И. Озимая рожь / А.И. Ревенкова. – М.: Колос, 1978. – 196 с.
120. Ренев Е.П. Оценка основных показателей плодородия почв наиболее пригодных для расширения пахотных угодий в тюменской области /Е.П. Ренев,Д.И. Ерёмин, Д.В. Ерёмина // Достижения науки и техники АПК. – 2017. – Т. 31. – № 4. – С. 27-31.
121. Реутов О.А. Органическая химия [Электронный ресурс] : в 4 ч. Ч. 1 / О. А. Реутов, А. Л. Курц, К. П. Бутин. – 4-е изд. (эл.). – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 567 с.
122. Реутов О.А. Органическая химия [Электронный ресурс] : в 4 ч. Ч. 2 / О. А. Реутов, А. Л. Курц, К. П. Бутин. – 4-е изд. (эл.). – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 623 с.
123. Рогозина Е.А. Балансовая сторона и динамика утилизации микроорганизмами нефтяного загрязнения почвы /Е.А.Рогозина, Г.М. Калимуллина // Нефтегазовая геология. Теория и практика. – 2009. – Т.4. – №2. – С.10.
124. Романенко В.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов /В.И.Романенко, С.И. Кузнецов.– Л.: Наука, 1974. – 194 с.
125. Салангинас Людмила Алексеевна. Изменение свойств почв под воздействием нефтезагрязнения и разработка системы мер по их реабилитации : Дис. ... д-ра биол. наук : 06.01.03 : Екатеринбург, 2003 486 с. РГБ ОД, 71:04-3/114
126. Сваровская Л. И. Физико-химические процессы биотрансформации нефти в почве и воде /Л.И. Сваровская,В.С. Овсянникова,

- А.Г.Щербакова //Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность-2017. – 2017. – С.1195-1199.
127. Середина В.П. Особенности миграции и аккумуляции нефти и нефтепродуктов в почвах южной тайги Западной Сибири / В.П. Середина, В.Н. Харахордин, А.И.Непотребный //Материалы 5-го Всерос. съезда общества почвоведов. Ростов-на-Дону.– 2008. – С. 61.
128. Середина В. П. Прогнозно-эволюционные аспекты посттехногенных трансформаций почв нефтезагрязненных экосистем южной тайги Западной Сибири /В.П. Середина, А.И.Непотребный//Эволюция почвенного покрова. История идей и методы, голоценовая эволюция, прогнозы/отв. ред. ИВ Иванов. ЛС Песочина. Пушкино. – 2009. – С. 292-293.
129. Синдирева А.В.Использование газонных трав для фиторемедиации почв, загрязненных нефтепродуктами /А.В. Синдирева,С.Б. Ловинецкая, В.В.Гейс // Вестник Омского государственного аграрного университета. –2016. –№ 1 (21). –С.92-97.
130. Славнина Т.П. Влияние загрязнения нефтью и нефтепродуктами на свойства почв //Мелиорация земель Сибири. Красноярск. – 1984. – С. 312-340.
131. Соколова Т.А. Сорбционные свойства почв. Адсорбция. Катионный обмен: учебное пособие по некоторым главам химии почв /Т.А.Соколова, С.Я.Трофимов. – Тула: Гриф и К, 2009. – 172с.
132. Солнцева Н. П. Добыча нефти и геохимия природных ландшафтов. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1998. – 369 с.
133. Соромотин А.В. Солевое загрязнение таежных биогеоценозов при нефтедобыче в Среднем Приобье / А.В. Соромотин,С.Н. Гашев, М.Н. Казанцева //Проблемы географии и экологии Западной Сибири. – 1996. – С. 121-131.
134. Соромотин А.В.Нефтяное загрязнение земель в зоне средней тайги Западной Сибири / А.В.Соромотин // Экология и промышленность

России. – 2004. – №8. – С. 8-11.

135. Соромотин А.В. Техногенная трансформация природных экосистем таежной зоны в процессе нефтегазодобычи : на примере Тюменской области : диссертация ... доктора биологических наук : 03.00.16 / Соромотин Андрей Владимирович; [Место защиты: Тюмен. гос. ун-т]. - Тюмень, 2007. - 442 с.
136. Стихин М.Ф. Озимая рожь /М.Ф. Стихин, В.П. Денисов. Л.: Колос, 1977. – 215 с.
137. Ступин Д.Ю. Загрязнение почв и новейшие технологии их восстановления: Учебное пособие. – СПб.: Издательство «Лань», 2009. – 432 с.
138. Сулейманов Р.Р. Изменение буферности почв при загрязнении нефтепромысловыми водами и сырой нефтью /Р.Р.Сулейманов, Ф.И. Назырова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2007. – №4. – С.133-139.
139. Трофимов С.Я. Влияние нефти на почвенный покров и проблема создания нормативной базы по влиянию нефтезагрязнения на почвы / С.Я.Трофимов и др. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 17. Почвоведение. – 2000. – № 2. – С.30-34.
140. Трофимов С.Я. Миграция нефти и ее компонентов по профилю торфяной верховой почвы в условиях модельного эксперимента /С.Я.Трофимов и др. // Вестник Московского университета. Серия 17. Почвоведение. – 2008. – № 1. – С. 25-28.
141. Фахрутдинов А.И. Результаты рекультивации нефтезагрязненных территорий с применением бактериального препарата /А.И.Фахрутдинов, В.Г. Алехин, Л.А. Малышкина // Наука и образование XXI века: Сборник тезисов докладов Второй окружной конференции молодых ученых ХМАО. Ч. 1. – Сургут: Изд-во СурГУ, 2001. – С.55-56.
142. Федеральный закон от 30 марта 1999 г. №52-ФЗ «О санитарно-

