

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Федеральный исследовательский центр
КРАСНОЯРСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
Сибирского отделения российской академии наук

На правах рукописи

ТРУСЕЙ
Ирина Валерьевна

**СТИМУЛЯЦИЯ IN SITU АВТОХТОННЫХ ПСИХРОФИЛЬНЫХ И
МЕЗОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ
ГРУНТОВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЕПРОДУКТАМИ**

03.02.08 экология
(биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук
Ю. Л. Гуревич

Красноярск, 2018

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Сравнительный анализ технологий, направленных на восстановление объектов, загрязненных углеводородами	11
1.1.1 Технологии биостимуляции и биоаугментации	16
1.1.2 Условия среды, лимитирующие процессы биоремедиации in situ	22
1.1.3 Биоремедиация грунтов, загрязненных углеводородами	29
1.2 Потенциал психрофильных микроорганизмов в процессах биоремедиации	32
1.3 Микробная биodeградация углеводородов	36
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
2.1 Природно-географическая характеристика района исследования	45
2.2 Объекты исследования	47
2.3 Методы микробиологического анализа.....	56
2.4 Экспериментальные работы	58
2.4.1 Лабораторные эксперименты с почвенными микрокосмами	58
2.4.2 Натурные эксперименты	61
2.5 Методика проведения биостимуляции в грунтах, загрязненных нефтепродуктами.....	64
2.6 Статистическая обработка данных	69
ГЛАВА 3. ИЗМЕНЕНИЕ ЧИСЛЕННОСТИ АВТОХТОННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЗАГРЯЗНЕННОЙ НЕФТЬЮ ПОЧВЕ ПРИ КОРРЕКЦИИ УСЛОВИЙ СРЕДЫ	71
3.1. Характеристика изолятов психрофильных бактерий верхнего горизонта почвы	72
3.2 Сравнительный анализ численности психрофильных и мезофильных микроорганизмов в почве.....	81
3.3 Динамика численности микроорганизмов в почвенных микрокосмах при внесении карбамидоформальдегидного полимера	84

3.4 Стимуляция автохтонной микрофлоры в нефтезагрязненной почве <i>in situ</i> .	90
ГЛАВА 4. СТИМУЛЯЦИЯ АВТОХТОННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ <i>IN SITU</i> В ГРУНТАХ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЕПРОДУКТАМИ	102
4.1 Факторы, определяющие распределение микроорганизмов в грунтах....	102
4.2 Стимуляция автохтонных микроорганизмов в грунтах зоны аэрации	107
4.3 Стимуляция автохтонных микроорганизмов в грунтовых водах.....	117
4.4 Динамика гидрохимических показателей грунтовых вод при проведении биостимуляции	124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	142
ВЫВОДЫ	147
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	149
Приложения	170

ВВЕДЕНИЕ

Углеводороды нефти относятся к широко распространенным поллютантам поверхностных и подземных экосистем (Vogt and Richnow, 2014). При добыче, транспортировке, переработке и хранении в результате аварийных разливов ежегодно теряется 2% от извлекаемой из недр нефти, это составляет 60–70 млн. тонн в год (Бешенцев, 2013; Филонов, 2016). Помимо загрязнения сырой нефтью, регистрируется загрязнение продуктами ее переработки, особенно в районе городов и крупных предприятий. Учитывая количество объектов, на которых хранятся нефтепродукты, защита окружающей среды в этих местах требует самого пристального внимания и безотлагательных действий. По оценкам специалистов при однократном загрязнении, углеводороды в грунтах могут оставаться в неизменном виде сотни лет (Другов и Родин, 2007).

Для ликвидации последствий углеводородного загрязнения широко применяются биологические методы. В основном методы биоремедиации основаны на повышении интенсивности деградации углеводородов нефти микроорганизмами. Используют два подхода – *биостимуляцию* (активизация роста автохтонных микроорганизмов) и *биоаугментацию* (интродукция композиций из смешанных культур углеводородокисляющих микроорганизмов) (Atlas, 1995; Климентова и др., 2007; Филонов, 2016).

Биостимуляция включает в себя модификацию среды для активизации автохтонных микроорганизмов, способных к биоремедиации, и осуществляется путем коррекции таких условий, как аэрируемость, содержание биогенных элементов питания, pH и температура (Margesin et al., 2000). Основным преимуществом биостимуляции является то, что автохтонные микроорганизмы адаптированы к условиям среды и занимают все пространство загрязненной зоны. На практике, биостимуляцию чаще всего осуществляют путем внесения минеральных биогенных элементов питания в загрязненную зону. Этот метод

представляет собой универсальный и высокоэффективный прием, позволяющий увеличить численность автохтонных микроорганизмов.

Надо отметить, что обработка нарушенных объектов биогенными элементами питания не есть тривиальное внесение удобрений. В первую очередь необходимо сбалансировать соотношение углерода, азота, фосфора в среде, чтобы скорость биodeградации поллютанта была максимальной. Рекомендуемое соотношение углерода, азота и фосфора для нефтезагрязненных экосистем составляет 100:10:1 или 70:7:1 (Wolicka and Borkowski, 2012). Вторым важным моментом, который требует решения – доставка биогенных элементов к зонам загрязнения. Особенно это актуально для грунтов, где плотные, непроницаемые породы (например, глина) или разломы затрудняют распространение минеральных элементов в толще (Adams et al., 2015). Таким образом, в этой сфере есть множество вопросов, которые требуют своего технологического решения.

В сравнении с биостимуляцией, методы биоаугментации, которые основаны на внесении микробных препаратов, часто представляют как необходимый и эффективный подход. В связи с этим отметим, что при мероприятиях биоаугментации вместе с культурами микроорганизмов в обрабатываемую систему обязательно вносят биогенные элементы. Ряд авторов считают, что вклад интродуцированных микроорганизмов в деградацию поллютанта существенно меньше, чем вклад биогенных элементов (Atlas, 1995; *Psycrophiles: from Biodiversity...*, 2008). В работах (Thouand et al., 1999; Venosa et al., 1992) проанализирован целый ряд коммерческих микробных препаратов и отмечена их низкая эффективность. Нередкие неудачи использования микробных препаратов предъявляют высокие требования к подбору штаммов-нефтедеструкторов (Ветрова и др., 2013; *Psycrophiles: from Biodiversity...*, 2008).

Таким образом, биостимуляция относительно просто реализуемая технология по сравнению с другими методами биоремедиации. Однако, в настоящем, крайне мало работ, посвященных исследованию биостимуляции

нефтезагрязненных объектов *in situ* (Sorvari et al., 2009; Simpanen et al., 2016). Особенно это касается грунтов, загрязненных углеводородами, где применение ряда биоремедиационных мероприятий, эффективных в поверхностных экосистемах, сильно ограничено. С одной стороны это связано, с недостаточной изученностью процессов трансформации вещества в грунтах, с другой – отсутствием практики проведения восстановительных работ. Подавляющее большинство исследований по биоремедиации подземных экосистем выполнено за рубежом (Williams et al., 1997; Werner et al., 1997; Thurmann et al., 1999; Ivshina et al., 2015). При этом предлагаемые технологии биоремедиации грунтов, такие как *bioventing* и *air-sparging*, весьма трудоемки и затратны (Werner et al., 1997; *In-situ Air Sparging*, 2013).

Для эффективной стимуляции автохтонной микрофлоры в грунтах, нарушенных в результате углеводородного загрязнения, необходимо учитывать и другие факторы, лимитирующие развитие микроорганизмов. В частности, один из важных факторов, ограничивающий биодegradационный потенциал нефтезагрязненных объектов – низкая температура среды (Основы гидрогеологии, 1980; Крайнов и др. 2004; Хижняк, 2009). В связи с чем, наряду с изучением мезофильных автохтонных микроорганизмов, большое значение имеет исследование психрофильных, которые способны деградировать загрязнение в условиях низких температур. Второй фактор – микроаэрофильные и анаэробные условия, поэтому стимуляция должна быть направленной как на аэробные, так и анаэробные процессы микробиологической деградации углеводородов. При этом в анаэробной области, в зависимости от окислительно-восстановительного потенциала среды, формируются зоны разных восстановительных процессов: нитратредукции (и диссимиляционной аммонификации), железоредукции, сульфатредукции, метаногенеза (Franzmann et al., 2002; Водяницкий, 2011; Паничева и др., 2012).

Цель настоящего исследования – оценка эффекта стимуляции автохтонных психрофильных и мезофильных микроорганизмов при

биоремедиации грунтов зоны аэрации и грунтовых вод, загрязненных нефтепродуктами.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие **задачи**.

1. Определить характеристики роста изолятов психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов нефтезагрязненной почвы Средней Сибири, при культивировании на среде с углеводородами.
2. Провести сравнительный анализ численности психрофильных и мезофильных микроорганизмов в верхнем горизонте почвы и грунтах, загрязненных углеводородами.
3. Изучить влияние условий среды на численность автохтонных психрофильных и мезофильных микроорганизмов в нефтезагрязненной почве в лабораторных и натуральных экспериментах.
4. Оценить эффект стимуляции автохтонных психрофильных и мезофильных микроорганизмов при внесении биогенных элементов питания для биоремедиации грунтов, загрязненных нефтепродуктами.

Научная новизна работы. Впервые проведен сравнительный анализ численности психрофильных и мезофильных микроорганизмов, участвующих в биоремедиации верхнего горизонта почвы и грунтов, загрязненных углеводородами в условиях Средней Сибири. Показано, что в поверхностном горизонте почвы численность психрофильных микроорганизмов ниже, чем мезофильных соответствующих эколого-трофических групп. В грунтах на глубинах 1-5 м численность психрофильных микроорганизмов сопоставима с численностью мезофильных, на глубинах 15 м, численность психрофильных на порядок выше. Показано, что внесение карбамидо-формальдегидного полимера, обладающего свойствами структурообразователя почвы и пролонгированного азотного удобрения, увеличивает численность автохтонных микроорганизмов на 2-4 порядка. Апробирован способ стимуляции автохтонных микроорганизмов геологической среды (грунты зон аэрации, насыщения и грунтовые воды), загрязненной нефтепродуктами, посредством

внесения биогенных элементов питания через верхний горизонт грунта и систему наблюдательных скважин. Показано, что биостимуляция микроорганизмов сопровождается увеличением в грунтовых водах содержания аммонийного и нитратного азота, углекислого газа и перманганатной окисляемости, являющихся индикаторами протекающих процессов восстановления.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты работы позволили расширить знания о распространении психрофильных микроорганизмов в почвах и грунтах в условиях Средней Сибири. Механизм стимуляции развития автохтонной микрофлоры посредством внесения карбамидоформальдегидного полимера в качестве удобрения пролонгированного действия и структурообразователя в нефтезагрязненную почву может применяться для биоремедиации углеводородзагрязненных почв.

Разработана схема мероприятий по биостимуляции грунтов и грунтовых вод, загрязненных нефтепродуктами путем внесения минеральных биогенных элементов питания через верхний горизонт грунта и систему наблюдательных скважин. Подбор биогенных элементов проводился с учетом особенностей ключевых групп микроорганизмов, включая анаэробные, а также изменения гидрохимических показателей в грунтовых водах. Схема мероприятий по биостимуляции грунтов прошла апробацию и используется для восстановления геологической среды, загрязненной нефтепродуктами на Абаканской ТЭЦ.

Защищаемые положения:

1. На территории Средней Сибири в грунтах, загрязненных нефтепродуктами, присутствует автохтонное психрофильное сообщество аэробных и анаэробных микроорганизмов, стимуляция которого может играть одну из доминирующих ролей в восстановлении грунтов и грунтовых вод.

2. Стимуляция автохтонного сообщества микроорганизмов минеральными биогенными элементами питания, учитывающая особенности ключевых эколого-трофических групп микроорганизмов и динамику гидрохимических показателей загрязненных нефтепродуктами грунтовых вод,

обеспечивает ускорение их восстановления, которое может сопровождаться временным увеличением концентраций аммония и перманганатной окисляемости.

