

ДЕГРАДАЦИЯ, ВОССТАНОВЛЕНИЕ И ОХРАНА ПОЧВ

УДК 631.427.4:504.064

МОДЕЛИРОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ “КОНТУРНОГО ЗАВОДНЕНИЯ” В МИКРОКОСМАХ

© 2020 г. Т. Н. Щемелинина^а, Е. М. Анчугова^{а, *}, Е. М. Лаптева^а, Р. С. Василевич^а,
М. Ю. Маркарова^а, Е. Н. Глазачева^б, М. В. Успенская^б

^аИнститут биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН,
ул. Коммунистическая, 28, Сыктывкар, 167982 Россия

^бСанкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий,
механики и оптики, Кронверкский пр-т, 49, Санкт-Петербург, 197101 Россия

*e-mail: anchugova@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 25.04.2019 г.

После доработки 05.07.2019 г.

Принята к публикации 24.09.2019 г.

Представлены результаты моделирования комплексной биотехнологии “контурного заводнения” для очистки сильнозагрязненной нефтью агродерново-подзолистой почвы (Albic Retisols (Loamic)) при помощи бактериально-дрожжевого консорциума, микроводорослей и альго-бактериально-дрожжевого консорциума с применением минеральных удобрений. Выявлены закономерности изменения биотических показателей и содержания нефтепродуктов на различных этапах деградации нефти в микрокосмах. Показано, что изменения численности углеводородокисляющих микроорганизмов в изучаемых микрокосмах (микроэкосистемах) имеют различную направленность в зависимости от внесенного биологического агента. При внесении микроводорослей численность данной группы микроорганизмов снижается на порядок в конце эксперимента, а при внесении бактериально-дрожжевого и альго-бактериально-дрожжевого консорциума – восстанавливается численность к 90 суткам. Биохимическая активность в микрокосмах оставалась на высоком уровне во всех случаях. Показана эффективность использования нефтеокисляющих микробных консорциумов, в том числе с применением культур микроводорослей. Бактериально-дрожжевой и альго-бактериально-дрожжевой консорциумы в присутствии минеральных добавок оказывают максимальный эффект очистки при моделировании технологии в микрокосмах. Эффективность очистки почвы от нефтепродуктов за 90 суток лабораторного эксперимента составила 60–63%. Данные ИК-спектроскопии диагностируют уменьшение доли насыщенных алифатических структур, накопление ароматических углеводородов и кислородсодержащих соединений, которые являются промежуточными продуктами метаболизма при микробном окислении углеводородов нефти.

Ключевые слова: нефтяное загрязнение, альго-бактериально-дрожжевой консорциум, биологическая активность, эффективность очистки

DOI: 10.31857/S0032180X20020112

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время отсутствуют универсальные методы очистки почв от нефти и нефтепродуктов (НП) [14, 23]. В зависимости от масштаба загрязнения, качества и количества поллютантов (нефти и нефтесодержащих жидкостей), биоклиматических условий территории, особенностей почвенного покрова осуществляется дифференцированный подход к проведению биоремедиационных мероприятий [6, 10, 15, 33]. В ряде работ [7, 14] предложены технологии, направленные на очистку почв, которые либо обусловлены незначительными по масштабам нефтеразливами, либо достигаются проведением технического этапа очистки нефтезагрязненных земель, включающего механическую уборку нефти и НП [21]. Физи-

ческие методы удаления загрязнений не способствуют восстановлению почв и могут нанести дополнительный ущерб окружающей среде [38]. Химическая обработка нефтезагрязненных почв путем экстракции растворителями или окислением оказывает влияние на изменение агрохимических характеристик почв, а также химические показатели грунтовых вод [28, 40].

Огромный потенциал и конкурентные преимущества по сравнению с вышеперечисленными способами имеет метод биоремедиации, прежде всего, из-за экологической безопасности и низкой стоимости [25]. В предлагаемых технологиях очистки нефтезагрязненной почвы *in situ* используют внесение биопрепаратов совместно с сорбентами или без них [13]. В условиях севера, где в силу специфики

Таблица 1. Схема проведения эксперимента

Вариант	N ₁₅ P ₁₅ K ₁₅	Суспензия консорциума	
		бактериально-дрожжевого*	микродорослей**
Контроль	–	–	–
I	+	–	–
II	+	+	–
III	+	–	+
IV	+	+	+

* Штаммы микроорганизмов *Rhodotorula* sp., *P. libanensis*, 1: 1, 50 см³; 10⁹ КОЕ/см³.

** Микродоросли *A. obliquus*, *Chlorella* sp., *Monoraphidium* sp., *Anabaena* sp., в равных долях, 50 см³; 10⁸ КОЕ/см³.

биоклиматических условий широко распространены заболоченные ландшафты, оптимальны технологии, предусматривающие предварительную глубокую очистку водоемов и заболоченных территорий от нефти и НП путем уборки подвижной нефти с последующим внесением минеральных удобрений и биопрепаратов [30]. Существуют технологии, предусматривающие активизацию десорбции нефти на поверхность путем насыщения воды кислородом, где в процессе аэрации очистка происходит наиболее эффективно, заводнение зоны загрязнения создается естественным или искусственным путем с помощью дамб и отсыпок [8, 14].

Существующая проблема утилизации персистентных загрязнений предполагает разработку новых технологий очистки, в том числе с применением ассоциаций микроорганизмов, которые составляют основу биопрепаратов. Состав биопрепаратов, представляемых на российском рынке, различен – от одного (“Путидойл”, “Аллегро”, “Торнадо”, “Лидер”, “Родер” и др.) до 3–15 штаммов микроорганизмов (“Экойл”, “Олеворин”, “Деворойл”, “Биоойл”, “ВиО”, “Универсал”, “Биотрин”, “Рага-Вас” и др.). Такие биопрепараты, как “Биоойл-СН”, “Биоойл-АА”, в состав которых входят штаммы углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) из родов *Enterobacter*, *Acinetobacter* и *Bacillus* [2, 24], используются в настоящее время в производственных масштабах для очистки в условиях Крайнего Севера нефтезагрязненных почв и водных объектов совместно с торфосорбентами и сорбентами на основе графена [1]. Микробная ассоциация, состоящая из штаммов родов *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и содержащая катаболические плазмиды, является основой биопрепарата “ВиО” [30] для биоремедиации загрязненных нефтью и НП почвенных и водных экосистем, способна к деградации углеводородов нефти в диапазоне температур 4–42°C при концентрации ее в природных средах до 30%, присутствии солей до 5% и величине pH от 4 до 10. Эф-

фективность опытного образца биопрепарата “ВиО” в полевых испытаниях по очистке грунта от нефти на территории Пограничного месторождения Ямало-Ненецкого автономного округа составила 80%. В основном представленные биопрепараты включают штаммы бактерий и дрожжей. Исследования биорекультивации с помощью комплекса микроорганизмов, в состав которых входят микродоросли [27], немногочисленны и требуют дальнейшего изучения.