- эпидемиологическом благополучии населения».
143. Федеральный закон от 10 января 2002 г. №7-ФЗ «Об охране окружающей среды».
144. Федотова А.С. Технологические аспекты очистки и рекультивации почв агробиоценозов при нефтеразливах /А.С. Федотова, В.М. Мелкозеров // Вестник Красноярского государственного аграрного университета.–2017. –№ 1. –С.85-91.
145. Фомченков В.М. Биотестирование интегральной токсичности загрязненных почв и вод /В.М.Фомченков и др. // Химико-фармацевтическое производство. Обзорная информация. Вып. 3. –М.: НИИЭМП, 1996. –31 с.
146. Хазиев Ф.Х. Изменение биохимических процессов в почвах при нефтяном загрязнении и активизация разложения нефти /Ф.Х.Хазиев,Ф.Ф. Фатхиев //Агрохимия. –1981. – № 10. – С.102-111.
147. Хазиев Ф.Х. Влияние нефтяного загрязнения на некоторые компоненты экосистемы /Ф.Х.Хазиев,Е.И. Тишкина, Н.А. Киреева и др. // Агрохимия. –1988. –№ 2. – С.56-61.
148. Цвелёв Н.Н. *Secale cereale* L. – Рожь посевная // Злаки СССР / отв. ред. Ан. А. Фёдоров. – Л.: Наука, 1976. – 788 с.
149. Цомбуева Б.В. Влияние деятельности нефтедобывающего комплекса на загрязнение земель юго-востока Республики Калмыкия: автореф. дис... канд. хим. наук: 03.02.08 / Цомбуева Баира Викторовна. – Иваново, 2017. – 16 с.
150. Цхадая Н.Д. Реагентное капсулирование нефтезагрязненных отходов с полезным использованием конечных продуктов технологии / Н.Д. Цхадая и др.//Известия Коми научного центра УРО РАН. – 2010. – №1(1). – С.72-75.
151. Черножуков Н.И. Химия нефти и нефтяных газов /Н.И.Черножуков,С.Н. Обрядчиков. – М.: Гостехиздат, 1946. – 254 с.
152. Чижов Б.Е. Рекультивация нефтезагрязненных земель Ханты-

- Мансийского автономного округа (практические рекомендации). – Тюмень: Изд-во ТюмГУ, 2000. – 52 с.
153. Шевцова Е.В. Исследование и разработка физико-химических основ технологии электрокинетической очистки грунтов от радионуклидов: диссертация канд. техн. наук. / Е.В. Шевцова. – Москва, 2003. – 123 с.
154. Яковченко М. А. Воспроизводство плодородия почв: исследование влажности и реакции почвенной среды /М.А. Яковченко, М.С. Дрёмова // Вестник Курганской ГСХА. –2012. – № 4. –С. 23-25.
155. Янкевич М.И. Формирование ремедиационных биоценозов для снижения антропогенной нагрузки на водные и почвенные экосистемы : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М.: 2002. – 50 с.
156. Agbogidi O. M. et al. Evaluation of crude oil contaminated soil on the mineral nutrient elements of maize (*Zea mays* L.) //Journal of Agronomy. – 2007.– Т. 6. – №. 1. – P.188-193.
157. Aggarwal P. K., Means J. L., Hinchee R. E. Formulation of nutrient solutions for in situ bioremediation //In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation. – 1991. – Т. 1. – P. 51-66.
158. Aislabie J. M. et al. Hydrocarbon spills on Antarctic soils: effects and management //Environmental science & technology. – 2004. – Т. 38. – №.5. – P. 1265-1274.
159. Aken B. V., Correa P. A., Schnoor J. L. Phytoremediation of polychlorinated biphenyls: new trends and promises //Environmental science & technology. – 2010. – Т. 44. – №. 8. – С. 2767-2776.
160. Akgerman A. Supercritical fluid extraction of contaminants from environmental matrices //Waste Management. – 1993. – Т. 13. – №. 5-7. – P. 403-415.
161. Akpan G. U., Ekpo M. A. Effect of diesel oil pollution on the physico-chemical Properties and Microbial Pollution of ultisol, Uyo, South-South Nigeria //Journal of Agriculture, Food and Environment. – 2006. – Т. 3. –