Личный вклад автора. Лабораторные и натурные эксперименты с нефтезагрязненной почвой, планирование и проведение работ по биостимуляции в грунтах, обработка и интерпретация полученных результатов выполнены автором. Сбор данных по численности микроорганизмов разных эколого-трофических групп в грунтах проводился совместно с к.ф.-м.н В. П. Ладыгиной. Интерпретация гидродинамических показателей пород грунта с нефтехранилища на территории г. Красноярска проведена совместно с к.г.-м.н. А.Ю. Озерским (Геоэкологическая партия ОАО «Красноярскгеология»). Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Апробация работы. Материалы исследований были представлены на конференциях: VI Международной научной школе-конференции студентов и молодых ученых «Экология Южной Сибири и сопредельных территорий» (Абакан, 2002); VII Международной научной школе-конференции студентов и молодых ученых «Экология Южной Сибири и сопредельных территорий» (Абакан, 2003); Научно-практической конференции «Теоретические и практические вопросы мониторинга, предупреждения, ликвидации и рекультивации последствий нефтяного загрязнения» (Тюмень, 2003); Конференции молодых ученых КНЦ СО РАН (Красноярск, 2003); Всероссийской научно-технической конференции «Социальные проблемы инженерной экологии, природопользования и ресурсосбережения» (Красноярск, 2003); X Всероссийской научной конференции студентов-физиков (Екатеринбург – Москва, 2004); IV Съезде Докучаевского общества почвоведов (Новосибирск, 2004); The 2-nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (Shanghai, 2008); Международной научно-практической конференции «Advanced Science» (Пенза, 2017).

Публикации. По материалам диссертации автором опубликовано 13 работ, из них 2 работы отражены в международной базе данных SCOPUS, 4 работы опубликовано в журналах ВАК РФ.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 178 страницах текста, содержит 52 рисунка, 18 таблиц и 7 приложений. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, содержащего ссылки на 189 источника, из которых 60 – на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность д.ф.-м.н. Ю. Л. Гуревичу за методическое руководство, к.ф.-м.н. В. П. Ладыгиной за помощь в получении данных, С. В. Хижняку за помощь в обработке данных, к.г.-м.н. А.Ю. Озерскому, к.т.н. Ю. П. Ланкину за помощь в проведении нейросетевого анализа, д.б.н. Е.Я. Мучкиной, М.И. Теремовой за практическую помощь и ценные советы.

Работа частично выполнена при поддержке: Красноярского краевого фонда науки (грант М0041 от 2000 г.).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Сравнительный анализ технологий, направленных на восстановление объектов, загрязненных углеводородами

Самоочищение экосистем, нарушенных в результате углеводородного загрязнения, достаточно длительный процесс, особенно в условиях холодного климата. Ряд исследователей отмечают, что для восстановления требуется более 10 – 25 лет, в северных широтах этот период достигает 35 – 50 лет (Зубайдулин, 1998; Филонов, 2016). Сокращение этого периода (до 5 – 7 лет) в зоне умеренного климата достигается путем применения технологий биоремедиации, направленных на увеличение активности и численности микроорганизмов-деструкторов (Гриценко и др., 1997).

При загрязнении почвы нефтью происходит изменение водно-воздушных, теплофизических и других свойств почвы, что значительно затрудняет и замедляет естественный процесс восстановления системы. При биологическом разложении нефти и нефтепродуктов в окружающую среду выделяются продукты метаболизма, которые могут быть более токсичными соединениями, чем компоненты нефти (Салангинас, 2003). Также исследователи отмечают загрязнение объектов окружающей среды тяжелыми металлами, содержащимися в нефти (свинец, кобальт, стронций, хром) (Костина, 2010; Adams et al., 2015). Проблема усугубляется тем, что углеводороды нефти мигрируют вглубь, загрязняют грунты и грунтовые воды, образуя линзу на поверхности воды (Гриценко и др., 1997; Репина, 2009; Бракоренко и Емельянова, 2015).

Процесс естественного восстановления нефтезагрязненных объектов происходит в несколько этапов. Для регионов Сибири и Севера выделяют три основных этапа естественного разрушения нефти на почве (рис. 1.1) (Зубайдулин, 1998).



Рисунок 1.1 – Схема динамики естественного разрушения нефти в почве

I этап – длится в среднем 1,5 года. Здесь преобладают физико-химические процессы, включающие проникновение нефти вглубь почвы и грунтов, испарение легких фракций, вымывание, окисление атмосферным кислородом и фотохимическое разложение нефтяных углеводородов. Ультрафиолетовая радиация солнечного света также способна разрушать углеводороды. Концентрация нефти в этот период снижается на 40 – 50%. Ряд авторов указывают, что основная масса нефти, попавшей в почву, теряется в течение первых 3-х месяцев (Гриценко и др. 1997). Физико-химические процессы играют существенную роль в самоочищении среды от нефти и нефтепродуктов, однако полной деструкции не происходит (Квасникова и Ключникова, 1981). В дальнейшем процесс деструкции углеводородов идет медленно и еще более замедляется при достижении концентрации нефти 1 – 1,5% (Гриценко и др., 1997).

II этап – длится 3 – 4 года после окончания первого. Здесь разложение нефти происходит под воздействием почвенных углеводородоокисляющих микроорганизмов. Этот процесс называют *биодеграцией*. Это процесс разрушения углеводородов нефти или нефтепродуктов до соединений, являющихся нетоксичными для данной экосистемы (Филатов, 2014). На этом этапе в основном разрушаются метано-нафтенновые фракции, являющиеся самыми токсичными компонентами нефти для растений и почвенных животных.

III этап – начинается через 4,5 – 5 лет после разлива нефти и длится до ее полного окисления. Этап характеризуется микробиологическим разложением

остальной менее токсичной части углеводородов и смолисто-асфальтовых компонентов. С химической точки зрения, полностью процесс естественного разрушения нефти заканчивается не менее чем через 25 лет. Однако токсические свойства нефти исчезают уже через 10 – 12 лет, продукты ее разложения частично включаются в почвенный гумус, частично растворяются и удаляются из почвенного профиля (Зубайдулин, 1998). В некоторых случаях чистая нефть полностью не деградирует, остается фракция асфальтенов, которые являются инертным контаминантом с нетоксичным эффектом (Atlas, 1995). Заметим, что авторы цитируемых работ характеризовали процесс биоремедиации почвенных систем. В грунтах, очевидно, (микро)биологические процессы идут медленнее.

Таким образом, периоды самовосстановления экосистем, нарушенных в результате загрязнения нефтью, составляют достаточно длинные промежутки времени. В северных регионах этот период может достигать 25-30 лет. В грунтовых экосистемах, где постоянная низкая температуры среды и ограниченная диффузия кислорода, углеводородное загрязнение сохраняется десятки, сотни и даже тысячи лет (Другов и Родин, 2007). С учетом того, что в процессе эксплуатации предприятий утечки нефтепродуктов происходят постоянно, наблюдается накопление нефтепродуктов в геологической среде. Нефтепродукты в некоторых случаях образуют линзу на поверхности грунтовых вод. Площади техногенных линз достигают сотни гектаров, мощность линзы до 12 м (Хаустов и Редина, 2012). В связи с чем, разработка методов восстановления нефтенарушенных экосистем представляется весьма важной.

Выделяют несколько способов очистки окружающей среды от углеводородов нефти: механические, физико-химические, биологические. Весь комплекс работ, проводимый на нарушенной территории и включающий в себя: сбор и нейтрализацию нефтяных углеводородов, восстановление экосистемы называется *рекультивацией* (Гриценко и др.,1997; Adams et al. 2015).

Рассмотрим основные технологии рекультивации нефтенарушенных почвенных экосистем и их недостатки.

Удаление нефти с поверхности почвы осуществляется с помощью специальной техники: бульдозеров, экскаваторов, самосвалов, автомашин или тракторов, оборудованных танками для сбора нефти, насосами. Часто используются такие разрушительные для почвенного комплекса приемы как сжигание, однако, в последнее время такие мероприятия стараются не проводить (Зубайдулин, 2003; Климентова и др., 2007), поскольку почва становится непригодна для жизни растений и остается такой еще в течение многих лет.

В качестве вспомогательных средств, которые могут задержать распространение нефти, используются природные и искусственные сорбенты: торф, полимерные материалы, песок (Баронин и др., 2002; Пикунов и др., 2003; Алексеева и др., 2000). Сорбенты, изготовлены на основе различных материалов (карбамидо-формальдегидных смол, торфа и др.), обладают высокой сорбционной способностью по отношению к углеводородам нефти и используются, как правило, для механического сбора нефти. Однако у обычных сорбентов существует несколько недостатков: во-первых, они образуют многокиллограмовые конгломераты нефть-сорбент, которые очень трудно собрать как с воды, так и с почвы. В случае если они не собираются на 100%, имеют еще два негативных эффекта – консервация нефтепродуктов в сорбенте и негативный эффект самих сорбентов, полимерная основа которых обычно вносит в природу дополнительный загрязнитель (целлюлоза, полиуретан и пр.). Консервация углеводородов в сорбентах в дальнейшем осложняет применение микробиологических методов рекультивации.

Необходимым компонентом для относительно быстрого окисления нефти является кислород, поэтому технические приемы рекультивации, такие как механическая обработка почв, глубокая вспашка, рыхление – направлены на усиление аэрации загрязненных почв и стимуляцию биохимических процессов окисления компонентов нефти. Во влажной почве нефть более устойчива к

разложению, так как преобладают анаэробные процессы, поэтому в луговых, пойменных и заболоченных почвах проводят дренаж и осушение, что в свою очередь также может нарушить функционирование экосистемы. Именно поэтому в последнее время все больше внимания уделяется биологическим методам очистки.

Биологические методы разрушения углеводов применяют в тех случаях, когда их количество слишком мало, чтобы применять механические средства сбора, но, с другой стороны, слишком велико, чтобы использовать загрязненные земли и воду в хозяйственных целях. В целом, как отмечают исследователи, при сравнении с химическими и физическими технологиями методы биотехнологии менее затратные (таблица 1.1) (Fjordbøge, 2011). В таблице приведены данные по полномасштабным испытаниям и реализациям трех основных типов технологий – химических, физических и биотехнологических. Восстановительные работы проводились на месте, т.е. без экскавации загрязнений и обработки на специальных площадках. Как видно из таблицы 1.1 методы биостимулирования роста микроорганизмов-деструкторов загрязняющих соединений выигрывают по показателю затрат.

Таблица 1.1

Оценка стоимости основных технологий восстановления загрязненных грунтов *in situ* по данным полномасштабных испытаний (по Fjordbøge, 2011)

Тип технологии	Средняя стоимость	Стоимость
	\$/м ³	\$/м ³
Химические технологии – окисление химическими реагентами	150	26 – 283
Физические технологии		
• термическая обработка	168	42 – 392
• обработка растворителями и поверхностно активными веществами	224	нет данных
Биотехнологии (биостимулирование и внесение микробных препаратов)	90	3 – 294

По мнению ряда авторов, методы биоремедиации загрязненных объектов имеют огромный потенциал и конкурентные преимущества перед физическими и химическими методами (Wang et al., 2011). Прежде всего, это связано с их низкой стоимостью и экологической безопасностью.

1.1.1 Технологии биостимуляции и биоаугментации

Процесс восстановления загрязненных систем с помощью биологических агентов называют *биоремедиацией* или биорекультивацией. По большей части биологическими агентами выступают микроорганизмы, которые способны напрямую осуществлять биodeградацию загрязнителя. В мировой практике существуют три основных подхода в использовании микробиологических процессов очистки от углеводородных загрязнений (Гриценко и др., 1997).

