

УДК 579.66.547

DOI: 10.15372/ChUR2020234

Биодеструктивные процессы в нефтезагрязненной глинистой почве

Е. Б. СТРЕЛЬНИКОВА, Л. И. СВАРОВСКАЯ, И. В. РУССКИХ, О. В. СЕРЕБРЕННИКОВА

*Институт химии нефти СО РАН,
Томск (Россия)**E-mail: seb@ipc.tsc.ru*

Аннотация

В лабораторных условиях с помощью аборигенной микрофлоры органического вещества исследованы процессы деструкции в нефтезагрязненной глинистой почве. В качестве стимулирующих добавок применяли торф и раствор композиции, содержащей поверхностно-активные вещества (ПАВ) и азотистый субстрат, а также их сочетание с фиторемедиацией. После биодеструкции остаточную нефть экстрагировали и исследовали методами ИК-спектроскопии, газожидкостной хроматографии (ГЖХ) и хромато-масс-спектрометрии. Согласно данным ИК-спектроскопии, торф и раствор композиции стимулируют процессы утилизации парафинов, что сопровождается увеличением относительного содержания ароматических и карбонилсодержащих структур. Изопреноидный коэффициент K_i , рассчитанный по спектрам ГЖХ как отношение изо- и *n*-алканов, отражающий степень биодеструкции углеводородов, увеличивается при внесении стимулирующих субстратов и рыхлении почвы. Максимальный коэффициент биодеградации (биодеструкции) наблюдается в пробе нефтезагрязненной глинистой почвы при внесении композиции, содержащей ПАВ, что способствует эмульгированию нефти и ускоряет процессы биодеструкции. Методом хромато-масс-спектрометрии в составе органического вещества почв идентифицированы ациклические (*n*- и изоалканы), алициклические (циклогексаны, дриманы, хейлантаны, регулярные и перегруппированные стераны и гопаны), нафтеноароматические (моно- и триароматические стераны) и ароматические (моно-, би-, три-, тетра- и пентациклические) углеводороды. В процессе биодеструкции, стимулированной внесением торфа и питательного субстрата, значительно снизилась концентрация углеводородов: *n*-алканов – на 61–73 %, ароматических соединений – на 72–86 %, циклогексанов – на 61–86 %, нефтяных стеранов и гопанов – на 42–76 %. Внесение в почву композиции приводит к значительному снижению содержания всего набора алканов C_{12} – C_{34} до уровня фоновой почвы. Применение торфа вуалирует (затеняет) результаты окисления алканов за счет их дополнительного присутствия в составе торфа. Использование стимулирующих субстратов в процессе биодеструкции приводит к снижению содержания ароматических углеводородов: моноциклических – на 82–89 %, бициклических – на 55–81 %, трициклических – на 74–89 %, тетрациклических – на 54–77 %.

Ключевые слова: нефтезагрязненная глинистая почва, микрофлора, углеводороды, биодеструкция, стимулирующие субстраты

ВВЕДЕНИЕ

Интенсивная эксплуатация природных ресурсов Западно-Сибирского региона в условиях низкой устойчивости геосистем к различным видам техногенных воздействий предопределяет существование целого комплекса экологических проблем, одна из которых – загрязнение

глинистых почв. Глинистые почвы характеризуются повышенной плотностью, низкой концентрацией кислорода и незначительным биопродуктивным потенциалом, что ингибирует жизнедеятельность микрофлоры – важной составляющей процесса почвообразования [1]. Для районов нефтедобычи Западной Сибири с широким распространением загрязненных слабо-

дренированных глинистых почв повышенной плотности и низкого плодородия актуально исследование микробиологических процессов деградации. К наиболее распространенным углеводородокисляющим микроорганизмам загрязненных почв относятся представители родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Rhodococcus* и др. [2, 3].

Цель данной работы – исследование в лабораторных условиях биодеструктивных изменений в составе углеводов загрязненной нефтью глинистой почвы с применением субстратов, стимулирующих активность аборигенной микрофлоры.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами физико-химических и микробиологических исследований служили образцы почвы, отобранные в 2018 г., через 2 года после инцидента на нефтепроводе в Томской области, в результате которого произошел выход нефти на поверхность. Пробы взяты в центре площади разлива нефти. Фоновый образец почвы (ФП) отобран на расстоянии 100 м от границы площади разлива. После доставки в лабораторию образец исходной нефтезагрязненной глинистой почвы (НГП_и) хранили в морозильнике.