- №. 182. – P. 122-126.
162. Akpan G. U., Udoh B. T. Evaluation of some properties of soils affected by diesel oil pollution in uyo, Niger Delta Area, Nigeria //Evaluation. – 2013. – T. 3. – №. 8. –P. 33-43.
163. Akubugwo E. I. et al. Physicochemical properties and enzymes activity studies in a refined oil contaminated soil in Isiukwuato, Abia State, Nigeria //Biokemistri. – 2009. – T. 21. – №. 2. – P. 79-84.
164. Aldrett S. et al. Degradation of crude oil enhanced by commercial microbial cultures //International Oil Spill Conference. – American Petroleum Institute, 1997. – T. 1997. – №. 1. – P. 995-996.
165. Alexander M. et al. Bioremediation technologies //Biodegradation and bioremediation. – 1994. – P. 248-271.
166. Alexander M. How toxic are toxic chemicals in soil? // Environmental Science & Technology. – 1995. – T. 29. – №. 11. – P. 2713-2717.
167. Al-Marzouqi A. H. et al. Supercritical fluid extraction for the determination of optimum oil recovery conditions //Journal of Petroleum Science and Engineering. – 2007. – T. 55. – №. 1-2. – P. 37-47.
168. Amadi E. N., Okol J. C., Odu C. T. I. Optimising Crude oil degradation in a sandy soil: Effects of urea-nitrogen and phosphoric acid //Phosphorus. J. Niger. Environ. Soc. – 2005. – T. 2. – №. 3. – P. 322-329.
169. Anderson J. W. et al. Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish //Marine biology. – 1974. – T. 27. – №. 1. – C. 75-88.
170. Andreoni V., Gianfreda L. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats //Applied Microbiology and Biotechnology. – 2007. – T. 76. – №. 2. – P. 287-308.
171. Atlas R. M., Bartha R. Biodegradation of petroleum in seawater at low temperatures //Canadian Journal of Microbiology. – 1972. – T. 18. – №. 12. – P. 1851-1855.
172. Atlas R. M. Effects of temperature and crude oil composition on

- petroleum biodegradation //Applied microbiology. – 1975. – T. 30. – №. 3. – P. 396-403.
173. Atlas R. M. et al. Biodegradation of crude oil by Tundra soil microorganisms Proceedings of the 4th International Biodegradation Symposium //Applied Science Publs. Ltd. – 1978. – C. 21-26.
 174. Balba M. T., Al-Awadhi N., Al-Daher R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation //Journal of microbiological methods. – 1998. – T. 32. – №. 2. – P. 155-164.
 175. Bamforth S. M., Singleton I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions //Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology. – 2005. – T. 80. – №. 7. – P. 723-736.
 176. Banks M. K., Schultz K. E. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soils //Water, air, and soil pollution. – 2005. – T. 167. – №. 1. – P. 211-219.
 177. Baran S. et al. Trace metals and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediment samples from the Narew River (Poland) //Polish Journal of Environmental Studies. – 2002. – T. 11. – №. 4. – P. 299-306.
 178. Barnes D.L., Chuvilin E. Migration of Petroleum in PermafrostAffected Regions // Soil Biol. –2009. –V. 16. – P. 263–278.
 179. Bayat J. et al. Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons on agricultural lands surrounding Tehran oil refinery //Environmental monitoring and assessment. – 2015. – T. 187. – №. 7. – C. 1-15.
 180. Benka-Coker M. O., Ekundayo J. A. Effects of an oil spill on soil physico-chemical properties of a spill site in the Niger Delta Area of Nigeria //Environmental Monitoring and Assessment. – 1995. – T. 36. – №. 2. – P.93-104.
 181. Bento F. M. et al. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil //Brazilian journal of Microbiology. – 2003. – T. 34. – C. 65-68.

182. Benyahia F. et al. Bioremediation of crude oil contaminated soils: A black art or an engineering challenge? //Process Safety and Environmental Protection. – 2005. – T. 83. – №. 4. – P. 364-370.
183. Brassington K. J. et al. Weathered hydrocarbon wastes: a risk management primer //Critical Reviews in Environmental Science and Technology. – 2007. – T. 37. – №. 3. – P. 199-232.
184. Caravaca F., Roldan A. Assessing changes in physical and biological properties in a soil contaminated by oil sludges under semiarid Mediterranean conditions //Geoderma. – 2003. – T. 117. – №. 1-2. – P. 53-61.
185. Castelo-Grande T., Barbosa D. Soil Decontamination By Supercritical Extraction // Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry.–2003. – T.2.P. 331-336.
186. Chesworth, W. Encyclopedia of soil science. – Dordrecht, Netherlands : Springer, 2008. – 646 p.
187. Chiara A. et al. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance //Science of the Total Environment. – 2009. – T. 407. – №. 8. – P. 3024-3032.
188. Cunningham S. D., Ow D. W. Promises and prospects of phytoremediation //Plant physiology. – 1996. – T. 110. – №. 3. – P. 715.
189. Delille D., Duval A., Pelletier E. Highly efficient pilot biopiles for on-site fertilization treatment of diesel oil-contaminated sub-Antarctic soil //Cold Regions Science and Technology. – 2008. – T. 54. – №. 1. – P. 7-18.
190. Dietz A. C., Schnoor J. L. Advances in phytoremediation //Environmental health perspectives. – 2001. – T. 109. – №1. – P. 163-168.
191. Dimitrow D. N., Markow E. Behaviour of available forms of NPK in soils polluted by oil products. Poczwoznanie //Agrochimija I Ekologia. – 2000. – T. 35. – №. 3. – P. 3-8.
192. Eastcott L. et al. Modeling petroleum products in soils //Petroleum