Первый заключается в интенсификации природного микробного сообщества путем добавки в загрязненную среду биогенов, как правило, минеральных солей азота и фосфора – *биостимуляция*. В ходе реализации второго из загрязненной среды выделяются автохтонные микроорганизмы-деструкторы компонента-загрязнителя, изучаются особенности его метаболизма, на основе полученных данных в специальных ферментерах наращивается значительная масса бактерий-аборигенов и интродуцируется вместе с биогенами в загрязненную среду. Третий подход заключается, в обработке загрязненного участка биопрепаратом, содержащим высокоактивные по отношению к компоненту-загрязнителю микроорганизмы – *биоаугментация* (Margesin et al., 2000; Xu and Obbard 2003; Zhang et al., 2009).

Биостимуляция. Основополагающий принцип биостимуляции – создание оптимальных условий для развития автохтонной углеводородокисляющей микрофлоры. В большинстве случаев, биостимуляция, осуществляется путем коррекции таких показателей, как аэрируемость, содержание биогенных элементов, рН и температура (Margesin et al., 2000; Шамаева, 2007; Бочкарева, 2014). Эффективность биостимуляции во многом зависит от возможности воздействовать на названные параметры.

Один из часто используемых приемов при биоремедиации нефтезагрязненных почв – внесение NPK-элементов, в виде удобрений. При этом иногда наблюдается нежелательный эффект – закисление почвы, что так же ингибирует развитие нефтеокисляющих микроорганизмов. Во избежание закисления почвы, на рекультивируемую поверхность вносят раскислители, которые поддерживает оптимальную pH, например, мел (Зубайдулин, 1998).

Основная роль в биодegradации углеводов принадлежит аэробным микроорганизмам, потому важное условие эффективной биодegradации – аэрируемость очищаемых почв. Для чего на практике используют вспашку, или вносят разнообразные наполнители, способствующие интенсификации аэрации, такие как древесная кора, опилки, солома (Пономарева и др., 1998). Еще один предлагаемый прием для улучшения аэрации нефтезагрязненных почв – применение химических окислителей, в частности пероксида кальция. В экспериментальных исследованиях внесение в очищаемую почву пероксида кальция повышало степень очистки почвы на 10 – 15%. При этом очистке подвергались не только верхний горизонт (0 – 10 см), но и более глубокие почвенные слои (10 – 45 см) (Пономарева и др., 1998).

В агрохимической практике для улучшения агрофизических свойств почв применяют структурообразователи (Кульман, 1982). В первую очередь они меняют структуру почвы – оструктурируют, в результате, повышается водопроницаемость почв, воздухопроницаемость, противозэрозийная устойчивость и др. Это создает оптимальные условия для развития автохтонной микрофлоры. Структурообразователи, в силу определенных физических и/или химических свойств, придают системе структурообразователь – почва новое качество, которое данная почва без этой добавки приобрести не может. Эти продукты образуют с почвой гетерогенную смесь, которую можно снова разделить на отдельные компоненты физико-химическими способами. Они сохраняют характерные свойства даже в смеси, благодаря чему и проявляется их почвоулучшающее действие. В агрохимической практике используют структурообразователи разных типов, которые благоприятно воздействуют на

микрофлору почвы, изменяя ее различные свойства (Кульман, 1982; Агрохимия, 1989). В качестве структурообразователей используют мел, пенопласты, торф и др.

Искусственные пенистые вещества (пенопласты) представляют собой стабильные дисперсии газов в твердом веществе, отличающиеся ячеистой структурой и низкой плотностью (Кульман, 1982). К этому классу структурообразователей относят карбамидоформальдегидные пенопласты, которые представляют собой продукты конденсации мочевины и формальдегида. Пенопласты влияют на разные свойства почвы. Пенопласты могут придавать почве любую степень разрыхления, и действуют как теплоизоляционный материал. С одной стороны это обуславливает более медленное прогревание, с другой замедленное остывание почвы. Теплоизолирующая способность пенопласта влияет не только на капиллярную конденсацию влаги в почве, но и на другие ее свойства. Более сильное отражение света белым слоем полимера по сравнению с немულчированной поверхностью почвы обуславливает 60 – 80%-ное повышение температуры воздуха на высоте 8 – 10 см над пенопластом. Окрашивание мульчи в черный цвет сопровождается усиленным поглощением тепла и повышением температуры почвы. Современные пенопласты также улучшают водопоглощающую способность обработанного слоя почвы, однако не создают существенного запаса влаги. Улучшаются аэрация, инфильтрация и водопроницаемость почвы.

Также карбамидо-формальдегидные полимеры могут выступать в качестве азотного удобрения пролонгированного действия (Агрохимия, 1989). Продолжительность действия полимера – 5-10 лет (максимально – до 20). Интенсивность его разложения в почве зависит от свойств пены и почвенно-климатических условий (Кульман, 1982). В настоящем карбамидоформальдегидные полимеры используются для механического сбора нефти и нефтепродуктов (Баронин и др., 2002). Внесение карбамидоформальдегидных полимеров почву, загрязненную углеводородами

нефти, в качестве структурообразователя и удобрения является перспективным малоисследованным направлением.

Также для интенсификации биодegradации углеводородов применяют методы, основанные на явлении кометаболизма. Некоторые соединения расщепляются микроорганизмами только совместно с хорошо утилизируемыми субстратами. Такое превращение какого-либо вещества в присутствии так называемого косубстрата, т. е. вещества, используемого клетками для роста, получило название кометаболизма или соокисления (Шлегель, 1987). Явление кометаболизма может быть полезно, например, при очистке промышленных сточных вод, содержащих плохо поддающиеся разложению синтетические продукты, в том числе это явление применяется при очистке от нефтяных загрязнений. Например, добавление белкового гидролизата в почвы загрязненные дизельным топливом увеличило скорость разрушения углеводородов нефти на 21% (Harrison, 2000). Напротив, некоторые авторы отмечают, что добавление альтернативных легкоокисляемых источников углерода (глюкозы, аминокислот) ингибирует деградацию загрязнителя (Swindoll et al., 1988; Adams et al., 2015).

Таким образом, метод биостимуляции, в основе которого лежит активизация автохтонных углеводородоокисляющих микроорганизмов, достаточно просто реализуем на практике и выгоден с экономической точки зрения. Основным преимуществом биостимуляции является то, что биоремедиация осуществляется автохтонными микроорганизмами, которые адаптированы к условиям среды и заполняют все пространство загрязненной зоны. Однако на практике, при разливах и утечках углеводородов, проведению биостимуляции на нефтезагрязненных объектах, уделяется меньше внимания, и предпочтение отдается методам биоаугментации – внесению микробных препаратов. Несмотря на то, что с экономической точки зрения эти методы менее выгодные.

Биоаугментация. Существуют ситуации, когда введение бактериальных нефтеокисляющих препаратов не только оправданно, но и совершенно

необходимо. Например, в северных районах, где теплый период года непродолжителен, процессы биодegradации не успевают развернуться в полной мере. Повышение численности углеводородокисляющих микроорганизмов в этом случае путем интродукции активных форм, безусловно, полезно. Это особенно актуально для нашей страны, расположенной в основном в зоне холодного и умеренного климата. Другая ситуация – внезапный разлив нефти в открытом море, где нефтеокисляющие бактерии практически отсутствуют. Ряд сообщений свидетельствует, что в открытом море даже при высокой температуре процессы биодegradации нефти идут крайне медленно (Коронелли, 1996).

Микроорганизмы вносят в виде биопрепаратов (Коронелли и др., 1997; Капотина и Морщакова, 1998; Пономарева и др., 1998; Чугунов и др., 2000; Фахрутдинов и др., 2003). Современные нефтеокисляющие препараты представляют собой лиофильно-высушенную биомассу активных штаммов, главным образом бактерий в смеси с азотно-фосфорными минеральными солями; иногда в препарат включают нейтральный сорбент. Если речь идет об очистке акватории, то в качестве сорбента используют вещества, обладающие положительной плавучестью. Роль их заключается в удерживании бактерий на поверхности пленки. Одним из первых препаратов такого рода является NOSCUM, состоящий из инертного носителя, смешанного с углеводородокисляющими бактериями и питательными веществами. Через несколько часов после распространения этого препарата по поверхности нефтяного пятна пленка толщиной от 50 до 100 мк разрушается бактериями (Коронелли, 1996). Используются жидкие биопрепараты, которые также показывают положительный эффект (Чугунов и др., 2000).

Часто в биопрепараты добавляют различные адсорбенты и ПАВы, которые повышают выживаемость интродуцируемых микроорганизмов и увеличивают биодоступность поллютанта. (Капотина и Морщакова, 1998; Сидоров и др., 1998). Кроме адсорбции, ряд исследователей предлагают другой способ закрепления клеток микроорганизмов в загрязненном слое почвы –

использование веществ, в присутствии которых клетки способны образовывать флокулы. В частности – гуминовые кислоты, являющиеся важнейшим элементом почвенного органического вещества (Сидоров и др., 1998).

Наиболее распространенными в экосистемах, содержащих углеводороды, являются бактерии родов *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter* и *Acinetobacter* (Коронелли, 1996; Плешакова и др., 2001; Хабибуллина и др., 2002). Поэтому данные роды бактерий и их ассоциации используются для приготовления биопрепаратов. В хронически загрязненных объектах (почва, вода) безусловным доминантом являются родококки. Углеводородокисляющие дрожжи и мицелиальные грибы в водных экосистемах занимают второстепенное место (Коронелли, 1996).

Стоит отметить, что внесение коммерческих препаратов не отменяет мероприятия по поддержанию и стимулированию их роста на участках их внесения. С одной стороны затраты на биоремедиацию с коммерческими препаратами выше, с другой это выгодно для определенных сфер бизнеса. Коммерческие микробные препараты широко рекламируются. В то же время в обзорных и оригинальных статьях сообщается, что внесение в зоны загрязнения микробных препаратов дает недостаточно значимый эффект (Margesin and Schinner, 1999; Чугунов и др., 2000; Mohammed et al., 2007). В обзорной работе Margesin отмечается, что интродукция приводит к незначительному уменьшению углеводородного загрязнения (5 – 7%) в бедных азотом и фосфором почвах, а в богатых – положительный эффект вовсе не наблюдается (Margesin and Schinner, 1999).

Для получения регулярного и большего положительного эффекта, необходим детальный анализ условий развития микрофлоры в почве, на которой планируется проведение биоремедиационных работ, и соответствующий подбор интродуцируемых микроорганизмов. В связи с этим требования к используемым биопрепаратам в настоящем повышаются. Например, отмечают, что в окружающей среде преобладают низкие температуры, поэтому интродуцируемые микроорганизмы должны обладать

психрофильностью (Коронелли и др., 1997; Чугунов и др., 2000; Margesin, 2000; Margesin and Schinner F., 2001; Грищенко и др., 2003; Белоусова и др., 2002; Ветрова и др., 2013). Далее, интродукция микроорганизмов в почву должна происходить с учетом стадии сукцессии в естественной среде, т.е. нужно вносить такие микроорганизмы, которые максимально активны на этой стадии. В случае нефтяного загрязнения, речь идет о двух этапах. На первом этапе загрязнения участок заселяется r-стратегами (например, псевдомонадами). R-стратеги являются пионерами и будучи слабыми конкурентами в дальнейшем вытесняются k-стратегами. K-стратеги обнаруживаются на поздних стадиях сукцессии и приурочены к более или менее стабильным условиям среды. Известным k-стратегом является, например, *Arthrobacter globiformis* (Паников, 1987). Более того, далеко не все виды микроорганизмов, участвующие в биодеградации углеводородного загрязнения, культивируются в лабораторных условиях (Evans et al., 2004). Соответственно этот фактор исключает возможности применять некультивируемые видов микроорганизмов для биоаугментации.

1.1.2 Условия среды, лимитирующие процессы биоремедиации in situ

Биологические процессы окисления нефти в природной среде, как правило, ограничены внешними факторами. Факторов, лимитирующих биодеградацию углеводородов нефти in situ, довольно много: низкая температура, анаэробные условия, недостаток биогенных элементов, вязкость и низкая биодоступность субстрата, избыточная или недостаточная влажность, кислая pH и т.д. (Коронелли, 1996; Romantschuk et al., 2000; Чижов, 2000; Зубайдулин, 2003). Авторы также изучают такие факторы как – отсутствие деградационного потенциала, в частности отсутствие генов и метаболических путей (Romantschuk et al., 2000), а также способность бактерий вырабатывать поверхностно-активные вещества – биосурфактанты (Rosenberg and Ron, 1999; Margesin and Schinner, 1999; Chun, 2002).