Внедрение новых технологий в практику природопользования требует детального анализа процессов, лежащих в основе биотрансформации поллютантов в природной среде. В частности, необходима оценка процессов биоокисления нефти и НП на разных этапах ремедиации нефтезагрязненных почв. Особого внимания требуют вопросы разработки методологических подходов к контролю экологического состояния биотических и абиотических компонентов восстанавливаемых экосистем. С этой целью могут быть использованы показатели содержания в почвах окислительно-восстановительных ферментов, углеводородокисляющих микроорганизмов, остаточного содержания НП.

Цель работы – разработка эффективной комплексной биотехнологии очистки сильнозагрязненных нефтью почв на основе оценки закономерностей динамики индикационных параметров.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Изучение эффективности деструкции нефти консорциумом углеводородокисляющих микроорганизмов проводили в лабораторном эксперименте. В качестве основных деструкторов использовали штаммы *Rhodotorula* sp. VKM Y-2993D, *Pseudomonas libanensis* VKM B-3041D, выделенные из нефтезагрязненных почв Усинского района Республики Коми, а также штаммы микродорослей *Acutodesmus obliquus* IPPAS S-2016, *Chlorella* sp. IPPAS C-2024, *Monoraphidium* sp., *Anabaena* sp. из коллекции SykoA Института биологии Коми НЦ УрО РАН [18].

В лабораторных условиях создали микрокосмы (микроэкосистемы): в вегетационные сосуды помещали минеральный субстрат массой 0.5 кг и загрязняли его высокой концентрацией нефти (30 мас. %). В качестве субстрата использовали образцы пахотного горизонта агродерново-подзолистой почвы (Albic Retisols (Loamic)). В емкости с почвой добавляли минеральные соли (азотно-калийно-фосфорное удобрение NPK-15), тщательно перемешивали, затем вносили биологические агенты (бактерии, дрожжи и микродоросли, выращенные раздельно) в соответствии со схемой, представленной в табл. 1. Технологию “контурного заводнения”, когда предварительно гидроизолированный загрязненный участок за-

полняют водой, моделировали добавлением в микроскопы воды объемом 1 дм³. Слой воды, располагающийся над поверхностью минерального субстрата, аэрировали с помощью компрессора Tetratex APS 400. Лабораторный эксперимент проводили в трехкратной повторности при комнатной температуре. Продолжительность эксперимента составила 90 сут.

Изменение биологической активности почвы (минерального субстрата) оценивали по динамике численности УОМ и активности окислительно-восстановительных ферментов. Численность УОМ определяли методом высева на твердую среду Раймонда 10-кратных разведений почвенных суспензий [17]. Активность фермента каталазы оценивали перманганатным методом, дегидрогеназную активность определяли на основе колориметрического определения формазана [32]. Дегидрогеназную активность водной суспензии исследовали в соответствии с методикой ВНИИ ВОДГЕО [22].

Все полученные результаты по величине ферментативной активности сводили к расчетному показателю среднего геометрического $GMea$ [36]:

$$GMea = \sqrt{Cat \cdot Deh},$$

где $GMea$ – среднее геометрическое ферментативной активности; Cat – каталаза; Deh – дегидрогеназа.

Относительные баллы для показателей ферментативной активности Cat и Deh рассчитывали по формуле Девятовой [9]. Например, для показателей каталазной активности расчет вели по формуле:

$$Cat = \frac{Cat_{\phi}}{Cat_0},$$

где Cat – относительный оценочный балл показателя; Cat_{ϕ} – фактическое значение показателя, см³ 0.1 М КМnO₄ на 1 г сухой почвы за 20 мин; Cat_0 – значение показателя в незагрязненной почве, см³ 0.1 М КМnO₄ на 1 г сухой почвы за 20 мин.

Аналогично рассчитывали значение относительного оценочного балла для показателей дегидрогеназной активности.

Микроскопирование образцов проводили с помощью микроскопа Nikon Eclipse80i при увеличении до $\times 1000$, оборудованного системой дифференциального интерференционного контраста и видеофиксации изображений. Микрофотографии выполнены с помощью камер Nikon Digital Sight Ds-2Mv (Nikon, Japan).

Интенсивность деструкции нефти оценивали по изменению содержанию НП в образцах почв [16] и водной среды. Содержание НП определяли гравиметрическим методом, экстрагируя НП из образцов почв и водной среды хлороформом.

ИК-спектроскопию образцов почв проводили после их высушивания, тщательного перемешивания и измельчения в ступке до однородного состояния. Измельченный образец помещали на приставку НПВО (кристалл ZnSe с алмазным напылением) ИК-спектрометра Tensor 37 фирмы Bruker (Германия). ИК-спектры поглощения каждого образца снимали в трех различных участках, перемещая его по столику приставки НПВО в трех повторностях. ИК-съёмку проводили в спектральном диапазоне 600–4000 см⁻¹ при разрешении 2 см⁻¹, число сканирований 32. ИК-спектры подвергали процедуре коррекции базовой линии. Для качественной и количественной идентификации компонентного состава нефти использовали следующие спектральные коэффициенты [11, 26]:

$C_1 = D_{1608}/D_{723}$ – условное отношение ароматических углеводородов к нормальным парафиновым структурам (коэффициент ароматичности);

$C_2 = D_{1608}/D_{1460}$ – условное содержание ароматических структур, т.е. отношение ароматических к сумме парафиновых углеводородов;

$C_3 = D_{2852}/D_{1608}$ – условное содержание парафиновых структур, т.е. отношение интенсивности валентных колебаний метиленовых групп к сумме ароматических углеводородов;

$C_4 = D_{723}/D_{1460}$ – условное содержание парафиновых структур, т.е. отношение нормальных парафиновых структур к сумме парафиновых углеводородов (индекс разветвленности);

$C_5 = (D_{723} + D_{1380})/D_{1608}$ – условное содержание насыщенных алифатических структур (индекс алифатичности);

$C_6 = (D_{1705})/D_{1608}$, $C_7 = (D_{1730})/D_{1608}$ – отношение интенсивности образования продуктов окисления углеводородов к сумме ароматических углеводородов (коэффициенты окисленности).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биологическая активность в микроскомах

Согласно теории индуцированного синтеза ферментов Кошланда [29], в ответ на присутствие в среде специфического субстрата или метаболита микроорганизмы вырабатывают соответствующие ферменты, что необходимо клетке для подготовки и усвоения труднодоступных источников питания. Окислительно-восстановительные ферменты: дегидрогеназа и каталаза – синтезируются микроорганизмами. Их присутствие в почве характеризует общую метаболическую активность почвенных микробных сообществ. Дегидрогеназа принимает непосредственное участие в биохимическом окислении углеводородов [20], а свободный кислород, образующийся при разложении перекиси водорода в присутствии фермента ката-