Численность почвенной аборигенной микрофлоры определяли классическим методом посева на мясо-пептонную агаровую среду (МПА). Моделирование процессов биодеструкции нефти в почве проводили в лабораторных условиях при комнатной температуре в течение 22 сут. Для биодеструкции применяли микрофлору, изолированную из НГП_и и размноженную на МПА в чашках Петри. Для снижения плотности почвы и увеличения ферментативной активности аборигенной микрофлоры в загрязненную почву вносили низинный торф в концентрации 10 % от массы почвы и 2.5 %-й раствор композиции, содержащей поверхностно-активные вещества (ПАВ) и азотистый субстрат (в пересчете на массу воздушно-сухой почвы). Азотистые компоненты композиции служили дополнительным источником питания и энергии для почвенной микрофлоры. Эксперимент проводили в нескольких вариантах: контрольный образец без добавок (НГП_к), с добавлением композиции (НГП_и + К), торфа (НГП_и + Т), композиции и торфа (НГП_и + К + Т), композиции и торфа в комплексе с фиторемедиацией (НГП_и + К + Т + Ф). Фиторемедиация включала посев семян многолетних трав. Исследуемые образцы ув-

лажняли и тщательно перемешивали через каждые сутки для сохранения водного баланса, оптимальной биодеструкции и доступности кислорода для биоокислительных процессов.

Концентрацию исходного загрязнения в отобранных образцах почвы, а также после 3 недель биодеструкции определяли гравиметрическим методом. Экстракцию нефти проводили в аппарате Сокслета, в качестве экстрагента применяли 7 %-й раствор метанола в хлороформе. Экстракты высушивали, упаривали на ротационном испарителе и взвешивали после достижения постоянной массы. Полученные экстракты нефти анализировали методом ИК-спектрометрии с применением ИК-Фурье спектрометра Nikolet 5700 с Raman модулем (Thermo Electron, США). По оптической плотности функциональных групп нефти рассчитывали спектральные коэффициенты [4]: $C_{ар} = D_{1600}/D_{1465}$ – коэффициент ароматичности, характеризующий соотношение ароматических и парафиновых структур; $C_p = D_{1380}/D_{1465}$ – коэффициент разветвленности, показывающий относительное содержание CH_3 -групп; $C_{ок} = D_{1730}/D_{1465}$ – коэффициент окисленности, характеризующий относительное содержание групп $C=O$ карбоновых кислот, эфиров, кетонов, альдегидов.

Углеводороды (УВ) из экстрактов выделяли методом жидкостно-адсорбционной хроматографии на стеклянной колонке, заполненной оксидом алюминия IV степени активности по Брокману. Элюентом выступал *n*-гексан. Состав *n*- и изоалканов определяли с применением газожидкостного хроматографа “Хромос ГХ-1000” (Россия).

Совокупность насыщенных и ароматических УВ анализировали с помощью квадрупольного хромато-масс-спектрометра Trace-DSQ (Thermo Scientific, Германия) в режиме полного сканирования в диапазоне масс 50–550 Да. Хроматографическое разделение компонентов осуществляли на кварцевой капиллярной колонке фирмы Agilent с внутренним диаметром 0.25 мм, длиной 30 м и неподвижной фазой DB-5MS толщиной 0.25 мм; газ-носитель – гелий. Исследуемые пробы ступенчато нагревали в токе гелия по температурной программе: на первой ступени при изотерме $T = 80$ °С (2 мин), далее со скоростью 3 °С/мин до 300 °С с последующей 25-минутной выдержкой при этой температуре. Характеристика масс-спектрометра: метод ионизации – электронный удар; энергия ионизирующих электронов – 70 эВ; температура ионизационной камеры и интерфейса – 270 °С.

Данные хромато-масс-спектрометрии получены и обработаны с использованием программного обеспечения Xcalibur. Идентификация пиков компонентов была основана на масс-спектральных данных, включая сравнение с библиотекой масс-спектров Национального института стандартов NIST-05, а также временах их удерживания. Расчет содержания компонентов проводили по площади соответствующих пиков на хроматограммах с использованием внутреннего стандарта (дейтероаценафтен $C_{12}D_{10}$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исходное содержание нефти в отобранных образцах загрязненной почвы составило 3 г/кг, в ФП не превышало 0.2 г/кг, в почве, подвергнутой различным вариантам биоремедиации, – 0.6–1.0 г/кг.

Почвенный биоценоз представлен родами *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, дрожжевыми и грибковыми культурами. Первые несколько суток характеризовались низкой численностью почвенной микрофлоры (рис. 1), что свидетельствует об адаптации к новым условиям. Часть микроорганизмов погибла, выжили в основном углеводородокисляющие группы, которые использовали УВ нефти как источник питания и энергии. Численность микрофлоры распределялась неравномерно, более активное накопление биомассы наблюдалось на 11–22-е сут эксперимента. Начальная численность микрофлоры в НГП_и не превышала 1 тыс. колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 г почвы.

В процессе биодеструкции численность микрофлоры в НГП_к увеличилась до 56 тыс. КОЕ/г, в экспериментах с применением композиции и при совместном использовании композиции и торфа – до 170 тыс. и 220 тыс. КОЕ/г соответственно. Максимальная численность аборигенной микрофлоры в эксперименте с использованием стимулирующего раствора, торфа и фиторемедиации составила 453 тыс. КОЕ/г почвы.

По ИК-спектрам почвенных экстрактов были рассчитаны коэффициенты ароматичности ($C_{ар}$), разветвленности (C_p) и окисленности ($C_{ок}$), характеризующие ферментативную активность микрофлоры в разных вариантах биодеструкции (табл. 1).