- contaminated soils: Volume 1 remediation techniques and environmental fate risk assessment. – 1989. – P. 63-79.
193. Ekperusi O. A., Aigbodion F. I. Bioremediation of petroleum hydrocarbons from crude oil-contaminated soil with the earthworm: *Hyperiodrilus africanus* // *Biotech.* – 2015. – T. 5. – №. 6. – P. 957-965.
 194. Ekundayo E. O., Obuekwe O. Effects of an oil spill on soil physico-chemical properties of a spill site in a typic udipsamment of the Niger delta basin of Nigeria // *Environmental Monitoring and Assessment.* – 2000. – T. 60. – №. 2. – P. 235-249.
 195. EPA 1985. Emerging technology assessment of biological removal of phosphorus. EPA- 600/2-85-008, NTIS No. PB-85-165744. U.S., U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati. OH – 105 p.
 196. EPA. 1994. How To Evaluate Alternative Cleanup Technologies For Underground Storage Tank Sites. Chapter III. Bioventing. October. EPA 510-B-17-003.
 197. EPA 2004. How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites. Retrieved December 7, 2009, from <http://www.epa.gov/swerust1/pubs/tums.htm>
 198. EPA. 2006. In Situ Treatment Technologies for Contaminated Soil: Engineering Forum Issue Paper. OSWER. November. EPA 542-F-06-013.
 199. Ezeaku P. I., Egbemba B. O. Yield of maize (*Manoma* spp) affected by automobile oil waste and compost manure // *African Journal of Biotechnology.* – 2014. – T. 13. – №. 11. – P. 1250-1256.
 200. Fingas M. F. A literature review of the physics and predictive modelling of oil spill evaporation // *Journal of hazardous materials.* – 1995. – T. 42. – №. 2. – P. 157-175.
 201. Foght J. M. et al. Environmental gasoline-utilizing isolates and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* are taxonomically indistinguishable by chemotaxonomic and molecular techniques // *Microbiology.* – 1996. – T. 142. – №. 9. – P. 2333-2340.

202. Gordon G. et al. Oil spill effects on soil hydrophobicity and related properties in a hyper-arid region //Geoderma. – 2018. – T. 312. – P. 114-120.
203. Haritash A. K., Kaushik C. P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review //Journal of hazardous materials. – 2009. – T. 169. – №. 1-3. – C. 1-15.
204. Hawthorne S. B. et al. Determining PCB sorption/desorption behavior on sediments using selective supercritical fluid extraction. 3. Sorption from water //Environmental science & technology. – 1999. – T. 33. – №. 18. – P. 3152-3159.
205. Hawthorne S. B., Grabanski C. B. Correlating selective supercritical fluid extraction with bioremediation behavior of PAHs in a field treatment plot //Environmental science & technology. – 2000. – T. 34. – №. 19. – P. 4103-4110.
206. Hazen T. C. et al. Biopiles for remediation of petroleum-contaminated soils: a polish case study //The Utilization of Bioremediation to Reduce Soil Contamination: Problems and Solutions. – Springer, Dordrecht, 2003. – C. 229-246.
207. Huling S. G., Pivetz B. E. Engineering Issue: In-Situ Chemical Oxidation //United States Environmental Protection Agency. – 2006. – C. 1-60.
208. Hurtig H. W. et al. In-Situ Mobilisation of Residual Oil in Contaminated Soil–Development of a Method for Selecting Oil-Mobilising Surfactants //Contaminated Soil'88. – Springer, Dordrecht, 1988. – P. 921-928.
209. Husson O. Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil/plant/microorganism systems: a transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy //Plant and Soil. – 2013. – T. 362. – №. 1. – P. 389-417.
210. Hyman M., Dupont R. R. Groundwater and soil remediation: process design and cost estimating of proven technologies. – Reston, VA : ASCE press, 2001. – 559 p.

211. Illmer P., Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates—solubilization mechanisms //Soil Biology and Biochemistry. – 1995. – T. 27. – №. 3. – P. 257-263.
212. Inguanzo M. et al. On the pyrolysis of sewage sludge: the influence of pyrolysis conditions on solid, liquid and gas fractions //Journal of Analytical and Applied Pyrolysis. – 2002. – T. 63. – №. 1. – P. 209-222.
213. Kostecki P., Morrison R., Dragun J. Hydrocarbons // Encyclopedia of Soils in the Environment. – 2005. – P.217-226.
214. Kratzke, R., Major, W., Fahnestock, F. v., & Wickramanayake, G. Biopile Design, Operation, and Maintenance Handbook for Treating Hydrocarbon-Contaminated Soils. – Columbus, Ohio: Battelle Press, 1998. – 163 p.
215. Kucharski J., Jastrzebska E. Effects of heating oil on the count of microorganisms and physicochemical properties of soil //Polish Journal of Environmental Studies. – 2005. – T. 14. – №. 2. – P. 189-198.
216. Lakshmi M., Anandaraj V. P., Velan M. Bioremediation of phenanthrene by Mycoplasma sp. MVMB2 isolated from contaminated soil //CLEAN–Soil, Air, Water. – 2013. – T. 41. – №. 1. – P. 86-93.
217. Leahy J. G., Colwell R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment //Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 1990. –T. 54. – №. 3. – P. 305-315.
218. Lee M. D., Swindoll C. M. Bioventing for in situ remediation //Hydrological sciences journal. – 1993. – T. 38. – №. 4. – P. 273-282.
219. Lee R. F. Photo-oxidation and photo-toxicity of crude and refined oils //Spill Science & Technology Bulletin. – 2003. – T. 8. – №. 2. – P. 157-162.
220. Leeson A. et al. Optimizing bioventing in shallow vadose zones and cold climates //Hydrological sciences journal. – 1993. – T. 38. – №. 4. – C. 283-295.
221. Lehr J. H. et al. (ed.). Wiley's remediation technologies handbook: major contaminant chemicals and chemical groups. – John Wiley & Sons, 2004. – 1271 p.