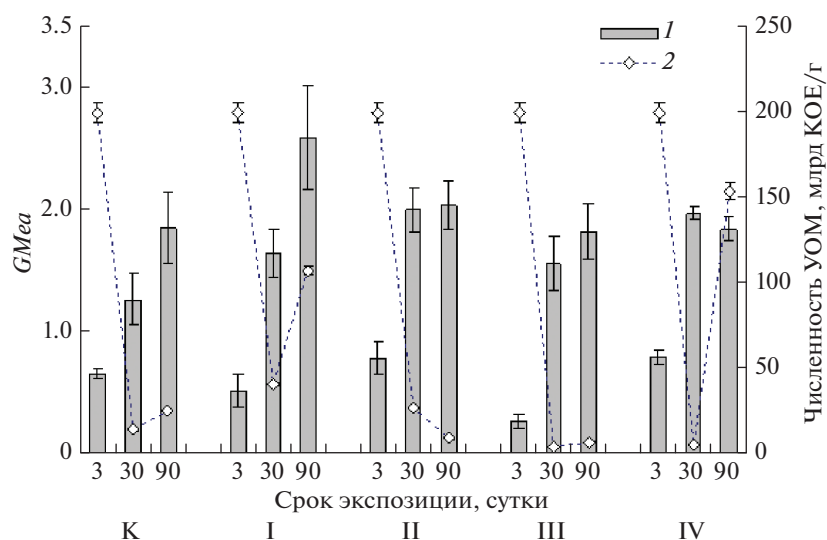


Рис. 1. Изменение величины расчетного показателя среднего геометрического ферментативной активности (1) и динамика численности углеводородокисляющих микроорганизмов (2) в образцах почв исследуемых микрокосмов. Номера вариантов приведены в соответствии с табл. 1.

лазы, способствует активизации деятельности микроорганизмов, участвующих в процессах деструкции углеводов. Изменение каталазной активности в этом случае коррелирует с изменением численности нефтеокисляющих микроорганизмов [12].

Изучение содержания в микрокосмах нефтеокисляющих микроорганизмов показало, что вне зависимости от варианта опыта во всех микрокосмах динамика численности УОМ имела сходную картину (рис. 1). В первые дни эксперимента во всех образцах почв, включая контроль, наблюдалась высокая концентрация УОМ (2×10^9 КОЕ/г). По всей видимости, это обусловлено введением в почвы микрокосмов специфического субстрата — нефти. Массированное нефтяное загрязнение сопровождается острым токсическим действием на микробные сообщества, что обуславливает подавление жизнедеятельности микроорганизмов и преимущественное присутствие в почвенной среде микроорганизмов из группы УОМ. Как видно, численность данной группы к 30-му дню эксперимента резко (на порядок) снижается и либо остается на этом уровне до конца эксперимента (контроль, варианты II и III), либо возрастает (варианты I и IV). Последнее может свидетельствовать о более выраженной адаптации микробсообществ к сложившимся условиям в варианте без внесения консорциума микроорганизмов, но при наличии стимулирующего для развития аборигенной микрофлоры фактора (внесение NPK) — вариант I, и с внесением дополнительного количества углеводородокисляющих микроорганизмов в присутствии микроводорослей — вариант IV.

Оценка параметров биохимической активности образцов почв в микрокосмах показала, что

каталазная активность в них варьировала в пределах от 0.71 до 2.23 см^3 $\text{KMnO}_4/\text{г}$ почвы за 20 мин, дегидрогеназная — от 3.08 до 47.27 мг формазана/г за 24 ч. При этом минимальные показатели ферментативной активности были отмечены во всех вариантах опыта в первый срок отбора. В ходе эксперимента произошло возрастание каталазной активности. На 30-е сут эксперимента во всех вариантах опыта она увеличилась в 1.1–2.8 раза и сохранялась на этом уровне до конца срока экспозиции микрокосмов.

Для дегидрогеназной активности также отмечено увеличение в ходе эксперимента. В зависимости от варианта опыта она увеличилась относительно первого срока отбора (3 дня экспозиции) в 1.2–6.7 раза. Однако в отличие от каталазной активности к концу эксперимента (90 дней экспозиции) степень обогащенности образцов почв ферментом дегидрогеназой либо возрастала (контроль, варианты I и III), либо снижалась (варианты II и IV) относительно второго срока отбора проб (30 дней экспозиции).

Следует отметить, что с течением времени взаимосвязь между этими показателями в микрокосмах меняется: при трехдневном сроке экспозиции корреляция между каталазной и дегидрогеназной активностью в микрокосмах оценивалась как средняя ($r = 0.5$), спустя месяц экспозиции — слабая ($r = 0.4$), к концу трехмесячного срока коэффициент корреляции между этими показателями имел нулевое значение. Для адекватной интерпретации параметров и направленности биохимических реакций в почвах используют интегральные показатели, позволяющие учесть эти изменения. Таким интегральным показателем может быть величина среднего геометрического ферментативной

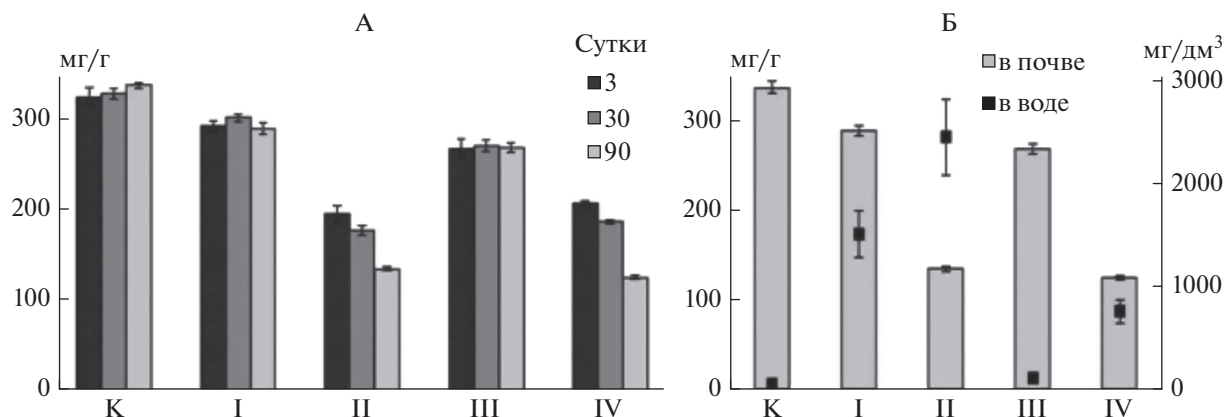


Рис. 2. Динамика содержания нефтепродуктов в микрокосмах: А – в почве (мг/г) в разные сроки эксперимента; Б – в почве (мг/г) и в водной среде (мг/100 см³) спустя 90 сут эксперимента: К – контроль; I, II, III, IV – варианты опыта в соответствии с табл. 1.