Фоновая почва характеризуется максимальными значениями коэффициентов $C_{ар}$, C_p , $C_{ок}$. Загрязнение почвы нефтью приводит к их снижению до минимальных значений, что связано с появлением полос поглощения метильных (1380 см^{-1}) и метиленовых (1465 см^{-1}) групп нефтяных УВ на ИК-спектрах. Добавление торфа и раствора композиции повышает численность и активность почвенной микрофлоры, особенно в процессах утилизации парафинов, и сопровождается увеличением спектральных коэффициентов. При применении фиторемедиации совместно с добавлением торфа и композиции спектральные коэффициенты, в том числе $C_{ок}$, увеличились максимально.

Добавление торфа в глинистую тяжелую почву способствует ее разрыхлению и снижению плотности. Имеющиеся в торфе органические соединения могут служить дополнительным питательным субстратом для почвенного биоце-

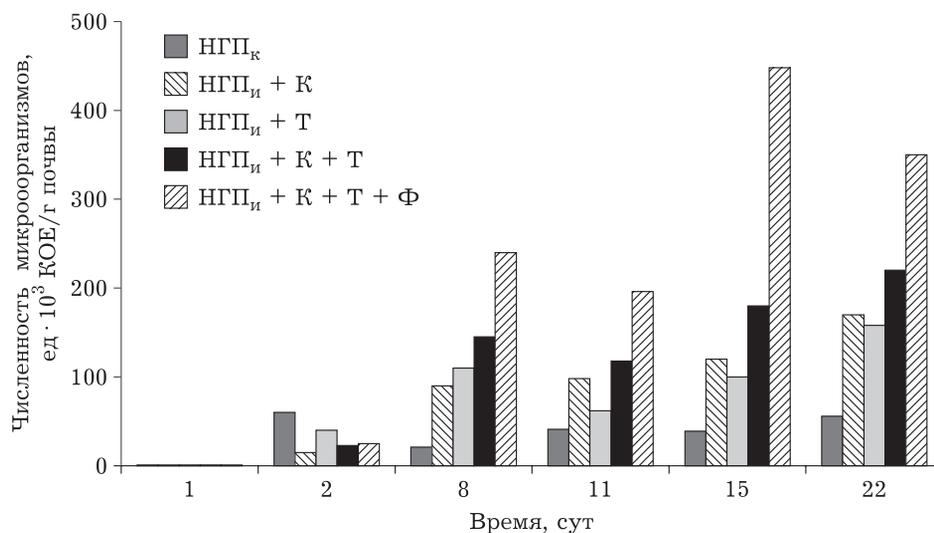


Рис. 1. Динамика численности микроорганизмов в процессе биодеструкции нефти.

ТАБЛИЦА 1

Спектральные коэффициенты – показатели окислительной активности микроорганизмов почвы

Спектральный коэффициент	Образец почвы						
	ФП	НГП _и	НГП _к	НГП _и + К	НГП _и + Т	НГП _и + К + Т	НГП _и + К + Т + Ф
$C_{ар}$	0.30	0.11	0.12	0.16	0.15	0.14	0.19
C_p	0.81	0.53	0.58	0.65	0.60	0.58	0.66
$C_{ок}$	1.70	0.34	0.41	0.72	0.88	0.69	0.89

Примечание. $C_{ар} = D_{1600}/D_{1465}$; $C_p = D_{1380}/D_{1465}$; $C_{ок} = D_{1730}/D_{1465}$, где D_{1600} – оптическая плотность в области 1600 см^{-1} , характеризующая содержание ароматических структур; D_{1465} – оптическая плотность в области 1465 см^{-1} , характеризующая содержание метиленовых групп; D_{1380} – оптическая плотность в области 1380 см^{-1} , характеризующая содержание метильных групп; D_{1730} – оптическая плотность в области 1730 см^{-1} , характеризующая содержание карбонильных групп.

ноза [5–7]. Торф, состоящий из перегнивших, спрессованных остатков мха, применяется для радикального и быстрого улучшения свойств почвы. Его достоинство – экологическая чистота, не агрессивность.

По результатам ГЖХ рассчитан изопреноидный коэффициент: $K_i = (Pr + Ph)/(C_{17} + C_{18})$, определяющий активность биодеструкции алканов [8] (табл. 2). Он представляет собой отношение содержания суммы изопреноидных УВ пристана (Pr) и фитана (Ph) к сумме *n*-гептадекана (C_{17}) и *n*-октадекана (C_{18}). Чем выше значения K_i , тем глубже происходят биодеструктивные изменения в составе насыщенных УВ. Значение параметра Pr/Ph в процессе биодеструкции меняется незначительно (см. табл. 2), что согласуется с данными [9] о сохранении этого фациально-генетического отношения и позволяет соотносить остаточную нефть, присутствующую в почве, с вероятными источниками загрязнения.