Учесть все факторы при планировании биоремедиационных работ практически невозможно, поэтому выделяют основные, характерные для всех экосистем. Ключевыми факторами в нефтенарушенных экосистемах, влияющими на развитие углеводородокисляющих микроорганизмов, являются: наличие биогенных элементов питания, аэрируемость, влажность и низкая температура среды.

Наличие биогенных элементов питания. В результате аварий при транспортировке нефти и нефтепродуктов в окружающую среду попадает одновременно большое количество органических соединений, которые представляют собой источник питания для микроорганизмов. Биодegradация этих соединений приводит к истощению пула биогенных элементов в системе – особенно это касается азота и фосфора, являющихся ключевыми биогенными элементами. Низкие концентрации фосфатов и нитратов являются основными факторами, лимитирующими биодegradацию нефтепродуктов при условии, если температура и аэрация благоприятны для жизнедеятельности микроорганизмов. При достаточной концентрации азота и фосфора в системе, происходит значительное увеличение скорости биодegradации углеводов нефти. По подсчетам на окисление 1 г нефти требуется 40 – 80 мг азота, фосфора примерно на порядок меньше – 4 – 8 мг (Фахрутдинов и др., 2003, Перетрухина и др., 2006). В связи с этим, сбалансированность питания посредством внесения азотных и фосфорных удобрений до сих пор остается основным методом рекультивации нефтезагрязненных почвы и воды (Swindoll et al., 1988; Johnson and Scow, 1999; Климентова и др., 2007).

Как правило, при проведении биоремедиационных работ вносят легко растворимые удобрения, которые очень быстро вымываются из системы. Поэтому их использование, с одной стороны, связано со значительными затратами, с другой с загрязнением подземных вод. Как уже отмечалось, процесс биодеструкции углеводов длительный, и быстрый вынос биогенных элементов ограничивает восстановление систем. Помимо этого, внесение удобрений в больших количествах создает избыточную концентрацию

и высокое осмотическое давление почвенного раствора, что резко ослабляет развитие некоторых растений и микроорганизмов. В районах повышенной влажности, особенно в легких почвах, возможно вымывание внесенного азота в виде нитратов и загрязнение ими водных источников, которые служат источниками питьевой воды (Агрохимия, 1989).

Один из путей решения этой проблемы состоит в применении NPK-удобрений пролонгированного действия. На практике используют удобрения, покрытые парафиновой оболочкой, которая растворяется в нефти, но не воде. Однако вместе с удобрениями вносится некоторое количество углеводов, что дает дополнительное загрязнение углеводородами (Коронелли, 1995).

В агрохимической практике используют карбамидоформальдегидные удобрения пролонгированного действия, которые получают конденсацией мочевины с альдегидами (Глунцов и др., 1985; Кривоносова и др., 1985; Меньшикова, 2017). Труднорастворимые формы удобрений перспективны для биоремедиации нефтезагрязненных почв, особенно в районах с избыточным увлажнением. В процентном соотношении карбамидо-формальдегидные удобрения содержат до 32% азота (общий), 0,4% фосфора (P_2O_5), калия (K_2O), и другие микроэлементы (2,6%), необходимые для размножения микроорганизмов (Меньшикова, 2017). Помимо того, что карбамидоформальдегидные удобрения содержат весь комплекс биогенных элементов, их высвобождение в окружающую среду происходит медленно, полное разрушение полимера происходит за 5-20 лет. В результате потери азота и фосфора минимизированы, он практически полностью усваивается растениями и микроорганизмами. Вторым положительным моментом, на который хочется обратить, это то, что карбамидоформальдегидные полимеры также являются структурообразователями (мелиорантами), влияющими на водно-физические, воздушные, тепло-физические свойства почвы. В результате улучшается аэрируемость почвы, что крайне важно для нефтезагрязненных почв.

Для увеличения скорости биodeградации можно использовать и собственный потенциал почвенной системы. Микробное сообщество экосистемы включает различные микроорганизмы, деградирующие углеводороды нефти, в том числе азотфиксирующие и фосфатмобилизующие микроорганизмы, которые обогащают экосистему азотом и фосфором. Отмечено, что в нефтезагрязненных системах происходит увеличение процесса азотфиксации (Терещенко, Лушников, Пышьева, 2004). Увеличение интенсивности азотфиксации в загрязненной почве может быть обусловлено увеличением в почве содержания легкодоступного органического вещества. Возможно, что азотфиксирующие микроорганизмы могут использовать продукты метаболизма углеводородокисляющих микроорганизмов. Показано, что с увеличением интенсивности нефтяного загрязнения содержание азота в почве увеличивается от 9 – 37 до 200 – 559% и коррелирует с ростом численности свободноживущих азотфиксаторов (Исмаилов, 1983). Также были выделены азотфиксирующие микроорганизмы, которые способны деградировать углеводороды нефти (Piehler et al., 1999). Фосфатмобилизующие микроорганизмы также способны окислять углеводороды нефти без дополнительных источников фосфора, т.к. используют фосфор неорганических соединений, которые в изобилии находятся в почве (Illmer and Schinner, 1995). Изучение фосфатмобилизующих и азотфиксирующих углеводородокисляющих микроорганизмов представляет большой интерес, и в перспективе возможна интродукция данных микроорганизмов в нефтезагрязненные системы.

Аэрируемость почвы. Углеводороды нефти – восстановленные соединения, поэтому для их окисления требуется больше кислорода, чем для окисления легких органических соединений. В связи с чем, проблема аэрации является одной из ключевых проблем в биоремедиации нефтезагрязненных территорий. Недостаток кислорода в системе лимитирует развитие аэробных углеводородокисляющих микроорганизмов, как следствие скорости биodeградации углеводов становятся низкими.

На практике для улучшения аэрации почв предлагают простой подход - вспашка, рыхление, фрезерование и т.д. (Чижов, 2000; Зубайдулин, 2003; Салангинас, 2003). Однако большинство исследователей говорят о негативных последствиях такого вмешательства (Чижов, 2000; Зубайдулин, 2003; Салангинас, 2003). Как альтернативный вариант интенсивной механической обработки было предложено орошение аэрированной водой (Чижов, 2000).

Второй путь, позволяющий деградировать углеводороды в условиях недостаточной обеспеченности микроорганизмов кислородом в анаэробных условиях – это использование альтернативных кислороду акцепторов электрона – нитрат, сульфат, железо (II) и т.д. (Lovley et al., 1989; Edwards et al., 1992; Coates and Anderson, 2000; Коронелли и др., 2001). Это направление особенно эффективно в отношении грунтов и грунтовых вод, нарушенных в результате углеводородного загрязнения. Внесение акцепторов электронов позволяет активизировать развитие анаэробных микроорганизмов деградирующих загрязнение.

Влажность почвы. При попадании нефти в почвы, которые находятся на далеком расстоянии от грунтовых вод, нефть обволакивает почвенные комочки, делая их гидрофобными. В результате чего вода не задерживается в почвенных порах и проваливается вниз (Салангинас, 2003). Влажность почвы уменьшается. Как известно, основным местом обитания почвенных животных и микроорганизмов являются поры, заполненные водой (Красильников, 1958; Звягинцев, 1987), поскольку эта ниша отсутствует – «консервируют» вязкие и малорастворимые углеводороды, почвенные организмы, находятся в неактивном состоянии.

Влажность является одним из основных факторов, влияющих на динамику численности микроорганизмов в почве. В своей работе Аристовская (1957) анализировала вспышки размножения микроорганизмов северных почв под влиянием кратковременных благоприятных условий развития (Барановская, 1969; Аристовская, 1980). Анализ показал, что численность

микроорганизмов коррелирует с влажностью, но не температурой. То же отмечается в работе Красильникова (Красильников, 1958).

Кроме того, бактерии выделенные из воздушно-сухой почвы имеют низкую вероятность размножения ($\lambda=0,024 \text{ ч}^{-1}$), ситуация меняется уже через 9 ч после увлажнения ($\lambda=0,036 \text{ ч}^{-1}$), причем изменения прослеживаются и тогда, когда показатель общей численности бактерий остается на прежнем уровне (Кожевин, 1989).

Низкая температура среды. Как отмечают Margesin и Schinner 80% мест в биосфере имеют температуру окружающей среды ниже 5°C (Margesin and Schinner, 1999). Почвы в зонах с холодным и умеренным климатом практически на протяжении всего года, находятся при очень низких температурах, во многих почвенных экосистемах температура вообще не поднимается выше $5 - 10^{\circ}\text{C}$, т.е. все микробиологические процессы протекают при температурах гораздо ниже тех, которые обычно используются при выращивании почвенных микроорганизмов в лабораторных условиях ($20 - 28^{\circ}\text{C}$) (Звягинцев и др., 2005). Более того большая часть территорий загрязненных нефтью располагается в северных широтах, где средняя температура среды низкая. Как следствие в таких местах, биодegradация происходит только в весенне-осенний период, т.е. большую часть года почвенный комплекс микроорганизмов загрязнение не окисляет. По крайней мере, работ указывающих на наличие активного биологического окислительного процесса зимой к настоящему моменту не встречено.

Изменение температуры среды даже на один градус приводит к существенным изменениям, как в скорости отдельных биохимических процессов, так и метаболизма в целом. Важным условием нормального метаболизма является сохранение определенной степени вязкости цитоплазматической мембраны, через которую идет транспорт веществ в клетку. Чтобы при изменении температуры вязкость цитоплазмы не менялась, клетка изменяет состав жирных кислот в фосфолипидах цитоплазматической мембраны (Звягинцев и др., 2005). Ответная реакция на первичное воздействие

включает, вероятно, много вторичных эффектов, связанных с механизмами регуляции метаболизма, специфичностью ферментативных реакций, клеточной проницаемостью и составом клетки (Перт, 1978).

Помимо непосредственного влияния на клетку, низкая температура модифицирует среду обитания, а также может изменять свойства питательного субстрата, делая его менее или более доступным для клетки (Margesin et al., 2000; Margesin et al. 2008). Например, углеводороды при низкой температуре становятся более вязкими и менее подвижными. При температуре 25°C популяция нефтеокисляющих бактерий может окислить 1 мг нефти в сутки, а при температуре 5°C – 0,1 мг (Досбергенов, 2014).

В то же время зимний период играет особую роль в жизни почвенных микроорганизмов. Так, еще Красильников проводил эксперименты с азотобактериями и показал, что после 3-недельного пребывания в замороженном состоянии бактерии размножались более интенсивно (Красильников, 1958). Возможно, этим объясняется бурный подъем биологических процессов в почве в весенний период. Под влиянием зимних морозов изменяются химические и физико-химические свойства почвы. Меняется концентрация почвенного раствора, ряд соединений выпадает в осадок, при этом появляются легкодоступные органические вещества, которые стимулируют развитие микроорганизмов. Некоторые токсические вещества почвы разрушаются, в частности инактивируются некоторые, вырабатываемые микроорганизмами антибиотики. Более того весенние подъемы активности наблюдали и в лабораторных условиях, вероятно, они каким-то образом закрепляются в наследственных свойствах микроорганизмов (Красильников, 1958).

В целом почва после замораживания почва становится более плодородной, т.е. зимне-весеннее замораживание-оттаивание почвы является своего рода «перезагрузкой» для системы (Красильников, 1958). Циклы размораживания и замораживания в нефтезагрязненной почве увеличивают

биодоступность соединений из-за изменений структуры почвы (Aislabie et al., 2006 Wolicka and Borkowski, 2012).