222. Liao J., Wang J., Huang Y. Bacterial community features are shaped by geographic location, physicochemical properties, and oil contamination of soil in main oil fields of China //Microbial ecology. – 2015. – T. 70. – №. 2. – P. 380-389.
223. Liu P. W. G. et al. Effects of soil organic matter and bacterial community shift on bioremediation of diesel-contaminated soil //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2013. – T. 85. – P. 661-670.
224. Loehr R. C., McMillen S. J., Webster M. T. Predictions of biotreatability and actual results: soils with petroleum hydrocarbons //Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management. – 2001. – T. 5. – №. 2. – P. 78-87.
225. Mackay D. M., Roberts P. V., Cherry J. A. Transport of organic contaminants in groundwater //Environmental science & technology. – 1985. – T. 19. – №. 5. – P. 384-392.
226. Mann M. J. Full-scale and pilot-scale soil washing //Journal of hazardous materials. – 1999. – T. 66. – №. 1-2. – P. 119-136.
227. Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities //Chemosphere. – 2000. – T. 40. – №. 4. – P. 339-346.
228. McHugh M., Krukonis V. Supercritical fluid extraction: principles and practice. – Elsevier, 2013. – 608 p.
229. Mattingly G. E. G. Labile phosphate in soils //Soil Science. – 1975. – T. 119. – №. 5. – P. 369-375.
230. Mayer A. M., Poljakoff-Mayber A. The Germination of Seeds: Pergamon International Library of Science, Technology, Engineering and Social Studies. – Elsevier, 1982.– 224 p.
231. Miller D. J. et al. Solubility of polycyclic aromatic hydrocarbons in supercritical carbon dioxide from 313 K to 523 K and pressures from 100 bar to 450 bar //Journal of Chemical & Engineering Data. – 1996. – T. 41. – №. 4. – P. 779-786.

232. Muratova A. Y. et al. Phytoremediation of oil-sludge–contaminated soil //International Journal of Phytoremediation. – 2008. – T. 10. – №. 6. –P. 486-502.
233. Oghenejoboh K. M., Puyate Y. T. Experimental investigation of the effects of crude oil physical properties on its diffusion rate in soil medium // Control Pollution. – T. 26. – №. 2.– P.131-137.
234. Oje Obinna A., Ubani Chibuike S., Onwurah I. N. E. Variation in the carbon (C), phosphorus (P) and nitrogen (N) utiliztion during the biodegradation of crude oil in soil //J. Petrol. Environ. Biotechnol. – 2015. – T. 6. – №. 2.– 7 p.
235. Osuji L. C., Egbuson E. J., Ojinnaka C. M. Assessment and treatment of hydrocarbon inundated soils using inorganic nutrient (NPK) supplements: II. A case study of eneka oil spillage in Niger Delta, Nigeria //Environmental monitoring and assessment. – 2006. – T. 115. – №. 1. – P. 265-278.
236. Pinchin H. E. et al. In situ and microcosm investigations into the phytoremediation of hydrocarbon-contaminated lagoon sediments using phragmites australis //Journal of Environmental Engineering. – 2013. – T.139. – №. 4. – P. 488-495.
237. Ramadass K. et al. Evaluation of constraints in bioremediation of weathered hydrocarbon-contaminated arid soils through microcosm biopile study //International journal of environmental science and technology. – 2015. – T. 12. – №. 11. – P. 3597-3612.
238. Riffaldi R. et al. Soil biological activities in monitoring the bioremediation of diesel oil-contaminated soil //Water, air, and soil pollution. – 2006. – T. 170. – №. 1. – C. 3-15.
239. Robles-González I. V., Fava F., Poggi-Varaldo H. M. A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments //Microbial Cell Factories. – 2008. – T. 7. – №. 1. – P. 1-16.
240. Saadat S, Mirkhani R, Mohebi A, et al., Study on phytoremediation of soils polluted with heavy metals and oil pollutants in agricultural lands

- affected by Persian Gulf War (Khouzestan, fars, kohgiluyeh&boyrahmad and boushehr provinces). 2014.– 130 p.
241. Salanitro J.P. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil // *Advances Agronomy*. –2001. –V. 72. –P. 53-105.
 242. Semple K. T., Morriss A. W. J., Paton G. I. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis // *European journal of soil science*. – 2003. – T. 54. – №. 4. – P. 809-818.
 243. Seo J. S., Keum Y. S., Li Q. X. Bacterial degradation of aromatic compounds // *International journal of environmental research and public health*. – 2009. – T. 6. – №. 1. – P. 278-309.
 244. Siegrist R. L. Principles and practices of in situ chemical oxidation using permanganate. – Battelle Press, 2001. – 348 p.
 245. Sims R., Bass J. Review of in-place treatment techniques for contaminated surface soils. Volume 1. Technical evaluation. Final report, May 1982-September 1984. – JRB Associates, Inc., McLean, VA (USA), 1984. – №. PB-85-124881/XAB.
 246. Snelgrove J. Biopile bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soils from a Sub-Arctic site :дис. – McGill University Library, 2010.
 247. Stehlickova L. et al. Intensification of phenol biodegradation by humic substances // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2009. – T. 63. – №. 7. – P. 923-927.
 248. Suthersan S. S. et al. Remediation engineering: design concepts. – CRC press, 2016. – 627 p.
 249. Sutton N. B., Grotenhuis T., Rijnaarts H. H. M. Impact of organic carbon and nutrients mobilized during chemical oxidation on subsequent bioremediation of a diesel-contaminated soil // *Chemosphere*. – 2014. – T. 97. – P. 64-70.
 250. Udoetok I. A. Characterization of ash made from oil palm empty fruit