Почва, загрязненная нефтью, подвергается физико-химическому и микробиологическому воздействию. Деструкция отдельных компонентов нефти происходит неравномерно. Наиболее активно деструктируют *n*-алканы. Их атомы углерода соединены одинарной связью и при ферментативном микробиологическом окислении не требуют значительной затраты энергии [10]. При внесении стимулирующих субстратов и рыхлении почвы активность почвенного био-

ценоза возрастает. Об этом свидетельствует увеличение значения K_i . Максимальный коэффициент биодеструкции наблюдается для пробы НГП_и + К, в которой композиция добавлена в качестве субстрата, стимулирующего окислительную активность почвенной микрофлоры. Поверхностно-активные вещества как компонент раствора композиции способствуют эмульгированию нефти, что ускоряет процессы биодеструкции. Эффективность биодеструкции с применением фиторемедиации ниже, что связано с недостаточным развитием ризосферы – корневой системы растений и почвы вокруг корней. Ризосфера характеризуется высокой биологической активностью микроорганизмов, стимулируемых питательными выделениями корневой системы [11]. В глинистой почве для развития ризосферы нужен более длительный вегетационный период (30–60 сут в зависимости от типа почв).

Состав органического вещества (ОВ) анализировали методом хромато-масс-спектрометрии. Идентифицированы ациклические (*n*- и изоалканы), алициклические (циклогексаны, дриманы, хейлантаны, регулярные и перегруппированные стераны и гопаны), нафтоароматические (моно- и триароматические стераны) и ароматические (моно-, би-, три-, тетра- и пентациклические) УВ (рис. 2).

В образцах, подвергнутых биодеструкции, резко снижено содержание всех классов УВ по

ТАБЛИЦА 2

Геохимические параметры *n*-алканов в почвах

Коэффициент деструкции	Образец почвы						
	ФП	НГП _и	НГП _к	НГП _и + К	НГП _и + Т	НГП _и + К + Т	НГП _и + К + Т + Ф
K_i	0.68	1.32	1.61	2.33	1.94	2.18	1.89
Pr/Ph	0.73	0.97	0.93	0.78	0.78	0.81	0.86

Примечание. K_i – изопреноидный коэффициент; Pr/Ph – отношение пристана к фитану.

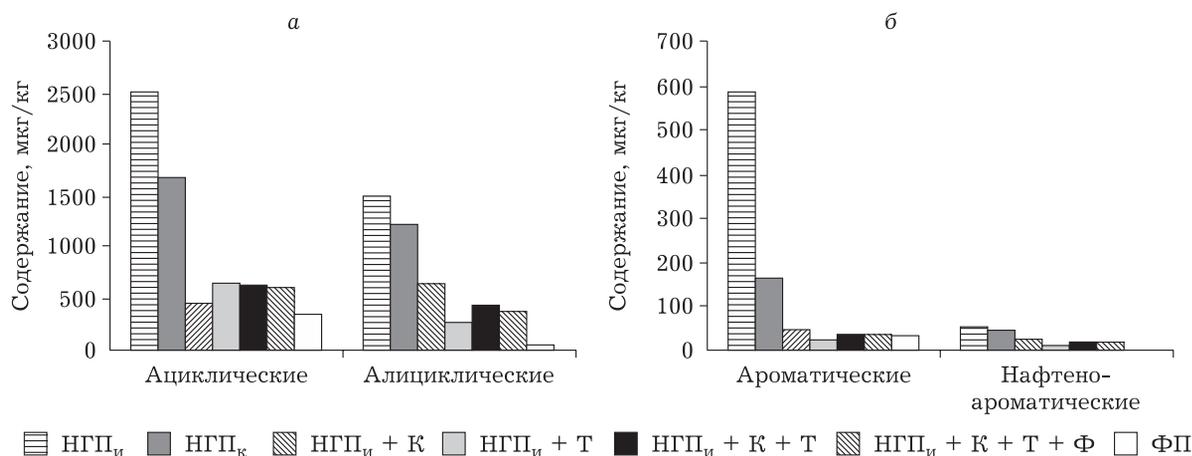


Рис. 2. Содержание ациклических, алициклических (а) и ароматических, нафтоароматических (б) углеводородов в исследованных пробах почвы.

сравнению с НПП_и. Это касается и контрольного образца почвы, где добавление субстратов не применялось, тем не менее деструкция составила 34 %. При этом содержание *n*-алканов снизилось на 33 %, ароматических соединений – на 72 %, циклогексанов – на 44 %, нефтяных стеранов – на 25 %.

Протеканию процессов биоремедиации в контрольном эксперименте способствовало регулярное рыхление и увлажнение почвы, а также доступ солнечного света, что создавало благоприятные условия жизнедеятельности для почвенной микрофлоры. Перемешивание, вероятно, увеличивало адсорбцию микроорганизмов на частичках глинистой почвы, в результате чего их ферментативная окислительная активность повышалась.

Биодеструкция нефти в исследованных образцах с применением стимулирующих субстратов прошла интенсивнее по сравнению с контрольным вариантом на 62–69 %. Значительно снизилась концентрация всех классов соединений: *n*-алканов – на 61–73 %, ароматических соединений – на 72–86 %, циклогексанов – на 61–86 %, нефтяных стеранов и гопапов – на 42–76 %.