активности *GMea* [5, 35]. Как видно (рис. 1), несмотря на близкий порядок численности УОМ во всех микрокосмах, зафиксированный на третьи сутки эксперимента, по ферментативной активности их минеральные субстраты несколько различались. Минимальные значения расчетного показателя *GMea* отмечены в контроле и вариантах I и III, максимальные – в вариантах II и IV, т.е. где в качестве биологических агентов нефтеокисления введены бактериально-дрожжевой и альго-бактериально-дрожжевой консорциумы. Снижение численности УОМ в ходе эксперимента не привело к подавлению окислительно-восстановительных процессов в микрокосмах. Спустя месячный срок экспозиции во всех микрокосмах наблюдалось возрастание величины *GMea* по сравнению с контролем, а спустя три месяца – только в вариантах опыта I, II и IV. Таким образом, биохимическая активность в микрокосмах оказалась на высоком уровне в случае совместного введения в систему микроводорослей и бактериально-дрожжевого консорциума микроорганизмов (вариант IV), отдельного внесения бактериально-дрожжевого консорциума (вариант II) и стимуляции аборигенного микробного сообщества биофильными компонентами (вариант I).

Эффективность очистки от НП в микрокосмах

Влияние комплекса микроорганизмов на процессы деструкции НП в лабораторном эксперименте оценивали по динамике изменений содержания НП в почве микрокосмов на третьи сутки, спустя месяц и спустя 3 мес. Как показали проведенные исследования (рис. 2А), в контрольном варианте содержание НП в почве за все время эксперимента практически не изменилось. Все различия в концентрации нефти на третьи, 30- и 90-е сут экспозиции были не существенны для 0.05% уровня значимости.

Внесение только одних минеральных удобрений (вариант I) в загрязненную почву привело к стимуляции аборигенной микрофлоры снижению содержания НП за весь период экспозиции на 10.5%, минеральных удобрений в сочетании с введением в систему микроводорослей (III) – на 20.3%. Биологические агенты – бактериально-дрожжевой (II) и альго-бактериально-дрожжевой (IV) консорциумы – в комплексе с минеральными удобрениями оказались наиболее эффективными в очистке почвы от НП. Уменьшение содержания НП в почве вариантов II и IV составило за 90 сут эксперимента соответственно 60 и 63%.

При анализе процессов, происходящих в микрокосмах в результате взаимодействия биологических агентов с НП, особое внимание следует уделить вопросу десорбции углеводородов из загрязненной почвы в водную среду. Дегидрогеназная активность, определяемая в пробах воды, покрывающей слой минерального субстрата и аэрируемой в течение всего срока проведения эксперимента напрямую зависела от содержания НП в воде микрокосмов (рис. 2Б, 3). В микрокосмах II и IV, благодаря жизнедеятельности микроорганизмов происходило эффективное снижение содержания НП в почве за счет их десорбции в водную среду, где отмечено более большое количество НП по сравнению с контролем. Однако при сравнении соотношения НП в почве и воде вариант IV отличался от варианта II большей эффективностью очистки почвы. Более низкие значения содержания НП могут свидетельствовать об активной нефтедеструкции в водной фазе микрокосма варианта IV за счет комплексного действия микроорганизмов, входящих в состав альго-бактериально-дрожжевого консорциума, и процессов дегидрирования. Увеличение в почве варианта IV к концу экспозиции показателя *GMea*, характеризующего уровень ферментативной активности биотического комплекса, и численности УОМ может свидетельство-

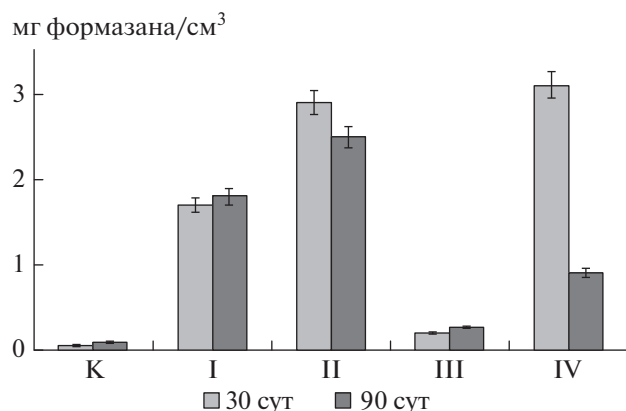


Рис. 3. Динамика дегидрогеназной активности в образцах воды, покрывающей поверхность минерального субстрата в микрокосмах эксперимента.

вать об определенных сукцессионных изменениях в их составе, способствующих активизации процессов деструкции НП в присутствии штаммов микроорганизмов *Rhodotorula* sp., *P. libanensis* и микроводорослей *A. obliquus*, *Chlorella* sp., *Monoraphidium* sp., *Anabaena* sp. Самоочищение почвы (контрольный микрососм) будет проходить значительно дольше, чем при внесении биологических агентов.

Теоретическое обоснование возможности десорбции нефти биосурфактантами, выделяемыми микроорганизмами, основано на двух гипотезах. Первая состоит в том, что биосурфактанты, как и синтетические поверхностно-активные вещества (ПАВ), образуют мицеллы [39, 42], с помощью которых часть углеводородов, сорбированная на почвенной матрице, может быть отделена от твердой фазы [34]. Вторая гипотеза основана на представ-

лении о гидрофобном характере строения внутренней среды мицелл, которые образуют молекулы биосурфактантов, что определяет растворимость неполярных соединений, в том числе нефтеуглеводородов [4, 37]. По всей видимости, оба процесса могут способствовать более эффективному отделению углеводородов нефти от твердой фазы (почв, минеральных субстратов, донных отложений) в загрязненных нефтью природных экосистемах.

В проведенном эксперименте отмечен эффект эмульгирования и десорбции НП в водную среду (рис. 2Б), связанный с деятельностью внесенных в микрососмы микроорганизмов. Подтверждение эффекта десорбции наблюдали при микроскопировании проб воды из микрокосмов, которое показало наличие клеток бактерий, дрожжей (варианты II, IV) и микроводорослей (вариант IV), делящихся на диспергированной нефти (рис. 4).

Оценка трансформации НП методом ИК-спектроскопии

ИК-спектроскопия является информативным и чувствительным методом, позволяющим проведение оценки утилизации углеводородов и трансформации функциональных групп в процессе деструкции органических соединений нефти [3, 26]. Анализ ИК-спектров исходной незагрязненной почвы, почвы, подвергнутой загрязнению нефтью (контроль) и нефти показал, что влияние нефти проявляется в почве в виде увеличившихся по интенсивности полос поглощения валентных колебаний $-C-N$ в группах CH_2 и CH_3 ($2950, 2920, 2850\text{ см}^{-1}$) и деформационных колебаний $-C-N$ (1460 и 1380 см^{-1}). В длинноволновой области спектра наблюдаются полосы погло-