Естественно, что для каждой экосистемы набор ограничивающих факторов будет отличаться. В целом, оптимальными параметрами для биоремедиации почвы, загрязненной нефтяными углеводородами считают: численность микроорганизмов более 10^5 кл/г сухой почвы, влажность 20–30 %, температура 20–30°C, pH 6.5–7.5, содержание кислорода не менее 0.2 мг/дм³ углеводородов, соотношение углерод: азот: фосфор (C:N:P) = 100:10:1 or 70:7:1 (Wolicka and Borkowski, 2012).

1.1.3 Биоремедиация грунтов, загрязненных углеводородами

Углеводороды проникают в грунты и грунтовые воды из подземных и наземных хранилищ нефти и нефтепродуктов, а также в результате аварийных разливов на поверхности земли. При внедрении нефтепродуктов в зону аэрации происходит их сорбция на стенках пор грунта. Способность к сорбции зависит от химической природы загрязняющего соединения и понижается в ряду «олефины – ароматические углеводороды – циклопарафины – парафины» (Гриценко и др., 1997). При сезонных колебаниях уровня грунтовых вод поглощенные грунтами нефтепродукты подвергаются неоднократным десорбциям в воду и последующим сорбциям при понижении уровня воды (Гольдберг и др., 2001). Происходит аккумуляция нефтепродуктов в нижних горизонтах грунта, в результате чего они становятся источником долговременного загрязнения подземных вод и водоемов.

В настоящее время существует ряд подходов по очистке грунтов и подземных вод от углеводородов путем откачек и промывок (Бабушкин и др., 2003). Однако, в большинстве своем, данные подходы представляют сложный технологический процесс, который требует больших материальных затрат и далеко не всегда приводит к положительному результату. В связи с опасностью, которую представляют растворенные в подземной воде

углеводороды и их производные, в настоящем, активно исследуются пути биоремедиации грунтовых вод и водоемов (Schmidt et al., 1999; Al-Awadi et al., 2001; Männistö et al., 2001). Биоремедиация нарушенных наземных экосистем считается единственным подходом, обеспечивающим необходимую глубокую очистку (Atlas, 1995; Коронелли, 1996; Margerin and Schinner, 2001).

Подземные системы отличаются особыми микроклиматическими условиями: низкое содержание кислорода и биогенных элементов. Для грунтов характерна постоянная низкая температура, что значительно замедляет биodeградацию загрязнения. С увеличением глубины происходит ряд изменений, которые также влияют на активность аборигенной микрофлоры, в частности уменьшение содержания органического вещества, высокая концентрация различных почвенных минералов. Соотношение этих соединений в свою очередь влияет на аэрацию, влажность, адсорбцию органических и неорганических веществ в грунтах (Thurmann et al., 1999).

Поскольку углеводороды нефти являются сильно восстановленными соединениями, большое внимание уделяют аэрации грунтов. Инфильтрационный привнос атмосферного кислорода в грунты сравнительно невелик по отношению к техногенному загрязнению, при этом по мере проникновения растворенного кислорода вглубь происходит его потребление местной микрофлорой. Поэтому одним из способов интенсификации биологических процессов здесь является искусственная вентиляция нижних слоев грунта зоны аэрации с помощью системы скважин, для поддержания роста аэробных микроорганизмов – bioventing (биовентиляция) (Werner et al., 1997). Технология Air-sparging предполагает бурение скважин через каждые 5 м до области ниже пятна загрязнения в зоне насыщения и нагнетание воздуха под давлением в эту область (In-situ Air Sparging, 2013). Данные подходы сложны технологически и при этом, для их реализации требуются значительные материальные затраты, поэтому поиск альтернативных способов остается актуальным.

Ряд исследователей изучают разложение загрязнения в анаэробных условиях с помощью железовосстанавливающих, сульфатредуцирующих и денитрифицирующих микроорганизмов, которые используют углеводороды нефти в качестве единственного источника углерода и энергии. Акцепторами электронов при деструкции углеводородов нефти в условиях дефицита кислорода для данных микроорганизмов служат железо(III), сульфаты и нитраты (Williams et al., 1997; Wilson and Bouwer, 1997; Franzmann et al., 2002). Вероятно, при биоремедиации грунтов и грунтовых вод целесообразно использовать потенциал всего комплекса микроорганизмов, осуществляющих биodeградацию в аэробных и анаэробных условиях.

Как уже отмечалось выше для грунтов зоны резко континентального, субарктического и арктического климата характерна низкая температура. В связи с этим, при изучении микробного сообщества подземных систем рассматривают активность двух температурных групп микроорганизмов: психрофильных и мезофильных (Moran and Hickey, 1997). Очевидно, что в грунтах биологические процессы трансформации органического вещества осуществляют, главным образом, психрофильные микроорганизмы, температурные диапазоны активности которых занимают от 0 – 25°C и 0 – 35°C, соответственно (Whyte et al., 1998).

Восстановление почв и грунтов отслеживают с помощью ряда показателей: содержание углеводов, численность микроорганизмов, активность ферментов (дегидрогеназа, уреазы, каталаза, липаза) (Thurmann et al., 1999; Margesin et al., 2000). Активность микробного ценоза (сообщества) указывает на интенсивность разложения загрязняющего соединения (Mandelbaum et al., 1997). Активность и численность углеводорододеградирующих бактерий зависит от окружающей среды, в которой находится клетка, в том числе и от геологических характеристик грунта. Как следствие процессов деструкции углеводов, в загрязненных подземных водах отмечается повышенное содержание марганца, нитратов, железа, повышение жесткости воды и минерализации (Методические рекомендации по

..., 2002). Однако поиск адекватного метода контроля остается актуальным. Измерения дыхания и ферментативной активности загрязненных почв (и тем более грунтов) используются нечасто и освоены недостаточно.

1.2 Потенциал психрофильных микроорганизмов в процессах биоремедиации

Большая часть нефтезагрязненных территорий, на которых необходимо проведение биоремедиационных работ, подвержена действию низких температур. К таким местам можно отнести почвы зоны умеренного и холодного климата, океан, грунты зоны аэрации и насыщения (Inoue, 1976; Moyer and Morita, 1989; Звягинцев, 1992; Хижняк и др., 2003; Звягинцев и др., 2005; Нечаева, 2009, Хижняк и др., 2009). Микроорганизмы не обладают способностью к терморегуляции, соответственно температура клеток определяется температурой окружающей среды. Традиционно мезофильные микроорганизмы используются для приготовления биопрепаратов, однако при низкой температуре они теряют свою активность.

В связи с этим, все больше исследователей обращают внимание на психрофильные формы микроорганизмы, которые способны окислять поллютанты в условиях низких температур (Коронелли, 1997; Margesin, 2000; Грищенко и др., 2003; Kato at al., 2001; Белоусова и др., 2002; Ветрова и др. 2013). Психрофильные микроорганизмы вводят в состав современных микробных препаратов, предназначенных для рекультивации нефтезагрязненных территорий. В настоящем, способность микроорганизма деградировать углеводородное загрязнение в широком диапазоне температур – одно из основных требований к штамму, на основе которого создается биопрепарат (Ветрова, 2010).

По отношению к температуре все микроорганизмы делят на три *температурные группы* (Жизнь растений Т. 1, 1974):

- Термофилы – микроорганизмы, предпочитающие высокие температуры, максимальная температура роста обычно выше 50°C.
- Мезофилы – микроорганизмы, предпочитающие средние температуры, обычно растут при температурах от 0–10 °С до 40–45 °С. К этой группе относят большинство микроорганизмов.
- Психрофилы – микроорганизмы, предпочитающие низкие температуры, имеющие минимальную температуру роста ниже 0 °С.

В 1975 году Morita указал температурные границы для психрофильной группы. К психрофилам он отнес микроорганизмы растущие при температуре ниже 20°C, с температурным оптимумом около 15°C (Жизнь микробов в ..., 1981). Главная специфическая особенность психрофильных микроорганизмов – способность расти с большими скоростями, чем мезофилы, при температурах ниже +10°C.

Однако, в определении психрофильных микроорганизмов не все так просто, поскольку существует большое разнообразие микроорганизмов с разными температурными характеристиками. В связи с чем, психрофилы, подобно другим температурным группам, имеют деление внутри группы на *облигатных* и *факультативных*, которые различаются экологическими нишами и механизмами адаптации к холоду (Morita, 1975; Лях, 1976; Заварзин и Колотилова, 2001; Ленгелер и др., 2005; Намсараев и др., 2008).

Облигатные психрофилы, которые растут при температурах близких к +20°C, как правило имеют оптимум ниже +15°C. При этом ряд облигатных психрофилов способны сохранять свою активность вплоть до отрицательных значений температур (Заварзин и Колотилова, 2001; Margesin et al., 2007; Ермилова, 2007; Намсараев и др., 2008). Психрофильные микроорганизмы способны деградировать углеводородное загрязнение при температурах близких к 0°C. Так, было показано, что углеводородокисляющая активность в загрязненной воде наблюдалась при температуре воды +0,8°C (Перетрухин и др., 2006). Также наблюдали способность углеводородокисляющих

микроорганизмов окислять алканы, ароматические углеводороды, смолы и асфальтены при температурах -5°C (Гэрэлмаа, 2010).

Факультативные психрофилы растут в более широком диапазоне температур, их называют *психротрофными* или *психротолерантными* (Лях, 1976; Жизнь микробов в ..., 1981; Гусев и Минеева, 2003; Хижняк, 2009; Овсянкина, 2013). Психротрофные микроорганизмы, также растут при 0°C , но в отличие от облигатных психрофилов имеют более высокие оптимальную ($25 - 30^{\circ}\text{C}$) и максимальную (примерно 35°C) температуры роста. Они широко распространены в местообитаниях с переменными температурными условиями имеют селективные преимущества перед стенотермными видами, поскольку активны и в теплое, и в холодное время года. Стоит отметить, что облигатные психрофилы имеют более высокий темп размножения, чем факультативные (Лях, 1976). В экосистемах зоны умеренного климата именно психротрофные микроорганизмы имеют преимущество. Так исследование микрофлоры карстовых полостей Средней Сибири показало, что доля психротрофных микроорганизмов составляет 51%, в то время как облигатных психрофилов – 17% (Хижняк, 2009).

Тем не менее, ряд авторов показывают отсутствие ярко выраженных границ между психрофильными и психротрофными микроорганизмами (Margesin and Schinner, 1999; Margesin, 2000; Хижняк, 2009; Овсянкина, 2013). В современной зарубежной литературе обе эти группы часто объединяют термином "*cold adapted*" ("адаптированные к холоду") (Margesin and Schinner, 1999; Margesin, 2000; Wang et al., 2011).

В общем, температурные диапазоны роста мезофильных, облигатных психрофилов и психротрофных микроорганизмов представлены на рисунке 1.2 (Гусев и Минеева, 2003).

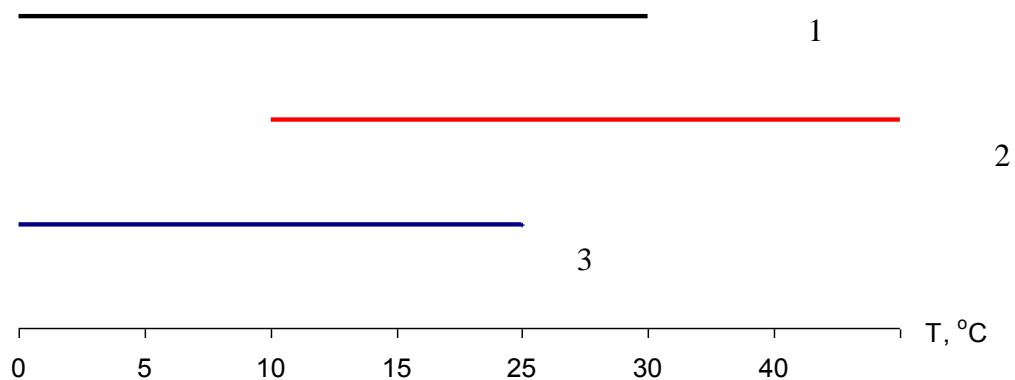


Рисунок 1.2 – Температурные диапазоны микроорганизмов (по Гусеву и Минеевой, 2003) 1 – факультативные психрофилы, 2 – мезофилы, 3 – облигатные психрофилы

Чувствительность механизмов адаптации к холоду хорошо известна, и кроме психрофилов, другие температурные группы микроорганизмов переходят в этих случаях в состояние анабиоза или инактивируются (Лозина-Лозинский, 1973). В свою очередь исследователи отмечают исключительную термочувствительность многих психрофильных микроорганизмов, не выдерживающих вполне «умеренных» температур (Лях, 1976; Нестеренко, 2007; Хижняк, 2009). При повышении температуры у облигатных психрофилов нарушается деление, появляются нарушения морфологии клеток, изменяется структура клеточной стенки и цитоплазматической мембраны, начинается лизис клеток (Громов и Павленко, 1989; Нестеренко, 2007; Хижняк, 2009; Овсянкина, 2013).