Характер молекулярно-массового распределения (ММР) *n*-алканов в экстрактах почв позволяет утверждать, что процессы биодegradации прошли интенсивно (рис. 3), резко снизилось содержание индивидуальных *n*-алканов C₁₂–C₂₄. В составе ОВ образца ФП определено минимальное содержание алканов с максимумом распределения, приходящемся на нечетные гомологи C₂₅–C₃₁. В образце НПП_и содержание четных и нечетных гомологов равное, мак-

симум приходится на алканы C₁₅–C₁₉. Подобное (идентичное) распределение алканов наблюдается в пробе НПП_к, но их концентрация снижается в 1.5 раза по сравнению с исходной. Применение стимулирующих субстратов повышает активность микроорганизмов, характер ММР алканов изменяется. Их концентрация снижается в 2.6–3.7 раза по сравнению с контрольным вариантом. Использование торфа как сорбента и стимулятора почвенного биоценоза снижает содержание алканов C₁₂–C₂₂ и увеличивает долю природных высокомолекулярных алканов C₂₃–C₃₃, которые содержатся в торфе и ФП. Внесение в почву композиции повышает окислительную активность почвенной микрофлоры, что приводит к значительному снижению содержания всего набора алканов C₁₂–C₃₄ до уровня, близкого к ФП (см. рис. 3).

Изучению процессов биодеструкции ароматических соединений посвящен ряд работ [12–18]. Показана способность микробактерий окислять полициклоароматические углеводороды (ПАУ), такие как фенантрен, пирен, флуорантен, бенз[а]пирен. В результате биоремедиации загрязненных вод штаммом *Bacillus amyloliquefaciens* через 30 ч инкубации полностью разрушались многоядерные ароматические компоненты. Показано, что ароматические УВ более устойчивы к микробиологическому окислению, чем алканы и нафтены. Главным фактором деградации ПАУ в окружающей среде, особенно в воде и воздухе, является фотолиз, инициированный ультрафиолетовым излучением. Первыми окисляются моноциклические ароматические соединения, причем алкилированные гомологи деструктируют интенсивней по сравнению

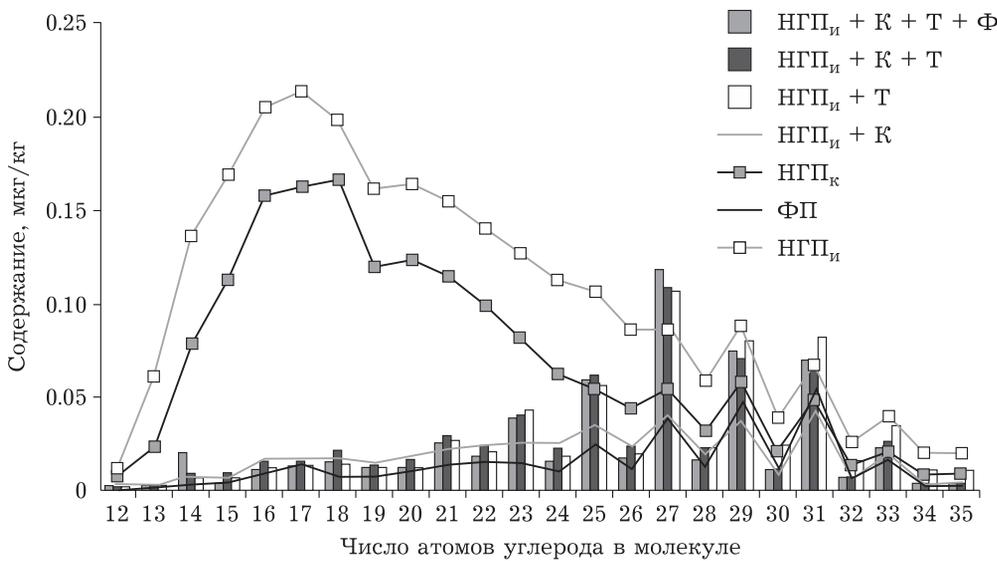


Рис. 3. Распределение *n*-алканов в исследованных пробах почвы.

с голядерными за счет боковых алкильных цепей [19]. Окисляющая активность микроорганизмов снижается с увеличением числа конденсированных колец. При использовании консорциума микроорганизмов степень биодеструкции органических загрязнителей выше на 5–10 %, чем при их раздельном внесении.

Среди ароматических соединений в **исходной нефтезагрязненной почве** обнаружены моно-, би-, три-, тетра- и пентациклические УВ (табл. 3), которые по содержанию образуют ряд: три- > би- > моно- > тетра- > пентациклические. Концентрация моноциклических *n*-алкилбензолов меньше по сравнению с таковой для метилалкилбензолов. Би- и трициклические УВ по содержанию располагаются в ряду: голядерная структура < метил- < диметил- < триметил- < тетраметилгомологи. Среди тетрациклических УВ обнаружены пирен, флуорантен и их метилзамещенные гомологи, а также бенз[а]антрацен и его метил- и диметилпроизводные. В составе пентациклических УВ зафиксированы бензфлуорантены и бензпирен.