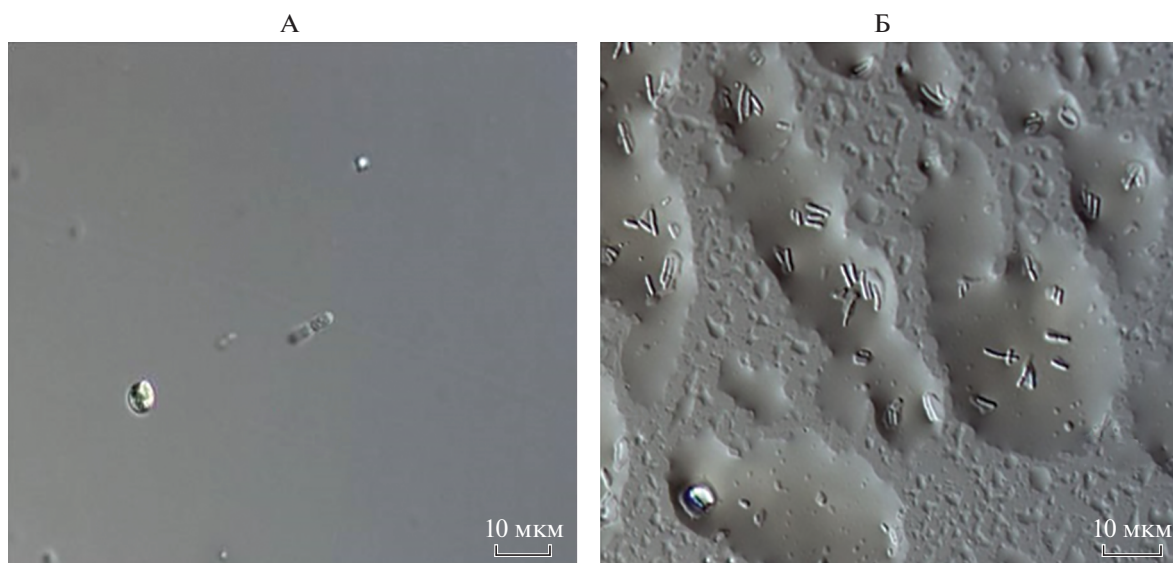


Рис. 4. Клетки микроводорослей, бактерий и дрожжей в образцах воды из микрокосма (А) и нефтяной пленки (Б) (вариант IV) (фото Е.Н. Патовой).

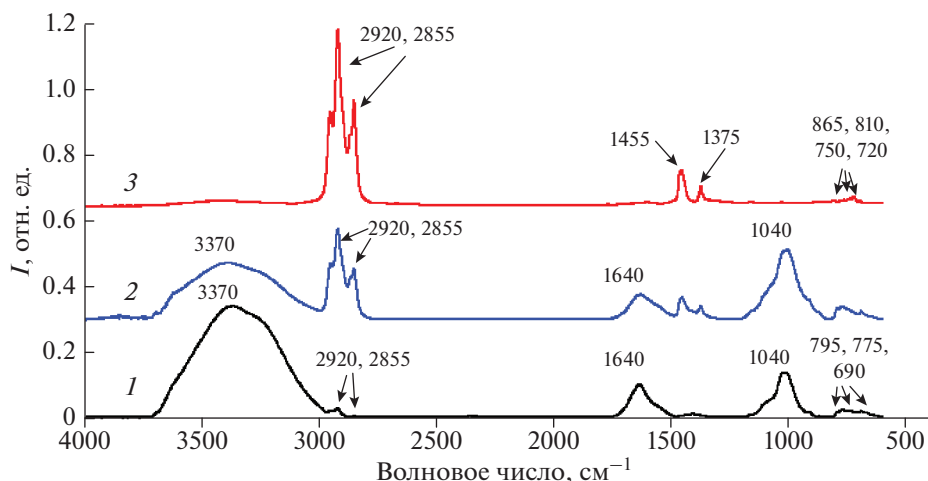


Рис. 5. ИК-спектры незагрязненной почвы (1), почвы, загрязненной нефтью (контроль) (2) и нефти (3).

щения, которые сложно разделить. Скорее всего, они относятся к связям свойственным гумусовым кислотам [19, 41], так как их массовая доля в почве очень велика. К таким полосам поглощения относятся 873 см^{-1} (—C—H внеплоскостные колебания, которые могут свидетельствовать о 1,2,4-замещении в ароматическом кольце), 796 см^{-1} (—C—H внеплоскостные колебания в метазамещенном ароматическом кольце), 743 см^{-1} (—C—H внеплоскостные колебания в ортозамещенном ароматическом кольце), $725\text{—}720\text{ см}^{-1}$ (маятниковые колебания группы CH_2), 692 см^{-1} (либо =C—H связь в алкенах, либо —C—H внеплоскостные колебания в монозамещенных ароматических кольцах). На спектральные характеристики почвы, загрязненной нефтью, сильное влияние оказывает присутствие полосы 1600 см^{-1} , свойственной колебаниям —C—H в ароматическом кольце, обусловленное, в основном, гумусовыми кислотами в почве, а также линии оксида кремния (полоса поглощения 1020 см^{-1}). Это оказывает значительные ограничения в использовании данного метода при оценке изменения состава НП в процессе биодеструкции (рис. 5).

Показателями биодegradации нефти служат изменения спектральных коэффициентов (соотношений оптических плотностей характеристических полос поглощения), рассчитанных из ИК-спектров. Использование спектральных коэффициентов нивелирует мешающее влияние почвенных компонентов (доля которых в процессе эксперимента остается постоянной) на характеристические полосы поглощения компонентов нефти.

На рис. 6 представлены зависимости интенсивности линии колебаний связи C=O в карбоксильных группах (А) и 1730 см^{-1} — колебание связи C=O в альдегидах или сложных эфирах (Б) в зависимости от длительности биодegradации.

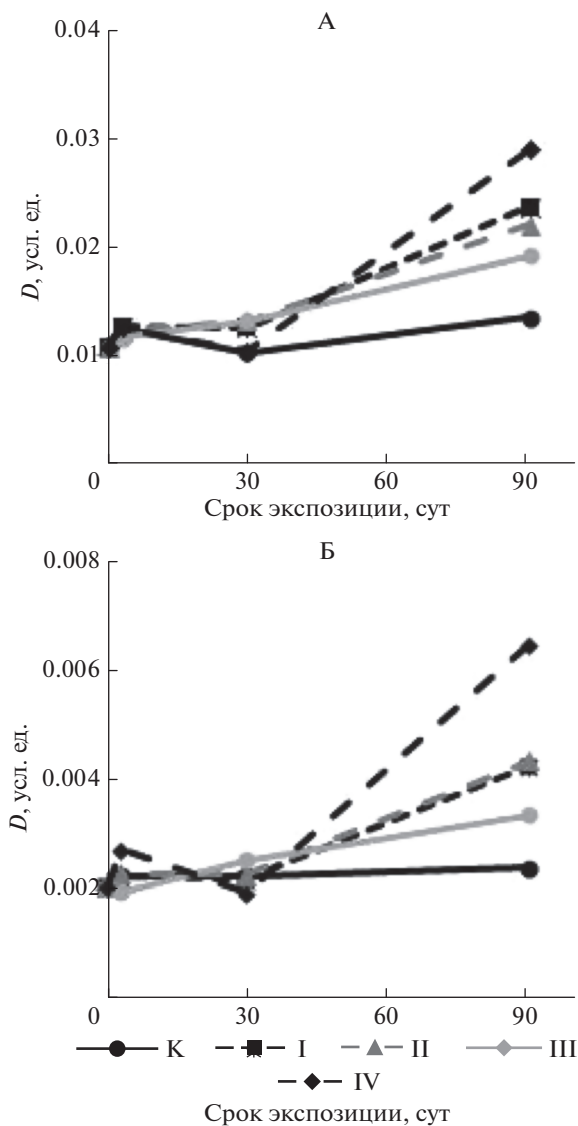


Рис. 6. Изменение интенсивности полос 1705 см^{-1} (А) и 1730 см^{-1} (Б) в зависимости от времени биодеструкции.