Специфические особенности в структуре клеток cold-adapted микроорганизмов, позволяющие им существовать при низких температурах, не обнаружены. Некоторые исследователи отмечают, что если сравнивать психрофильный и мезофильные штаммы одного вида, то клетка психрофила будет больших размеров (Лях, 1976). Изменчивость размеров тела как форма адаптации к градиентно-меняющемуся температурному режиму естественных

местообитаний широко распространена в природе (правило Бергмана) (Радкевич, 1998).

В настоящем, в качестве критерия психрофилии используют нуклеотидный состав ДНК. Психрофильные штаммы имеют более низкий процент Г+Ц по сравнению с мезофильными (Лях, 1976; Бабьева и Лисичкина, 2000). Однако такое соотношение встречается не всегда (Лях, 1976).

Также приспособление к пониженной температуре проявляется в изменении состава мембран, в ней повышается содержание ненасыщенных жирных кислот, что обеспечивает текучесть и транспортную активность мембран при низкой температуре (Margesin et al., 2008; Овсянкина, 2013). Другой механизм связан с поддержанием в клетках ключевых ферментов, так что даже при неоптимальной температуре их функционирование позволяет клетке иметь высокую активность (Экология микроорганизмов, 2004).

Таким образом, психрофильные микроорганизмы являются перспективной группой, способной деградировать углеводороды в экосистемах зоны умеренного климата.

1.3 Микробная биodeградация углеводов

Только в микромире имеются формы, способные существовать за счет углеводов и использовать их в качестве источника углерода и энергии. К ним относятся представители некоторых родов бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов. Эти микроорганизмы используют и другие органические вещества, и присутствуют в незагрязненных средах. Поэтому в случае загрязнения углеводородами нефти такие микроорганизмы получают преимущество, именно их размножением обусловлен эффект самоочищения воды и почвы (Квасникова и Ключникова, 1981; Кожевин, 1989). В настоящем, в отечественных и зарубежных источниках освещено множество исследований о способности микроорганизмов к утилизации разнообразных углеводов

нефти. В то же время углеводороды обладают разной степенью устойчивости к микробной деструкции (Филонов, 2016).

В общем, в состав сырой нефти входят алканы (парафины), циклоалканы (нафтены), ароматические углеводороды и другие компоненты. В зависимости от месторождения состав нефтей изменяется. Алканы присутствуют во всех нефтях. Общее содержание алканов в нефти в среднем составляет 40 – 50%, а в некоторых нефтях оно достигает 50 – 70% или 10 – 15% (Гриценко и др., 1997). Содержание циклоалканов в нефтях колеблется от 25 до 75%, ароматические соединения обычно составляют 10 – 30% углеводородов нефти (Гриценко и др., 1997; Ветрова, 2010). Содержание других химических элементов существенно ниже, например, сера колеблется от тысячных долей до 6-8 %, в отдельных случаях до 14 %, азота 0,02 – 1,7 %.

Алканы устойчивы к химическим воздействиям, но легко поддаются ферментативному окислению. Циклопарафины и ароматические углеводороды, напротив, более чувствительны к химическому окислению, нежели к биологическому. Микроорганизмы, способные усваивать алканы, широко распространены повсеместно и являются типичными представителями почвенных и водных экосистем. В отличие от алканов, циклоалканы труднее поддаются микробиологическому разложению. Связано это со специфичностью ферментных систем, участвующих в расщеплении циклоалканов, которые гораздо реже встречаются в природе. В литературе описаны штаммы, способные деградировать циклические алканы, к ним относятся бактерии родов *Gordonia*, *Xanthobacter* и др. (Филонов, 2016). Ароматические углеводороды являются наиболее токсичными и трудноразлагаемыми компонентами нефти, особенно полициклические ароматические углеводороды. Несмотря на их высокую токсичность в природе также существуют микроорганизмы, способные использовать их в качестве источников углерода и энергии. Это представители рр. *Micrococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Acinetobacter* и др. (Салманов и др., 2010, Логинова и др., 2010).

Наиболее трудноразлагаемыми компонентами нефти являются асфальтены. Поэтому в отличие от сырой нефти, объекты загрязненные нефтепродуктами, особо насыщенные асфальтеновой фракцией, наиболее трудно поддаются восстановлению. Проблема усложняется еще тем, что большинство таких объектов являются подземными.

Углеводороды окисляются внутри клеток, поэтому углеводородокисляющая активность штамма зависит, прежде всего, от его способности поглощать гидрофобный субстрат. Углеводороды – соединения водонерастворимые и их поглощение является сложным процессом. В связи с этим в клетках углеводородокисляющих микроорганизмов формируется ряд особенностей, отсутствующих у других бактерий. К особенностям относятся: возрастание роли пассивной диффузии в поглощении субстрата в противовес активному транспорту, накопление резервного внутриклеточного материала (липиды и внутренний пул углеводов), отсутствие лимитации роста субстратом, поскольку развитие углеводородокисляющих бактерий происходит при прямом контакте с каплями (пленками) углеводов (Скрябин и Головлева, 1976).

Бактерии, способные использовать углеводороды в качестве единственного источника энергии и углерода, выработали механизмы для поглощения этих нерастворимых в воде соединений. К таким механизмам относятся: 1) образование гидрофобной клеточной стенки, 2) формирование в клеточной стенке липофильных каналов, 3) выделение в среду биоэмульгатора (сурфактант) (Скрябин и Головлева, 1976; Margesin and Schinner, 1999, Rosenberg and Ron, 1999; Sobisch, 2000; Chun et al., 2002). В настоящем, выработка биосурфактантов бактериями также является важной характеристикой при введении штамма в биопрепараты, применяемые для рекультивации экосистем, шарушенных в результате углеводородного загрязнения (Ветрова и др., 2013).

В большинстве случаев разложение углеводорода начинается с окисления концевой метильной группы в первичную спиртовую группу. Первичный

спирт, образовавшийся из углеводорода, окисляется сначала до альдегида, а затем под действием NAD-зависимых дегидрогеназ до соответствующей жирной кислоты. Жирные кислоты распадаются путем β -окисления. Следует отметить, что имеются также данные о субтерминальном окислении углеводородов с участием кислорода. Кроме того, может происходить дитерминальное окисление с двух концов; образующаяся в первом цикле реакций жирная кислота снова гидроксيليруется по концевой метильной группе, давая дикарбоновую кислоту, которая затем подвергается β -окислению (Скрябин и Головлева, 1976; Готтшалк, 1982).

Большинство природных ароматических соединений расщепляется бактериями сначала до пирокатехина (катехола) или протокатеховой кислоты. Расщеплению до пирокатехина подвергаются многие соединения, у которых в ароматическом кольце имеется либо один заместитель, либо два заместителя в положении 1 и 2, т. е. такие вещества, как миндальная кислота, фенилаланин, толуол, бензол (Готтшалк, 1982). Разрыв ароматического кольца осуществляют диоксигеназы. При этом в субстрат включается молекулярный кислород. Разрыв происходит либо между двумя соседними гидроксильными группами, либо между гидроксильрованным углеродом и соседним негидроксильрованным (Скрябин и Головлева, 1976; Шлегель, 1987). Поэтому анаэробные представители микромира, способные деградировать ароматические соединения встречаются реже.

Важную роль в адаптации микроорганизмов к изменяющимся условиям, при привнесении в экосистему нефти, играют плазмиды. Т.к. ферменты, участвующие в разрушении углеводородов детерминируются плазмидными генами (Браун, 1968; Брода, 1982; Ветрова, 2010; Ветрова и др. 2013). В каждом случае плазмиды кодируют ферменты одного метаболического пути или его части. Плазмиды биодеградациии переносятся внутри видов и между видами бактерий путем конъюгации. Эти генетические детерминанты позволяют содержащим их микроорганизмам катаболизировать устойчивые в окружающей среде соединения, например, ароматические углеводороды, которые

неспособны разлагать большинство известных микроорганизмов (Ветрова, 2010; Филонов, 2016).

В почве группы бактерий, состоящие из небольшого числа клеток с определенными трансмиссивными плазмидами, могут обеспечить использование большого числа разнообразных пищевых возможностей. В океане менее 1 % бактерий являются углеводородокисляющими, при загрязнении их доля составляет 10% (Atlas, 1995). Никакая отдельно взятая хромосома не может содержать сравнимое количество информации. Интродукция микроорганизмов, содержащих плазмиды биодegradации ароматических углеводов, позволяет интенсифицировать процессы разрушения поллютанта в экосистеме и, кроме того, повышать деградиционный потенциал микробных популяций путем передачи плазмид и генов биодegradации в эндогенные микроорганизмы (Ветрова, 2010; Филонов, 2016). Введение плазмид в углеводородокисляющие штаммы позволяет увеличить процесс деградации в 10 раз по сравнению с бесплазмидным микроорганизмом (Ветрова, 2010). В настоящее время конструирование таких плазмидосодержащих микробных консорциумов используется при создании биопрепаратов для очистки окружающей среды от углеводородного загрязнения (Ветрова и др., 2013; Филонов, 2016).

Анаэробная биодegradация углеводов. В природной среде биодegradация углеводов осуществляется как в аэробных, так и в анаэробных условиях. В аэробных условиях, этот процесс идет до конечных продуктов окисления – углекислого газа и воды, поэтому его называют *минерализацией* (Паничева и др., 2012). В анаэробных условиях, отмечается накопление в системе промежуточных продуктов метаболизма, в частности, в процессах денитрификации и диссимиляционной аммонификации, гуминовых кислот, поэтому данный процесс называют *гумификацией* (Паничева и др., 2012).

Оптимальным способом ликвидации избытка углеводов считают минерализацию, а затем удаление CO_2 в атмосферу, или в виде карбонатных

соединений, – в литосферу. В водных экосистемах выделяющийся CO_2 практически полностью растворяется, что приводит к увеличению содержания в воде минерального углерода и иона гидрокарбоната (CO_3^{2-} , HCO_3^-) (Паничева и др., 2012).

При этом анаэробную биodeградацию также считают эффективной. Анаэробные микроорганизмы используют моноциклические ароматические углеводороды, такие как бензол, толуол, этилбензол, ксилол (BTEX), гексадекан и нафталин в качестве единственного углерода. Полициклические ароматические углеводороды также могут деградироваться в анаэробных условиях (Wolicka and Borkowski, 2012). В этом случае, полное удаление загрязнителя происходит медленнее, однако он трансформируется до нетоксичных гуминоподобных соединений. Данный подход позволяет существенным образом сократить сроки восстановления нефтенарушенных экосистем. В настоящее время, неполное окисление углеводородов используется в промышленности для получения аминокислот (Паничева и др., 2012). Стоит отметить, что углекислый газ, также появляется и в результате анаэробных процессов окисления углеводородов – денитрификации, сульфатредукции и др. процессов (Крайнов и др. 2004; Rivett et. al., 2008; Паничева и др., 2012). По оценкам исследователей вклад анаэробных процессов в биodeградацию углеводородов достаточно велик и может достигать 60%. При этом доля органических загрязнителей, которые разрушаются за счет редукции Mn, составляет 5%, редукции Fe – 19% и метаногенеза – 36% (Водяницкий, 2011).