- bunches (oefb) //International Journal of Environmental Sciences. – 2012. – T. 3. – №. 1. – P. 518-524.
251. Uzoije A. P. et al. Physiochemical properties of soil in relation to varying rates of crude oil pollution //Journal of Environmental Science and Technology. – 2011. – T. 4. – №. 3. – P. 313-323.
 252. Venderbosch R. H., Prins W. Fast pyrolysis technology development //Biofuels, bioproducts and biorefining. – 2010. – T. 4. – №. 2. – C. 178-208.
 253. Verstraete W. et al. Modelling of the breakdown and the mobilization of hydrocarbons in unsaturated soil layers //Proceedings of the 3rd International Biodegradation Symposium, Applied Science Publishers Ltd., London. – 1976. – P. 99-112.
 254. Walworth J. L., Reynolds C. M. Bioremediation of a petroleum-contaminated cryic soil: Effects of phosphorus, nitrogen, and temperature //Soil and Sediment Contamination. – 1995. – T. 4. – №. 3. – P. 299-310.
 255. Wang W. Literature review on higher plants for toxicity testing //Water, Air, and Soil Pollution. – 1991. – T. 59. – №. 3. – P. 381-400.
 256. Wang X., Feng J., Zhao J. Effects of crude oil residuals on soil chemical properties in oil sites, Momoge Wetland, China //Environmental monitoring and assessment. – 2010. – T. 161. – №. 1. – P. 271-280.
 257. Wang Y. et al. Effects of crude oil contamination on soil physical and chemical properties in Momoge wetland of China //Chinese geographical science. – 2013. – T. 23. – №. 6. – P. 708-715.
 258. Wang S. et al. The harm of petroleum-polluted soil and its remediation research //AIP Conference proceedings. – AIP Publishing LLC, 2017. – T. 1864. – №. 1. – C. 020222.
 259. Watanabe K. Microorganisms relevant to bioremediation //Current opinion in biotechnology. – 2001. – T. 12. – №. 3. – P. 237-241.
 260. Weil, Raymond & Brady, Nyle. The Nature and Properties of Soils. 15th

- edition.—Columbus : Pearson, 2016.— 1104 p.
261. Wilson J. T., Wilson B. H. Biotransformation of trichloroethylene in soil //Applied and Environmental Microbiology. — 1985. — T. 49. — №. 1. — P.242-243.
262. Xu J. G., Johnson R. L. Nitrogen dynamics in soils with different hydrocarbon contents planted to barley and field pea //Canadian Journal of Soil Science. — 1997. — T. 77. — №. 3. — P. 453-458.
263. Yadav B. K., Verma A. Phosphate solubilization and mobilization in soil through microorganisms under arid ecosystems //The functioning of ecosystems.'(Ed. M. Ali) pp. — 2012. — P. 93-108.
264. Yang Y. et al. Elution of organic solutes from different polarity sorbents using subcritical water //Journal of Chromatography A. — 1998. — T. 810. — №. 1-2. — P. 149-159.
265. Yu K. S. H. et al. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments //Marine pollution bulletin. — 2005. — T. 51. — №. 8-12. — P. 1071-1077.
266. Zohreh Khorasanizadeh. The Effect of Biotic and Abiotic Factors on Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) by Bacteria in Soil. —2013. —262 p.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица 2 – Влияние мелиорантов разного состава на динамику численности микрофлоры при биодegradации 5 % нефтезагрязнения в луговой почве

Сутки опыта	Контроль	Биопрепарат	Биопрепарат + известь + сорбент	Биопрепарат + известь + гумат калия	Биопрепарат + известь
0	438 \pm 13	438 \pm 13	438 \pm 13	438 \pm 13	438 \pm 13
3	2321 \pm 70	2829 \pm 85	3709 \pm 111	2500 \pm 75	3480 \pm 104
6	890 \pm 27	1309 \pm 39	2160 \pm 65	1255 \pm 38	991 \pm 30
10	765 \pm 23	1017 \pm 31	1504 \pm 45	1026 \pm 31	642 \pm 19
14	798 \pm 23	424 \pm 13	848 \pm 25	685 \pm 21	437 \pm 13
17	821 \pm 25	565 \pm 17	672 \pm 20	728 \pm 22	572 \pm 17

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица 3 – Численность культур из биопрепарата в посевах на МПА, млн.