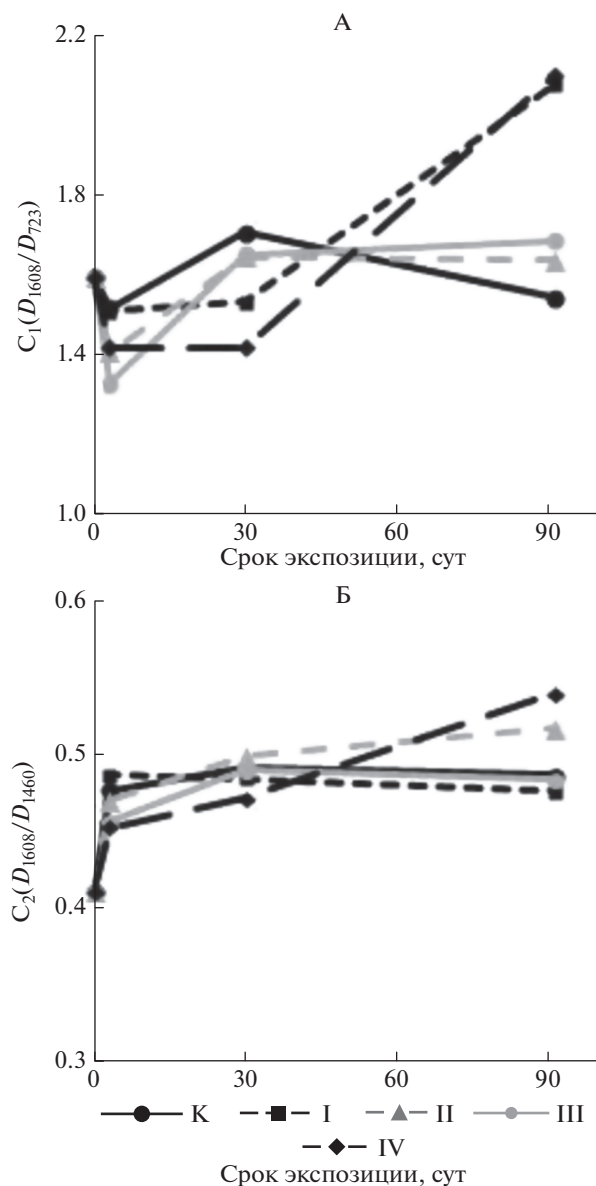


Рис. 7. Изменение спектральных коэффициентов C_1 (А) и C_2 (Б) в зависимости от времени биодеструкции.

Интенсивность данных линий на трехнедельном интервале не показывает роста и резко возрастает спустя 90 сут биодegradации для всех исследованных вариантов по сравнению с контролем. В результате наблюдается рост количества кислородсодержащих остаточных компонентов нефти, которые являются промежуточными продуктами метаболизма при микробном окислении углеводородов нефти [26, 31]. Аналогичные закономерности проявляются при анализе спектральных коэффициентов окисленности углеводородов C_6 и C_7 , обнаруживающие значительный рост через 90 сут эксперимента. Наиболее интенсивный процесс окисления углеводородов в почве наблюдается для

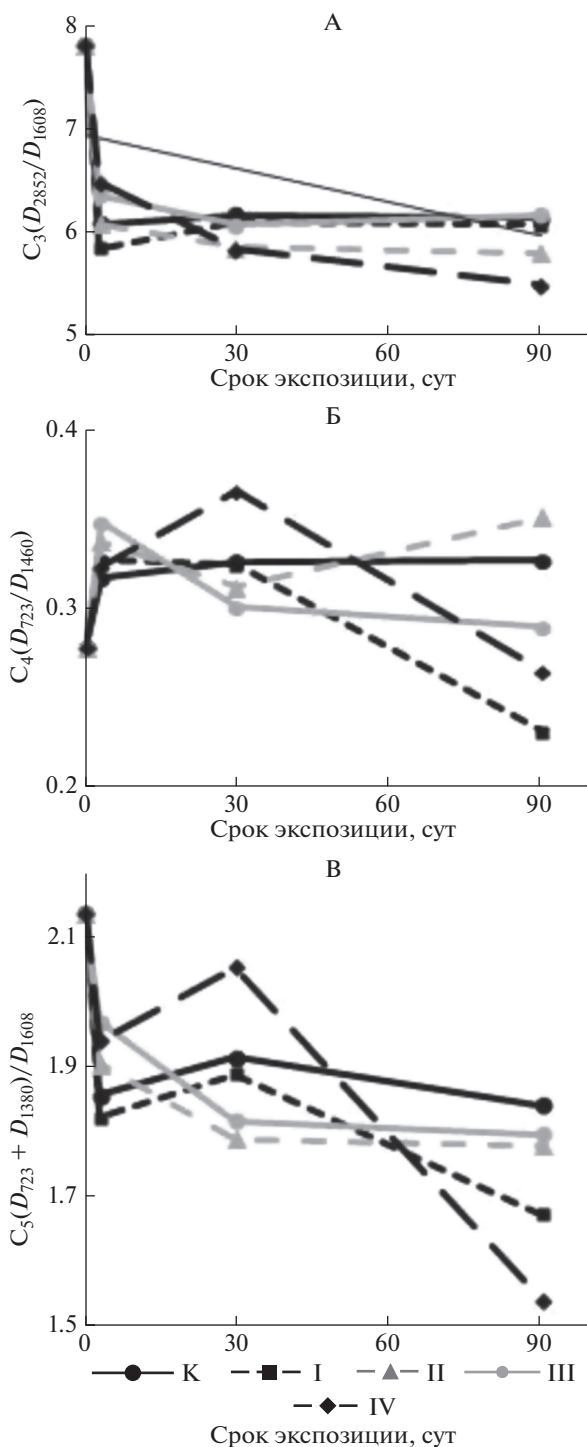


Рис. 8. Изменение спектральных коэффициентов C_3 (А), C_4 (Б), C_5 (Б) в зависимости от времени биодеструкции.

варианта IV. Вероятно, микроорганизмы-нефтедеструкторы окисляют углеводороды только по боковой цепи, не раскрывая ароматического кольца [7].