В **фоновой почве** содержание ароматических УВ почти в 20 раз меньше по сравнению с исходной нефтезагрязненной, однако в ее составе также идентифицированы все группы ароматических УВ (см. табл. 3), что свойственно ОВ почв, подверженных техногенному воздействию.

В результате **эксперимента без применения дополнительных субстратов** содержание *n*-алкил- и метилалкилбензолов по сравнению с образцом НГП_и снизилось на 42 и 36 % соответ-

ственно. Содержание голядерного нафталина не изменилось, концентрация его метилзамещенных гомологов снизилась на 35 %. Содержание ди-, три- и тетраметилпроизводных нафталина снизилось на 79, 94 и 92 % соответственно, что скорее всего связано с окислением их за счет боковых цепей [19]. В результате появляется голядерный нафталин, который суммируется, вероятно, с частично деградированным нафталином, присутствующим изначально в исходной пробе. Аналогичным образом окисляются фенантрены. В контрольной почве по сравнению с исходной концентрация фенантрена снизилась на 34 %, а его метил-, диметил- и триметилзамещенных гомологов – на 90, 81 и 61 % соответственно. Содержание пирена и флуорантена в контрольной пробе по сравнению с исходным образцом почвы снизилось на 59 и 80 % соответственно, их метилпроизводных – на 72 %. Биодеструкция бенз[а]антрацена в образце НГП_к по сравнению с НГП_и составила 12 %, его метил- и диметилпроизводных – 48–49 %, бензфлуорантенов и бензпирена – 58 % (см. табл. 3).

Известно, что окисление пирена с использованием штамма *Rhodococcus erythropolis* при 15 °С составило 89 и 92 % через 28 и 48 сут соответственно [20]. Интродуцированные в модельные почвенные системы активные микроорганизмы-деструкторы рода *Pseudomonas* полностью утилизируют нафталин и фенантрен в концентрациях 2.5 и 1 мг/г серой лесной почвы в течение 3–4 сут соответственно [21, 22]. Показано, что по истечении 30 сут инкубации

ТАБЛИЦА 3

Влияние стимулирующих субстратов и фиторемедиации на степень биодеструкции ароматических, нафтоароматических и алициклических соединений

Соединения	Содержание, мкг/кг почвы						
	Образец почвы						
	НГП _и	НГП _к	НГП _и + К	НГП _и + Т	НГП _и + К + Т	НГП _и + К + Т + Ф	ФП
Ароматические углеводороды							
Моноциклические							
<i>n</i> -Алкилбензолы	19.0	11.0	1.1	1.0	1.4	1.2	0.8
Метилалкилбензолы	36.6	23.3	4.4	2.7	4.8	2.7	0.7
Бициклические							
Нафталин	0.4	0.4	0.2	0.03	0.1	0.2	0.1
Метилнафталины	2.0	1.3	0.9	0.4	0.7	1.2	0.5
Диметилнафталины	11.6	2.4	1.1	0.4	0.8	1.2	1.6
Триметилнафталины	34.2	1.9	0.7	0.5	0.5	0.8	2.3
Тетраметилнафталины	94.4	7.2	1.9	1.2	2.2	2.5	0.7
Трициклические							
Фенантрен	3.5	2.3	2.1	1.2	1.7	2.5	2.4
Метилфенантрены	42.6	4.4	3.3	0.8	1.2	2.3	2.7
Диметилфенантрены	145.4	27.6	7.6	1.1	2.5	2.9	2.3
Триметилфенантрены	148.6	57.5	11.0	7.3	7.5	8.0	1.1
Тетрациклические							
Пирен	5.8	2.4	0.8	0.7	1.1	1.1	2.7
Флуорантен	4.0	0.8	0.4	0.5	0.6	0.5	3.5
Метилфлуорантены, метилпирены	13.4	3.7	1.4	1.4	2.0	1.8	7.4
Бенз[а]антрацен	3.4	3.0	1.6	0.6	1.6	1.0	0.4
Метилбенз[а]антрацены	11.2	5.8	2.2	1.0	2.3	2.2	0.4
Диметилбенз[а]антрацены	14.3	7.3	3.4	1.2	3.0	3.2	0.2
Пентациклические							
Бензфлуорантены	2.9	0.9	0.6	0.6	0.2	0.2	2.3
Бензпирен	1.5	0.8	1.1	0.4	0.3	0.3	0.6
Нафтоароматические углеводороды							
МАС	13.8	13.1	7.4	3.1	5.0	4.7	0
ТАС	37.2	31.7	16.6	7.2	12.3	12.1	0
Алициклические углеводороды							
Циклогексаны	210.5	118.0	46.2	15.8	27.6	21.0	8.3
Дриманы	342.7	138.7	28.8	16.9	25.2	15.7	0
Хейлантаны	43.7	27.8	19.2	8.2	17.7	15.4	1.5
Регулярные стераны	195.1	152.4	95.9	46.2	61.7	54.9	4.8
Диастераны	263.5	190.6	93.0	35.7	58.7	56.4	5.8
Гопаны	477.0	595.5	368.5	141.5	240.3	209.4	14.8

Примечание. МАС – моноароматические стераны, ТАС – триароматические стераны.