КОЕ / 1 г почвы

Номер культуры	Исходная	3 сут	6 сут	10 сут	14 сут	17 сут
Биопрепарат						
Общая численность	438	2829	1309	1017	424	565
1	0	172,0	204,0	89,0	10,6	38,3
2	0	3,7	0,1	11,1	10,6	11,3
3	0	61,5	12	66,6	21,2	67,8
Биопрепарат + известь + сорбент						
Общая численность	438	3709	2160	1504	848	672
1	0	192,0	214,0	0	0	0
2	0	2,4	0,1	0,2	0,3	0,2
3	0	60,5	71,4	66,6	117,0	112,0
Биопрепарат + известь + гумат калия						
Общая численность	438	2500	1255	1026	685	728
1	0	125,0	110,0	67,8	0	0
2	0	7,5	3,7	3,4	3,2	1,1
3	0	12,5	36,6	90,4	74,9	44,4
Биопрепарат + известь						
Общая численность	438	3480	991	642	437	572
1	0	84,0	59,0	0	0	0
2	0	6,0	7,1	4,3	2,0	0,1
3	0	24,0	23,6	53,5	41,6	21,2

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Таблица 4 – Влияние мелиорантов разного состава на динамику численности углеводородокисляющей микрофлоры при биодegradации 5 % нефтезагрязнения в луговой почве

Сутки опыта	Контроль	Биопрепарат	Биопрепарат + известь + сорбент	Биопрепарат + известь + гумат калия	Биопрепарат + известь
0	500±15	500±15	500±15	500±15	500±15
3	1980±60	2460±74	2196±66	3375±101	2040±61,2
6	1190±36	1428±43	1428±43	4270±128	826±25
10	888±27	1568±47	990±30	750±22	385±11
14	1026±31	170±5	360±11	240±4	52±2
17	684±21	339±10	168±5	781±23	138±4

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Таблица Г.1. Результаты дисперсионного однофакторного анализа

Варианты	Y1 (0-20)				Y1 (20-40)				Y2 (0-20)				Y2 (20-40)			
Повторность	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
2016	35,68	41,88	40,55	38,41	20,1	21,4	20,56	21,58	37,68	35,27	39,82	37,83	18,95	18,06	19,13	16,98
2017	26,45	28,32	27,14	30,01	17,99	18,3	18,62	18,49	25,93	27,13	27,51	26,63	15,48	16,34	15,47	15,71
2018	12,86	13,82	12,41	13,83	10,14	11,2	10	9,98	9,14	10,28	9,32	10,66	9,69	10,11	1,73	9,95
2019	5,58	4,97	5,92	5,41	3,17	3,67	3,83	3,65	3,45	3,19	2,97	3,27	2,08	2,64	2,23	2,57
Р-сумма по повторениям	80,57	88,99	86,02	87,66	51,4	54,57	53,01	53,7	76,2	75,87	79,62	78,39	46,2	47,15	38,56	45,21

Таблица Г.2. Отклонения от произвольного начала

Варианты	Y1 (0-20)				Y1 (20-40)				Y2 (0-20)				Y2 (20-40)				Сумма по вариантам
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
2016	14,68	20,88	19,55	17,41	-0,9	0,4	-0,44	0,58	16,68	14,27	18,82	16,83	-2,05	-2,94	-1,87	-4,02	127,88
2017	5,45	7,32	6,14	9,01	-3,01	-2,7	-2,38	-2,51	4,93	6,13	6,51	5,63	-5,52	-4,66	-5,53	-5,29	19,52
2018	-8,14	-7,18	-8,59	-7,17	-10,86	-9,8	-11,0	-11,02	-11,86	-10,72	-11,68	-10,34	-11,31	-10,89	-19,27	-11,05	-170,88
2019	-15,42	-16,03	-15,08	-15,59	-17,83	-17,33	-17,17	-17,35	-17,55	-17,81	-18,03	-17,73	-18,92	-18,36	-18,77	-18,43	-277,4
Р-сумма по повторениям	-3,43	4,99	2,02	3,66	-32,6	-29,43	-30,99	-30,3	-7,8	-8,13	-4,38	-5,61	-37,8	-36,85	-45,44	-38,79	-300,88

Таблица Г.3. Квадраты отклонений

Варианты	a ² повторения Y1 (0-20)				a ² повторения Y1 (20-40)				a ² повторения Y2 (0-20)				a ² повторения Y2 (20-40)				сумма a ²	V1 ² Сумма по вариантам
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
2016	215,50	435,97	382,20	303,11	0,81	0,16	0,19	0,34	278,22	203,63	354,19	283,25	4,20	8,64	3,50	16,16	2490,09	16353,29
2017	29,70	53,58	37,70	81,18	9,06	7,29	5,66	6,30	24,30	37,58	42,38	31,70	30,47	21,72	30,58	27,98	477,19	381,03
2018	66,26	51,55	73,79	51,41	117,94	96,04	121,00	121,44	140,66	114,92	136,42	106,92	127,92	118,59	371,33	122,10	1938,29	29199,97
2019	237,78	256,96	227,41	243,05	317,91	300,33	294,81	301,02	308,00	317,20	325,08	314,35	357,97	337,09	352,31	339,66	4830,93	76950,76
сумма a ²	549,24	798,07	721,10	678,75	445,72	403,82	421,67	429,10	751,19	673,32	858,08	736,21	520,56	486,04	757,72	505,91	9736,49	122885,06
P ₁ ²	11,76	24,90	4,08	13,40	1062,76	866,12	960,38	918,09	60,84	66,10	19,18	31,47	1428,84	1357,92	2064,79	1504,66	54,14	90528,77

Таблица Г.4. Итоги дисперсионного анализа

<i>Группы</i>	<i>Счет</i>	<i>Сумма</i>	<i>Среднее</i>	<i>Дисперсия</i>
2016	16	463,88	28,992	97,867
2017	16	355,52	22,22	30,224
2018	16	165,12	10,32	7,552
2019	16	58,6	3,6625	1,433