В процессе биодеструкции нефти происходит увеличение спектральных коэффициентов C_1 и C_2 ,

указывающих на увеличение относительной доли устойчивых ароматических углеводов (рис. 7). Рост степени ароматичности исследованных проб сопровождается уменьшением доли насыщенных алифатических структур (уменьшение C_3 и C_5). В процессе ферментативного окисления НП также увеличивается показатель разветвленности парафиновых углеводов (C_4) (рис. 8). Указанные процессы протекают наиболее активно в почве варианта IV с применением альго-бактериально-дрожжевого консорциума.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что наиболее эффективными биоремедиантами нефтезагрязненных субстратов являются бактериально-дрожжевой (*Rhodotorula* sp., *Pseudomonas libanensis*) и альго-бактериально-дрожжевой (*Rhodotorula* sp., *Pseudomonas libanensis*, *Acutodesmus obliquus*, *Chlorella* sp., *Monoraphidium* sp., *Anabaena* sp.) консорциумы. Эффективность очистки почвы от НП за 90 сут проведения эксперимента составила 60–63%.

Численность углеводородокисляющих микроорганизмов существенно изменялась в ходе эксперимента. Будучи высокой в начале эксперимента, численность данной группы микроорганизмов снижалась на порядок в связи с острым токсическим действием нефти, а затем в вариантах I и IV численность УОМ возрастала, что указывает на адаптацию микробocenоза к сложившимся условиям и ускорению процесса биодegradации.

Отмечен эффект эмульгирования и десорбции НП в водную среду из почвы, связанный с деятельностью внесенных в микросистемы микроорганизмов. Данные ИК-спектроскопии диагностируют уменьшение доли насыщенных алифатических структур и накопление устойчивых ароматических углеводов и остаточных компонентов нефти, которые являются промежуточными продуктами метаболизма при микробном окислении углеводов нефти.

Полученные данные позволяют рекомендовать использование альго-бактериально-дрожжевого консорциума с минеральными добавками в комплексе с технологией “контурного заводнения” и насыщения кислородом водной фазы с помощью аэрирующих устройств для очистки нефтезагрязненных почв. Такая технология позволит в короткие сроки снизить нагрузку нефтяных углеводов на наземные экосистемы с высокой степенью загрязнения почв нефтью.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность ведущему научному сотруднику отдела флоры и растительности Се-

вера с научным гербарием Института биологии Коми НЦ УрО РАН к. б. н. Е.Н. Патовой за помощь при проведении микроскопирования образцов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания “Разработка биокаталитических систем на основе ферментов, микроорганизмов и растительных клеток, их иммобилизованных форм и ассоциаций для переработки растительного сырья, получения биологически активных веществ, биотоплива, ремедиации загрязненных почв и очистки сточных вод” (AAAA-A17-117121270025-1) и проекта УрО РАН “Микробные сообщества криогенных почв как основа стабильного функционирования наземных экосистем Арктики и Субарктики в условиях меняющегося климата и антропогенного воздействия” (AAAA-A17-117122190039-0).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адаменко Л.С., Алексеев А.Ю., Забелин В.А., Филатов Д.А., Шаршов К.А., Шестопалов А.М. Метод утилизации нефтяных разливов с водной поверхности с применением сорбента на основе мультиграфена и микробного препарата в условиях, приближенных к естественным // Экологический вестник России. 2014. № 3. С. 32–34.
2. Алексеев А.Ю., Смородина Е.А., Адаменко Л.С., Емельянова Е.К., Забелин В.А., Ильичева Т.Н., Резников В.А., Шестопалов А.М. Подбор ассоциации микроорганизмов-деструкторов нефтяной фракции твердых алканов при низких положительных температурах // Современные проблемы науки и образования. 2011. № 6. <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=4939>
3. Алтунина Л.К., Сваровская Л.И., Филатов Д.А. Влияние света, трансформированного фотолюминесцентными пленками, на деструктивную активность микроорганизмов нефтезагрязненных почв // Оптика атмосферы и океана. 2012. № 11. С. 1014–1018.
4. Анчугова Е.М., Маркарова М.Ю., Щемелинина Т.Н. Эффективность и экологические аспекты применения растворов поверхностно-активных веществ для разделения фаз механических примесей и нефти из нефтешламов // Известия Самарского НЦ РАН. 2009. Т. 11(1). С. 202–207.
5. Анчугова Е.М., Мелехина Е.Н., Маркарова М.Ю., Щемелинина Т.Н. Подходы к оценке методов рекультивации нефтезагрязненных почв // Почвоведение. 2016. № 2. С. 257–260.
6. Аренс В.Ж., Гридин О.М., Яншин А.Л. Нефтяные загрязнения: как решить проблему // Экология и промышленность России. 1999. № 9. С. 33–36.
7. Водяницкий Ю.Н., Трофимов С.Я., Шоба С.А. Перспективные подходы к очистке почв и почвенно-