нефти в контакте с аборигенной микрофлорой содержание нафталинов в ней снизилось в среднем на 82 %, фенантронов – на 57 %, флуорантена и пирена – на 64 %, дибензантрацена и хризена – на 45 % [23]. Ранее считалось, что такие многоядерные ПАУ, как инденопирен и бенз[к]флуорантен окисляются только грибно-

выми культурами, но в работе [24] представлены данные об их бактериальной деградации микробными ассоциациями.

В результате применения **стимулирующих субстратов** процессы биодеструкции прошли более интенсивно. По сравнению с контрольным образцом в составе ароматических УВ содержа-

ние *n*-алкилбензолов снизилось на 87–91 %, метилалкилбензолов – на 79–88 %. Бициклические УВ окислились на 55–81 %, причем максимальная деструкция голоядерного нафталина и его метил-, ди-, три- и тетраметилзамещенных гомологов зафиксирована в эксперименте с торфом. Окисление трициклических УВ составило 74–89 %, при этом деструкция фенантрена и его гомологов также наиболее успешно прошла с использованием низинного торфа. Пирен, флуорантен и их метилзамещенные гомологи утилизированы на 42–60 %, бенз[а]антрацены – на 54–82 %. Бензфлуорантены и бензпирены после добавления стимулирующих субстратов обнаружены в следовых количествах.

Минимальная степень деструкции нафтеноароматических УВ зафиксирована при использовании композиции, а максимальная – при добавлении к нефтезагрязненной почве торфа. Промежуточные результаты получены при сочетании торфа с композицией и дополнительном введении растений в стимулирующий развитие микрофлоры субстрат. Степень элиминирования насыщенных бициклических УВ (дриманов) мало зависит от условий эксперимента и составляет 79–89 %. Биодеградация насыщенных три- (хейлантаны), тетра- (стераны) и пента- (гопаны) циклических УВ в большей мере стимулирует внесение в почву торфа (71–81 %). Добавление к торфу композиции и растений понижает степень деструкции до 36–70 %. При использовании композиции степень деструкции алициклических три-, тетра- и пентациклических УВ снижается до 31–51 % и достигает 51 % только в случае диастеранов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что внесение питательных субстратов и торфа в малопродуктивную тяжелую нефтезагрязненную глинистую почву стимулирует численность и окислительную активность почвенного биоценоза. Исследование динамики содержания в почве углеводородов нефти показало низкую степень биодеструкции в первые 3–10 сут культивирования, составившей 0–8 %, что объясняется коротким периодом ремедиации, малой численностью и слабой ферментативной активностью микроорганизмов в глинистых почвах. После 22 сут культивирования с использованием стимулирующих добавок и фиторемедиации биодеструкция нефти достигла 67–80 %, в контрольном варианте – 33 %.

Деструктивным изменениям подвержены все группы нефтяных углеводородов, максимальная биодеструкция отмечена для моно-, би- и трициклических ароматических углеводородов. Снижение содержания *n*-алканов C_{12} – C_{34} до уровня фоновой почвы наблюдается при внесении в почву композиции, содержащей азотистый субстрат и поверхностно-активные вещества. Добавление к глинистой почве торфа, приводящее к ее разрыхлению и снижению плотности, способствует разрушению микробами преимущественно крупных полициклических молекул. Применение фиторемедиации приводит к сукцессионным изменениям почвенного биоценоза за счет корневых выделений растений, что при совместном использовании питательных субстратов перспективно при разработке биотехнологии рекультивации нефтезагрязненных почв. Полученные результаты показывают возможность использования добавок, способствующих деструкции отдельных нефтяных компонентов, для оптимизации биоремедиации почв, загрязненных нефтями и нефтепродуктами разного химического состава.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИХН СО РАН (проект № 0370-2019-0003).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Московченко Д. В. Экогеохимия нефтегазодобывающих районов Западной Сибири. Новосибирск: Гео, 2013. 259 с.
- 2 Kulicheva N. N., Lysak L. V., Kozhevnikov P. A., Zvyagintsev D. G. Bacterial complexes in the soil, fallen leaves, and phylloplane of an urban ecosystem // *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 1996. Vol. 65, No. 3. P. 366–370.
- 3 Milekhina E. I., Borzenkov I. A., Zvyagintseva I. S., Kostrikin N. A., Belyaev S. S. Characterization of a hydrocarbon-oxidizing *Rhodococcus erythropolis* strain isolated from an oil field // *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 1998. Vol. 67, No. 3. P. 271–274.
- 4 Калугина Н. П., Глебовская Е. А., Бабаев Ф. П. Инфракрасная спектроскопия нефтей и конденсатов. Новосибирск: Наука, 1990. 271 с.
- 5 Svarovskaya L. I., Serebrennikova O. V., Duchko M. A., Strel'nikova E. B., Russkikh I. V. Changes in the composition of the bituminous components of valley peat under stimulated microbial action // *Solid Fuel Chemistry*. 2017. Vol. 51, No. 2. P. 67–77.
- 6 Serebrennikova O. V., Duchko M. A., Koronotova N. G., Strel'nikova E. B. Concentrations and composition of sphagnum peat lipids depending on temperature in the climatic zones of Western Siberia // *Solid Fuel Chemistry*. 2018. Vol. 52, No. 1. P. 36–43.
- 7 Serebrennikova O. V., Strel'nikova E. B., Russkikh I. V., Duchko M. A. Composition of the lipids of the sphagnum and cotton grass peats in the forest steppe and southern and middle taigas of West Siberia // *Solid Fuel Chemistry*. 2017. Vol. 51, No. 4. P. 195–204.