<i>Источник вариации</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-Значение</i>	<i>F критическое</i>
Между группами	6265,804	3	2088,601	60,946	3,326E-18	2,758
Внутри групп	2056,176	60	34,2696			
Итого	8321,98	63				

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Результаты статистического анализа данных по остаточному содержанию нефтепродуктов при проведении полевого опыта

Таблица Д.1. Сводная таблица

Варианты	Начало эксперимента (июнь 2017)				Конец вегетации 2017 года				Конец вегетации 2018 года				Конец вегетации 2019 года				V сумма по вариантам	x среднее по вариантам
Повторность	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
Контроль	9,67	8,87	9,22	8,6	5,26	6,08	5,73	5,61	3,93	3,57	4,46	3,92	2,38	2,62	2,79	2,37	85,08	5,3175
Уч. П1	8,72	9,21	9,38	8,57	3,29	3,06	3,45	2,92	2,61	2,82	2,77	2,52	1,33	1,28	1,72	1,47	65,12	4,07
Уч. П2	9,16	8,75	9,03	8,66	4,42	4,2	4,86	4,6	2,05	2,33	2,59	2,15	1,21	1,08	1,25	1,22	67,56	4,2225
Уч. П3	9,07	8,86	9,43	8,88	3,05	2,88	3,12	2,59	2,22	2,4	2,38	2,08	0,42	0,46	0,5	0,46	58,8	3,675
Уч. П4	8,95	9,04	8,72	8,77	3,92	3,54	3,20	3,98	2,35	2,17	2,51	2,29	0,6	0,58	0,65	0,61	61,88	3,8675
Р-сумма по повторениям	45,57	44,73	45,78	43,48	19,94	19,76	20,36	19,7	13,16	13,29	14,71	12,96	5,94	6,02	6,91	6,13	338,44	21,1525

Таблица Д.2. Отклонения от произвольного начала

Варианты	У1 (0-20)				У1 (20-40)				У2 (0-20)				У2 (20-40)				V1 Сумма по вариантам
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
Контроль	5,67	4,87	5,22	4,60	1,26	2,08	1,73	1,61	-0,07	-0,43	0,46	-0,08	-1,62	-1,38	-1,21	-1,63	21,080
Уч. П1	4,72	5,21	5,38	4,57	-0,71	-0,94	-0,55	-1,08	-1,39	-1,18	-1,23	-1,48	-2,67	-2,72	-2,28	-2,53	1,120
Уч. П2	5,16	4,75	5,03	4,66	0,42	0,20	0,86	0,60	-1,95	-1,67	-1,41	-1,85	-2,79	-2,92	-2,75	-2,78	3,560
Уч. П3	5,07	4,86	5,43	4,88	-0,95	-1,12	-0,88	-1,41	-1,78	-1,60	-1,62	-1,92	-3,58	-3,54	-3,50	-3,54	-5,200
Уч. П4	4,95	5,04	4,72	4,77	-0,08	-0,46	-0,80	-0,02	-1,65	-1,83	-1,49	-1,71	-3,40	-3,42	-3,35	-3,39	-2,120
Р-сумма по повторениям	25,57	24,73	25,78	23,48	-0,06	-0,24	0,36	-0,30	-6,84	-6,71	-5,29	-7,04	14,06	13,98	13,09	13,87	18,440

Таблица Д.3. Квадраты отклонений

Варианты	a ² повторения				a ² повторения				a ² повторения				a ² повторения				сумма a ²	V1 ² Сумма по вариантам
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
Контроль	32,15	23,72	27,25	21,16	1,59	4,33	2,99	2,59	0,00	0,18	0,21	0,01	2,62	1,90	1,46	2,66	124,83	444,37
Уч. П1	22,28	27,14	28,94	20,88	0,50	0,88	0,30	1,17	1,93	1,39	1,51	2,19	7,13	7,40	5,20	6,40	135,26	1,25
Уч. П2	26,63	22,56	25,30	21,72	0,18	0,04	0,74	0,36	3,80	2,79	1,99	3,42	7,78	8,53	7,56	7,73	141,12	12,67
Уч. П3	25,70	23,62	29,48	23,81	0,90	1,25	0,77	1,99	3,17	2,56	2,62	3,69	12,82	12,53	12,25	12,53	169,71	27,04
Уч. П4	24,50	25,40	22,28	22,75	0,01	0,21	0,64	0,00	2,72	3,35	2,22	2,92	11,56	11,70	11,22	11,49	152,98	4,49
сумма a ²	131,26	122,44	133,26	110,33	3,18	6,72	5,45	6,11	11,63	10,28	8,56	12,23	41,91	42,06	37,70	40,81	723,91	489,83
P1 (в квадрате)	653,82	611,57	664,61	551,31	0,00	0,06	0,13	0,09	46,79	45,02	27,98	49,56	197,68	195,44	171,35	192,38	3407,80	340,03

Таблица Д.4. Основные результаты однофакторного дисперсионного анализа

Группы	Счет	Сумма	Среднее	Дисперсия
Строка 1	16	85,08	5,3175	6,4705267
Строка 2	16	65,12	4,07	9,0122933
Строка 3	16	67,56	4,2225	9,35546
Строка 4	16	58,8	3,675	11,201467
Строка 5	16	61,88	3,8675	10,179967

Источник вариации	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Между группами	26,36388	4	6,59097	24,738154	0,5856197	2,493696
Внутри групп	693,2957	75	0,266429			
Итого	719,6596	79				