- грунтовых вод от углеводородов (обзор) // Почвоведение. 2016. № 6. С. 755–764.
8. Воробьев Ю.Л., Акимов В.А., Соколов Ю.И. Предупреждение и ликвидация аварийных разливов нефти и нефтепродуктов М.: Ин-октаво, 2005. С. 315.
 9. Девятова Т.А. Биоэкологические принципы мониторинга и диагностики загрязнения почв // Вестник Воронежского гос. ун-та. Сер. Химия. Биология. Фармация. 2005. № 1. С.103–106.
 10. Емельянова Е.К., Алексеев А.Ю., Мокеева А.В., Тарасова М.В., Шестопалов М.А., Карпова Е.В., Забелин В.А., Шестопалов А.М., Ильичева Т.Н. Биорекультивация загрязненных объектов в Тюменской области // Вестник НГУ. Сер. Биология, клиническая медицина. 2010. Т. 8. № 4. С. 155–161.
 11. Иванова Л.В., Кошелев В.Н., Буров Е.А., Стоколос О.А. Применение ИК-спектроскопии в исследовании нефтей // Труды Российского государственного университета нефти и газа им. И.М. Губкина. 2010. № 2. С. 76–80.
 12. Исмаилов Н.М. Нефтяное загрязнение и биологическая активность почв // Добыча полезных ископаемых и геохимия природных экосистем. М.: Наука, 1982. С. 227–235.
 13. Костенков Н.М., Ознобихин В.И. Особенности биоремедиации нефтезагрязненных почв в условиях Северного Сахалина // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2013. Т. 8. № 2. С. 224–227.
 14. Маганов Р.У., Маркарова М.Ю., Муляк В.В., Загвоздкин В.К., Заикин И.А. Природоохранные работы на предприятиях нефтегазового комплекса. Ч. I. Рекультивация загрязненных нефтью земель в Усинском районе Республики Коми. Сыктывкар, 2006. 208 с.
 15. Маслов М.Н., Маслова О.А., Ежелев З.С. Микробиологическая трансформация органического вещества в нефтезагрязненных тундровых почвах после рекультивации // Почвоведение. 2019. № 1. С. 70–78.
<https://doi.org/10.1134/S0032180X19010106>
 16. Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в пробах почв на анализаторе жидкости “Флюорат-02”. ПНД Ф 16.1.21-98. М., 1998. 15 с.
 17. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Звягинцева Д.Г. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. 304 с.
 18. Новаковская И.В., Патова Е.Н. Коллекция живых штаммов микроводорослей Института биологии Коми НЦ УрО РАН и перспективы ее использования // Известия Коми научного центра УрО РАН. 2012. № 2(10). С. 36–41.
 19. Патраков Ю.Ф., Счастливец Е.Л., Мандров Г.А. Изучение буроугольных гуминовых и фульвокислот методом ИК-спектроскопии // Химия твердого топлива. 2010. № 5. С. 9–14.
 20. Пиковский Ю.И. Трансформация техногенных потоков нефти в почвенных экосистемах // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М.: Наука, 1988. С. 7–22.
 21. Подавалов Ю.А. Экология нефтегазового производства. М.: Инфра-Инженерия, 2010. 175 с.
 22. Роговская П.И., Оргианская Ф.Е. Рекомендации по методам производства анализов на сооружениях биохимической очистки промышленных сточных вод. М.: Стройиздат, 1970. 104 с.
 23. Рогозина Е.А. Актуальные вопросы проблемы очистки нефтезагрязненных почв. Нефтегазовая геология. Теория и практика. www.ngtp.ru.
 24. Розанова М.С., Мылникова О.И., Кляйн О.И., Филиппова О.И., Холодов В.А., Листов Е.Л., Куликова Н.А. Оценка эффективности растворов гуминовых препаратов как промывных агентов для нефтезагрязненных почв и торфа в условиях модельного эксперимента // Почвоведение. 2018. № 9. С. 1160–1166.
<https://doi.org/10.1134/S0032180X18090101>
 25. Руденко Е.Ю. Влияние отходов пивоварения на ферментативную активность нефтезагрязненной чернозёмной почвы // Теоретическая и прикладная экология. 2011. № 3. С. 60–64.
 26. Сваровская Л.И., Филатов Д.А., Гэрэлмаа Т., Алтунина Л.К. Оценка степени биодеструкции нефти методами ИК- и ЯМР ¹H-спектроскопии // Нефтехимия. 2009. Т. 49(2). С. 153–158.
 27. Сопрунова О.Б. Использование цианобактериального комплекса для ремедиации нефтезагрязненных сред // Биотехнология. 2006. № 5. С. 52–56.
 28. Трофимов С.Я., Караванова Е.И. Жидкая фаза почв: учебное пособие по некоторым главам курса химии почв. М.: Университетская книга, 2009. 111 с.
 29. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980. 432 с.
 30. Филонов А.Е., Петриков К.В., Яшкина Т.В., Пунтус И.Ф., Власова Е.П., Нечаева И.А., Самойленко В.А. Режимы раздельного и совместного культивирования микроорганизмов-деструкторов нефти родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* // Биотехнология. 2008. № 6. С. 80–85.
 31. Фонкен Г., Джонсон Р. Микробиологическое окисление. М.: Мир, 1976. С. 82.
 32. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. М.: Наука, 2005. 252 с.
 33. Aitken C.M., Jones D.M., Maguire M.J., Gray N.D., Sherry A., Bowler B.F.J., Ditchfield A.K., Larter S.R., Head I.M. Evidence that crude oil alkane activation proceeds by different mechanisms under sulfate-reducing and methanogenic conditions // Geochim. Cosmochim. Acta. 2013. V. 109. P. 162–174.
<https://doi.org/10.1016/j.gca.2013.01.031>
 34. Allen C.C.R., Boyd D.R., Hemenstall F. Contrasting effects of a nonionic surfactant on the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil bacteria // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 1335–1339.
 35. Comino F., Aranda V., García-Ruiz R., Ayora-Cañada M.J., Domínguez-Vidal A. Infrared spectroscopy as a tool for the assessment of soil biological quality in agricultural soils under contrasting management practices // Ecological Indicators. 2018. V. 87. P. 117–126.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.12.046>
 36. Gao Y.-C., Wang J.-N., Xu J.-B., Kong X., Zhao L., Zeng D.-H. Assessing the quality of oil-contaminated sa-

- line soil using two composite indices // *Ecological Indicators*. 2013. V. 24. P. 105–112.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.06.005>
37. Grimberg S.J., Stringfellow W.T., Aitken M.D. Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the presence of a nonionic surfactant // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. V. 62. P. 2387–2392.
38. Khan F.I., Husain T., Hejazi R. An overview and analysis of site remediation technologies // *J. Environ. Manage.* 2004. V. 71. P. 95–122.
39. Roy D., Liu M., Wang G. Modeling of anthracene removal from soil columns by surfactant // *J. Environ. Sci. Health Part Environ. Sci. Eng.* 1994. V. 29. P. 197–213.
40. Sarkar D., Ferguson M., Datta R., Birnbaum S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation // *Environ. Pollution*. 2005. V. 136. P. 187–195.
41. Stevenson F.J., Goh K.M. Infrared spectra of humic acids and related substances // *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1971. V. 35. P. 471–483.
[https://doi.org/10.1016/0016-7037\(71\)90044-5](https://doi.org/10.1016/0016-7037(71)90044-5)
42. Stelmack P.L., Gray M.R., Pickard M.A. Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. P. 163–168.

Modeling of the “Contour Water Flooding” Technology in Microcosms

T. N. Shchemelinina¹, E. M. Anchugova^{1,*}, E. M. Lapteva¹, R. S. Vasilevich¹,
M. Yu. Markarova¹, E. N. Glazacheva², and M. V. Uspenskaya²

¹*Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, 167982 Russia*

²*Saint-Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics (ITMO University),
St. Petersburg, 197101 Russia*

*e-mail: anchugova@ib.komisc.ru

The results of modeling a complex biotechnology “contour water flooding” for the cleaning of heavily petroleum-polluted agro-soddy-podzolic soil (Albic Retisols (Loamic)) with the bacterial-yeast consortium, microalgae and algal-bacterial-yeast consortium and mineral fertilizers application are presented. The patterns of biotic indicators and the total petroleum hydrocarbon content in various stages of oil destruction are revealed. Changes in population of hydrocarbon-oxidizing microorganisms in the microcosms are shown to proceed in different aspects depending on the biological agent applied. When microalgae are applied, the population of hydrocarbon-oxidizing microorganisms declines by an order of magnitude, when bacterial-yeast and algal-bacterial-yeast consortium are applied the population is restored during 90 days. The biochemical activity in microcosms remains high during the experiment. The efficiency of oil-oxidizing microbial consortia application including those with microalgae cultures is shown. The bacterial-yeast and algal-bacterial-yeast consortia using mineral fertilizers have the maximum purification effect in simulating technology. The efficiency of soil purification from total petroleum hydrocarbons was 60–63% for 90 days in a laboratory model. IR spectroscopic data indicate the decline in the share of saturated aliphatic structures and the accumulation of bio-thermodynamically stable aromatic hydrocarbons and oxygen-containing residual components of oil, which are intermediate products of metabolism in the microbial oxidation of oil hydrocarbons.

Keywords: oil pollution, algal-bacterial-yeast consortium, biological activity, the efficiency of soil purification