- 8 Гончаров И. В. Геохимия нефтей Западной Сибири. М.: Недра, 1987. 179 с.
- 9 Каширцев В. А. Индикаторы обстановок формирования залежей углеводородов. М.: Наука, 1988. 94 с.
- 10 Оборин А. А., Хмурчик В. Т., Иларионов С. А., Макарова М. Ю., Назаров А. В. Нефтезагрязненные биоценозы. Пермь: УрО РАН; Перм. гос. ун-т; Перм. гос. техн. ун-т, 2008. 511 с.
- 11 Емнова Е. Е., Меренюк Г. В., Сланина В. А., Татару Ю. М., Руснак Т. Н. Видовой состав сапрофитных флуоресцирующих псевдомонад в ризоплане различных видов сельскохозяйственных растений // Микробиология. 1995. Т. 64, № 6. С. 820–826.
- 12 Иванова И. А., Ибрагимов Р. К., Ибрагимова Д. А., Петров С. М. Обзор микробиологических способов борьбы с отложениями высокомолекулярных компонентов нефти // Вестн. техн. ун-та. 2015. Т. 18, № 20. С. 137–143.
- 13 Kim S., Kweon O., Jones R. C., Freeman J. P., Edmondson R. D., Cerniglia C. E. Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology // Journal of Bacteriology. 2007. Vol. 189, No. 2. P. 464–472.
- 14 Cheung P. Y., Kinkle B. K. Mycobacterium diversity and pyrene mineralization in petroleum-contaminated soils // Appl. Environ. Microbiol. 2001. Vol. 67. P. 2222–2229.
- 15 El Naggar A. Y., Kamel M. M., Aladly A. A., Ismail N. A. Bioremediation of paraffinic and polynuclear aromatic hydrocarbons using laser irradiated *Bacillus amyloliquefaciens* // Journal of American Science. 2010. Vol. 6, No. 10. P. 661–670.
- 16 Киреева Н. А., Водопьянов В. В., Мифтахова А. М. Биологическая активность нефтезагрязненных почв. Уфа: Гилем, 2001. 377 с.
- 17 Пиковский Ю. И. Природные и техногенные потоки углеводородов в окружающей среде. М.: МГУ, 1993. 208 с.
- 18 Федорова Ю. А., Ахметова Г. И., Коржова Л. Ф., Ягафарова Г. Г. Изучение биодеструкции органических поллютантов ароматического ряда // Вестн. техн. ун-та. 2017. Т. 20, № 15. С. 143–146.
- 19 Розанова Е. П., Кузнецов С. И. Микрофлора нефтяных месторождений. М.: Наука, 1974. 197 с.
- 20 Margesin R., Moertelmaier C., Mair J. Low-temperature biodegradation of petroleum hydrocarbons (*n*-alkanes, phenol, anthracene, pyrene) by four actinobacterial strains // Int. Biodeter. Biodegr. 2013. Vol. 84. P. 185–191.
- 21 Puntus I. F., Filonov A. E., Kosheleva I. A., Gayazov R. R., Karpov A. V., Boronin A. M. Isolation and characterization of microorganisms capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons // Microbiology (Mikrobiologiya). 1997. Vol. 66, No. 2. P. 222–225.
- 22 Filonov A. E., Puntus I. F., Karpov A. V., Gaiazov R. R., Kosheleva I. A., Boronin A. M. Growth and survival of *Pseudomonas putida* strains degrading naphthalene in soil model systems with different moisture levels // Process Biochemistry. 1999. Vol. 34. P. 303–308.
- 23 Алтунина Л. К., Сваровская Л. И. Микробиологический метод глубокой очистки нефтешлама, загрязненного вязкой нефтью месторождения Цаган-Элс (Монголия) // Нефть. Газ. Новации. 2016. № 6. С. 50–54.
- 24 Анкудинова А. В., Малахова Д. В., Гарабаджиу А. В., Горина А. С., Янкевич М. И. Исследование микроорганизмов-ПАУ-деструкторов, выделенных из техногенно-нарушенных почв // Естеств. и техн. науки. 2008. № 3. С. 114–119.