В целом, анаэробной области, в том числе и в грунтах, в зависимости от окислительно-восстановительного потенциала среды формируются зоны разных восстановительных процессов: зона аэробнозона, зона нитратредукции (и диссимиляционной аммонификации), зона железоредукции, зона сульфатредукции, зона метаногенеза (рис. 1.3) (Крайнов и др. 2004; Rivett et. al., 2008; Водяницкий, 2014).

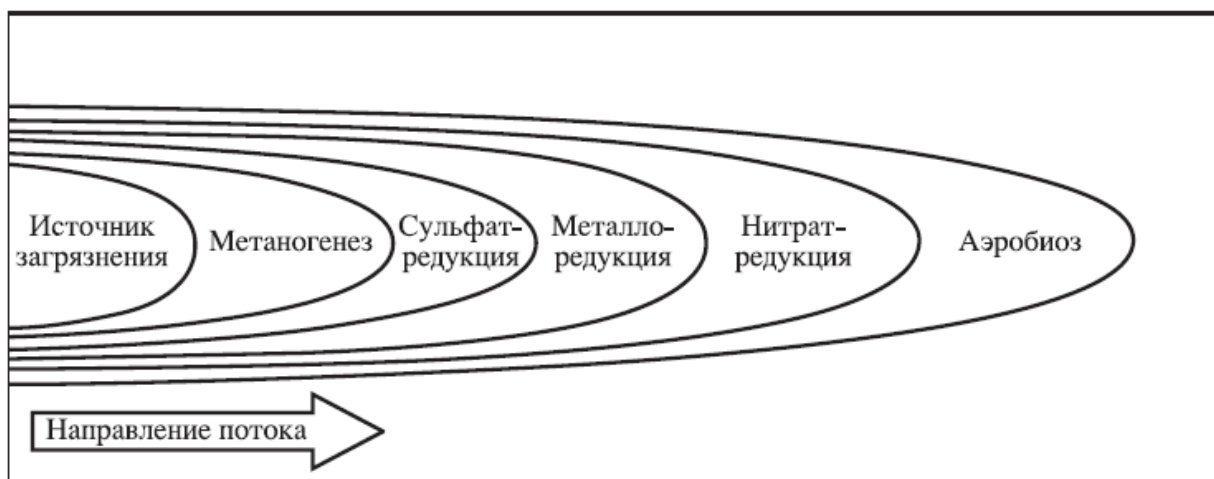


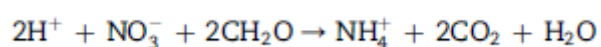
Рисунок 1.3 – Последовательность подземного распространения редокс-зон при разливе нефти (по Водяницкому Ю.Н., 2014)

Денитрификация и диссимиляционная аммонификация. В анаэробной зоне экосистемы, нарушенной в результате углеводородного загрязнения, исследователи фиксируют два процесса, в которых в качестве конечного акцептора электронов используется нитрат – *денитрификация* и *диссимиляционная аммонификация* (или *диссимиляционная нитратредукция до аммония*).

Денитрификаторы, в большинстве, факультативно анаэробные микроорганизмы, которые способны восстанавливать нитрат до свободного азота (Rivett et. al., 2008;). Денитрификаторы широко распространены в экосистемах. В большинстве случаев, аэробные углеводородокисляющие микроорганизмы, в условиях недостатка кислорода используют альтернативный акцептор электронов – нитрат, в частности к этому способны представители рр. *Pseudomonas*, часто встречающиеся в нефтезагрязненных объектах (Эмер, 2016).

Диссимиляционная аммонификация – это строго анаэробный процесс катаболизма органических соединений, при котором происходит восстановление нитратов до нитритов и аммония. Нитрат в данном случае служит конечным акцептором электронов. Поскольку они являются облигатными анаэробами, то, по сравнению с денитрификаторами, встречаются

реже. Однако довольно широко этот процесс наблюдается в подземных экосистемах, особенно в водоносных нефтезагрязненных горизонтах. Диссимиляционная аммонификация протекает по пути:



В зависимости от концентрации кислорода, появляющийся в экосистеме нитрат будет использоваться в реакциях денитрификации или диссимиляционной аммонификации. Индикатором, указывающим на доминирование диссимиляционной аммонификации над денитрификацией, считают высокий уровень нитритов. При этом отмечают, что низкая концентрация нитрата лимитирует диссимиляционную аммонификацию, а низкая концентрация углерода – денитрификацию (Rivett et. al., 2008).

Железоредакция и сульфатредукция. В анаэробных зонах объектов, загрязненных углеводородами, особую роль в биодеградации играют железоредуцирующие и сульфатредуцирующие микроорганизмы.

По оценкам исследователей, в водонасыщенных зонах с загрязнением ароматическими углеводородами до 1/5 части нефтяного загрязнения разрушается за счет железоредуцирующих микроорганизмов (Водяницкий, 2011). В зонах, загрязненных углеводородами доминируют члены семейства *Geobacter*, которые являются облигатными анаэробами. Процесс железоредукции сопровождается выделением углекислого газа. Основной причиной медленной анаэробной деструкции органических поллютантов, выделяют дефицит доступных для бактерий Fe(III)-минералов. Соответственно, чтобы стимулировать железоредукцию и деструкцию поллютантов необходимо внесение Fe(III). В частности для обводненных почв Водяницкий рекомендует внесение глины, содержащей Fe(III)-минералы (Водяницкий, 2011; Водяницкий и др., 2015).

Сульфатредуцирующие микроорганизмы – облигатные анаэробы. Представители, которые могут использовать углеводороды в качестве источника углерода, относят к родам *Desulforhabdus*, *Desulfobacter*, *Desulfovibrio* и др. (Kleikempe et al., 2002). Процесс сульфатредукции

приурочен к подземным системам, особенно в обводненной зоне. При невысокой температуре среды окисление сульфата SO_4^{2-} в сероводород возможно только биохимическим путем, с помощью сульфатредуцирующих микроорганизмов. Таким образом, исчезновение сульфата и присутствие в среде сероводорода (H_2S) и продуктов его диссоциации (HS^- , S^{2-}) свидетельствует о процессах сульфатредукции в экосистеме. При гетеротрофной сульфатредукции уменьшается рН среды, увеличивается концентрация углекислого газа (Крайнов и др., 2008).

Таким образом, для восстановления экосистем, нарушенных в результате углеводородного загрязнения, применяют методы биоаугментации и биостимуляции. Методы биоаугментации на практике используются чаще, однако они более затратны и нередко дают незначительный результат. Поэтому целесообразно исследовать методы биостимуляции, направленные на активизацию автохтонного микробного сообщества в экосистеме.

Для эффективной биостимуляции, необходимо определение ключевых эколого-трофических групп микроорганизмов, деградирующих углеводородное загрязнение, и факторов, лимитирующих развитие этих микроорганизмов. В экосистемах зоны умеренного континентального климата, нарушенных в результате углеводородного загрязнения, основные лимитирующие факторы – низкая температура среды, наличие биогенных элементов и конечных акцепторов электронов (кислорода, нитрата и др.), низкая влажность. В связи с чем, представляет научный интерес исследование стимуляции психрофильных микроорганизмов основных эколого-трофических групп, способных деградировать углеводородное загрязнение в аэробных и анаэробных условиях.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Природно-географическая характеристика района исследования

Исследования проводили на территории Средней Сибири в Красноярском крае и республике Хакасия. В Красноярском крае (Рыбинский район) анализировали верхний горизонт почвы, загрязненный сырой нефтью, и загрязненные нефтепродуктами грунты зон аэрации и насыщения, расположенные на территории г. Красноярска. В Хакасии на территории мазутного хозяйства Абаканской ТЭЦ исследовали грунты зоны аэрации и грунтовые воды, загрязненные нефтепродуктами. Районы исследования обозначены на карте звездочками (рис. 2.1).



Рисунок 2.1 – Географическое положение исследуемых районов, загрязненных углеводородами

Природные зоны – лесостепь (Красноярский край) и степь (Хакасия). Исследуемый регион относится к зоне резко континентального климата, с жарким летом и холодной продолжительной зимой. Сильное охлаждение земной поверхности зимой вызывает большие различия между летними и зимними температурами, а также сезонными количествами осадков. Континентальность выражена большой годовой (38°C , по средним месячным значениям) и суточной ($12 - 14^{\circ}\text{C}$) амплитудой колебаний температуры воздуха (Климат Красноярска, 1982). Среднегодовая температура воздуха колеблется в пределах от $0,8$ до $-1,7^{\circ}\text{C}$. В годовом ходе самая низкая средняя температура приходится на январь, минимальные значения температур зимой достигают $-35 - -40^{\circ}\text{C}$. Самые жаркие месяцы – июнь, июль, максимумы температуры достигают $+33 - +35^{\circ}\text{C}$. Среднемесячная температура составляет $16,8 - 18,3^{\circ}\text{C}$.

Количество осадков в среднем за год выпадает около $500-600$ мм, в зимний период осадков выпадает $16 - 18\%$ от годовой нормы (Климат Красноярска, 1982). Большая часть осадков приходится на вторую половину лета: нередко в июле и августе их выпадает в $2 - 3$ раза больше, чем за весь длительный холодный период. Высота снежного покрова в защищенных местах не превышает 40 см, а на открытых – $10 - 20$ см. Снежный покров в южной части лесостепи исчезает в конце марта – апреле. С конца апреля начинается оттаивание почвы, которое заканчивается в середине июля. В среднем около $225 - 230$ дней в году почвы находятся в мерзлом состоянии, северные склоны рельефа сохраняют мерзлоту в нижних слоях и до конца июня. Переход среднесуточных температур воздуха от отрицательных к положительным, приходится на середину апреля.

Важнейшим следствием резко континентального климата территории является почти повсеместное распространение вечной мерзлоты. В течение холодного времени года горные породы теряют здесь большое количество тепла и промерзают на значительную глубину, превращаясь в твердую мерзлую массу. Летом они не успевают целиком оттаять, и отрицательные температуры сохраняются уже на небольшой глубине в течение сотен и тысяч лет: мощность

мерзлоты: в большинстве районов не превышает 30-50 м, а на крайнем юге Красноярского края составляет всего 5-10 м (Медведков, 2013).

Средняя продолжительность вегетационного периода с температурой выше 5°C составляет от 100 дней на севере до 130 дней на юге зоны, а выше 10°C, соответственно, 65-70 и 90-100 дней (Медведков, 2013). Безморозный период в этом же направлении изменяется от 60 до 85 дней. Количество осадков за вегетационный период составляет 254 мм.

Температура почвы связана с температурой воздуха. Средняя годовая температура поверхности почвы равна 0°C (Магистральный нефтепровод ..., 2016). С глубиной температура почвы в летние месяцы убывает, в зимние, напротив, температура почвы с глубиной выше, так как сначала охлаждается ее поверхность. Начиная с глубины 1,6 м, средняя месячная температура почвы имеет только положительные значения.

2.2 Объекты исследования

В работе исследовали микробные сообщества почвы, грунтов и грунтовых вод на территории Средней Сибири, нарушенных в результате углеводородного загрязнения. Изучали изменение численности психрофильных и мезофильных микроорганизмов (абсолютное большинство во всех посевах составляли бактерии, но также встречались и дрожжи) основных эколого-трофических групп, при проведении стимулирующих мероприятий с целью биоремедиации почвы и геологической среды, загрязненных углеводородами.

По отношению к температуре исследовали нижеперечисленные *температурные группы* (Жизнь растений Т. 1, 1974; Экология микроорганизмов, 2004).

Мезофильные – микроорганизмы, растущие в диапазоне температур 15 – 40 °С, с температурным оптимумом 30 – 37 °С. У почвенных несколько ниже (20 – 25 °С). Максимальная температура роста свободноживущих мезофилов близка к максимальному нагреву почвы (45 – 50 °С).

Психрофильные (cold-adapted) холодолюбивые микроорганизмы:

Облигатные психрофилы – холодолюбивые микроорганизмы растут при температурах ниже 20°C (оптимум ниже 15 °C), вплоть до отрицательных значений.

Факультативные психрофилы (психротрофные) – микроорганизмы, растущие при 0°C, в отличие от облигатных психрофилов имеющие более высокие оптимальную (25 — 30 °C) и максимальную (примерно 35 °C) температуры роста.

Исследовали следующие *эколого-трофические (физиологические) группы* микроорганизмов (Шлегель, 1987; Экология микроорганизмов, 2004):

- углеводородокисляющие (использующие углеводороды нефти в качестве источников углерода и энергии);
- аммонифицирующие (культивируемые на пептонном агаре);
- денитрифицирующие – гетеротрофные бактерии, восстанавливающие нитрат в анаэробных условиях (без кислорода – нитратное дыхание) до молекулярного азота или аммония);
- сульфатредуцирующие – гетеротрофные бактерии, восстанавливающие в анаэробных условиях сульфаты до сульфидов);
- железоредуцирующие – гетеротрофные бактерии, восстанавливающие Fe (III), использующие железа в качестве акцептора электронов.

При исследовании микробного сообщества экосистем анализировали следующие характеристики:

- численность бактерий основных эколого-трофических групп;
- численность бактерий температурных групп;
- доминирующие роды бактерий (почвенный покров);
- температурные характеристики изолятов бактерий (почвенный покров);
- изменение химического состава грунтовых вод при проведении стимулирующих мероприятий.

Характеристика почв и грунтов. Отбор проб для микробиологического анализа проводили с верхнего горизонта почвы и геологической среды,

загрязненных углеводородами. Под *геологической средой* в настоящем исследовании понимают грунты зоны аэрации и зоны насыщения, включающие грунтовые воды.

Верхний горизонт почвы. Исследовали участок земли, загрязненный в результате аварийного разлива нефти (май 2001 г.). Разлив нефти произошел в результате аварии на магистральном нефтепроводе «Транснефть» на участке Иркутск-Красноярск. Участок находится в Красноярском крае Рыбинском районе, восточнее г. Красноярска на расстоянии 120 км. Загрязненная территория располагалась узкой полосой вдоль пересыхающего ручья на плоской равнине с березовым и осиновым лесом. Ручей впадает в небольшой водоем, используемый для лова рыбы. Исследовали серые лесные почвы, загрязненные сырой нефтью. Отбор почвенных образцов проводили с гумусового горизонта А, мощность которого составляет 10-15 см с глубины 10-15 см (Экология микроорганизмов, 2004; Магистральный нефтепровод ..., 2016).

На исследуемом участке закладывали опытные площадки, для проведения полевых экспериментов и отбирали пробы почвы для проведения экспериментов в лабораторных условиях. Методика проведения лабораторных и полевых экспериментов представлена в разделах 2.4.1 и 2.4.2 соответственно.

Грунты на территории хранилища нефтепродуктов. Исследовали грунты, загрязненные в результате утечек нефтепродуктов из хранилища, расположенного на территории г. Красноярска. Изучали грунты *зоны аэрации* (пространство между поверхностью земли и постоянным уровнем грунтовой воды) и *зоны насыщения* (пространство ниже уровня грунтовых вод) путем отбора проб грунта из скважин глубиной 15 м (Основы гидрогеологии, 1980). Под хранилищем нефтепродуктов залегает слой четвертичного суглинка мощностью 10,4 м, являющийся основным сорбентом техногенных нефтепродуктов. Слой суглинка подстилается гравелитами и алевролитами мощностью 2-4 м, которые сильно насыщены нефтепродуктами различного фракционного состава: от почти чистого бензина до сложной смеси (рис. 2.2).

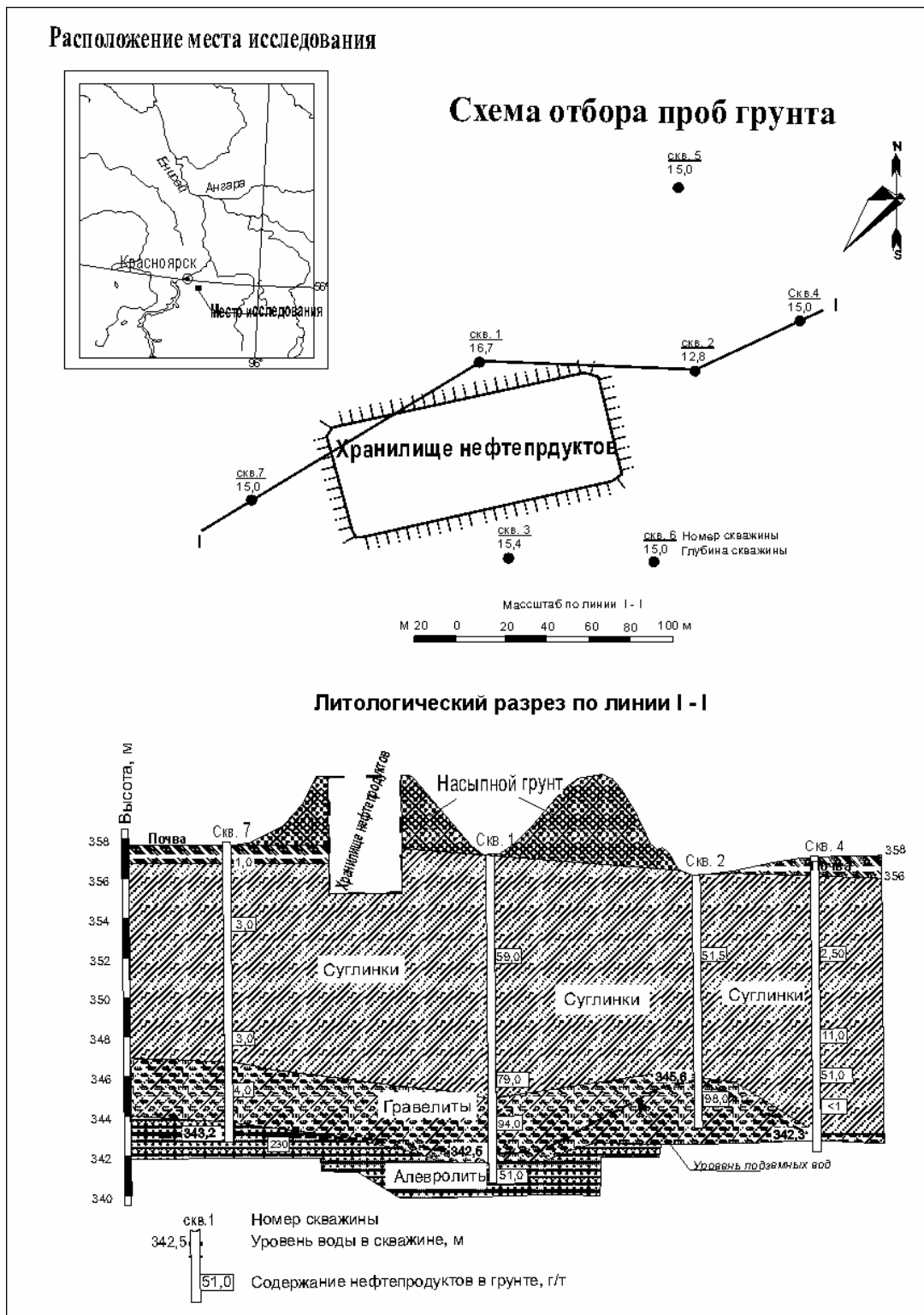


Рисунок 2.2 – Поперечный разрез и местоположение грунтов под хранилищем нефтепродуктов на территории г. Красноярска.

Подземные воды находятся на глубине 10 – 14,5 м от поверхности. Общее падение уровня грунтовых вод наблюдается в северном направлении с гидравлическим уклоном 0,014. Для исследования микробиологических

характеристик грунта отбирали пробы грунта из скважины №7, где мощность линзы нефтепродуктов на поверхности зеркала грунтовых вод была наибольшей (0,32 м) с глубин: 0,5 – 7,8 м (суглинки), 11,5 – 13,0 м (гравелиты), 13,0 – 15,0 м (алевролиты). Пробы перемешивали и отбирали среднюю по каждой глубине. Бурение проводилось колонковым способом, с полным отбором керна и без применения промывочных жидкостей, что позволило сохранить геохимическую и микробиологическую среду грунтов в отобранных пробах. Отбор проб производился непосредственно после извлечения керна в двойной полиэтиленовый пакет, чтобы избежать потерь углеводородов на испарение. Пробы хранились при пониженной температуре.

Данные о гидрогеологических свойствах пород, слагающих грунты, предоставлены Гидрогеологической партией ОАО «Красноярскгеология» (Таушева и др, 2003; Трусей и др., 2009). Проницаемость пород зоны насыщения крайне невелика – водопроницаемость пород составляет всего 11 м²/сут. По химическому составу грунтовые воды гидрокарбонатные натриево-кальциевые. Содержание нефтепродуктов в них изменяется от 3,1 до 8,5 мг/дм³. Толщина слоя нефтепродуктов на поверхности грунтовых вод в скважинах разная от 0,001 м до 0,32 м.

Водно-физические свойства грунтов приведены в таблице 2.1. Пористость, коэффициент фильтрации и химический состав грунтовых вод определяли стандартными методами (Основы гидрогеологии, 1980). Следует отметить их большую пористость (44 – 45%) которая создает благоприятные возможности для широкого распространения микроорганизмов. Несмотря на высокие значения пористости, проницаемость грунтов очень мала, что говорит о микроскопических размерах пор, препятствующих свободной фильтрации гравитационных вод. Проницаемость грунтов зависит не только от свойств самих грунтов, но также и от плотности и вязкости жидкостей, поэтому коэффициенты фильтрации для воды и различных нефтепродуктов существенно различаются. Проницаемость исследованных грунтов для бензина

больше, чем для воды, а для более вязких авиакеросина марки ТС-1 и дизельного топлива проницаемость грунтов, ниже, чем для воды.

Таблица 2.1

Водно-физические свойства грунтов

Наименование грунта (сверху-вниз)	Плотность, т/м ³	Пористость, %	Коэффициент фильтрации, м/сут			
			Вода	Бензин	ТС-1	Диз. топливо
Суглинок	1.92	45	0.00027	0.00034	0.00017	0.00007
Гравелит	1.88	44	0.0033	0.0042	0.0021	0.0008
Алевролит	1.94	44	0.00023	0.00029	0.00014	0.00006

Валовое содержание нефтепродуктов в пробах анализировали методом ИК-спектрометрии (Методика выполнения ..., 1998).

Грунты на территории мазутного хозяйства ТЭЦ. ТЭЦ находится в республике Хакасия, у западной границы городской черты г. Абакана и занимает почти идеально выровненную естественную площадку в долине реки Абакан. Анализировали грунты на территории мазутного хозяйства Абаканской ТЭЦ, загрязненные нефтепродуктами (рис. 2.3). Источником загрязнения грунтов являлось мазутное хозяйство ТЭЦ. В районе объекта развиты аллювиальные четвертичные отложения мощностью до 30,0 м, представленные гравийно-галечными отложениями с песчаным заполнителем и единичными валунами коренных пород, перекрытые с поверхности маломощным до 1,5 – 2,0 м слоем тонкозернистых песков и суглинками. На поверхности грунта имеется техногенный слой (0,5 м). Мощность водоносного горизонта достигает 20 – 30 м. Подземные воды безнапорные, со свободной поверхностью, глубина залегания уровня изменяется от 2,3 до 8,0 м, положение уровня грунтовых вод определяется геоморфологическими условиями района, а также сезонными колебаниями. Региональное направление потока подземных вод восточное. Коэффициенты фильтрации колеблются в пределах 0,52 – 108 м/сут. Температура грунтов зимой +4°С, летом +7 – +9°С. Грунты на рассматриваемом

участке ТЭЦ имеют низкую влажность (2 – 7%). С ростом глубины влажность грунтов уменьшается до зоны насыщения.

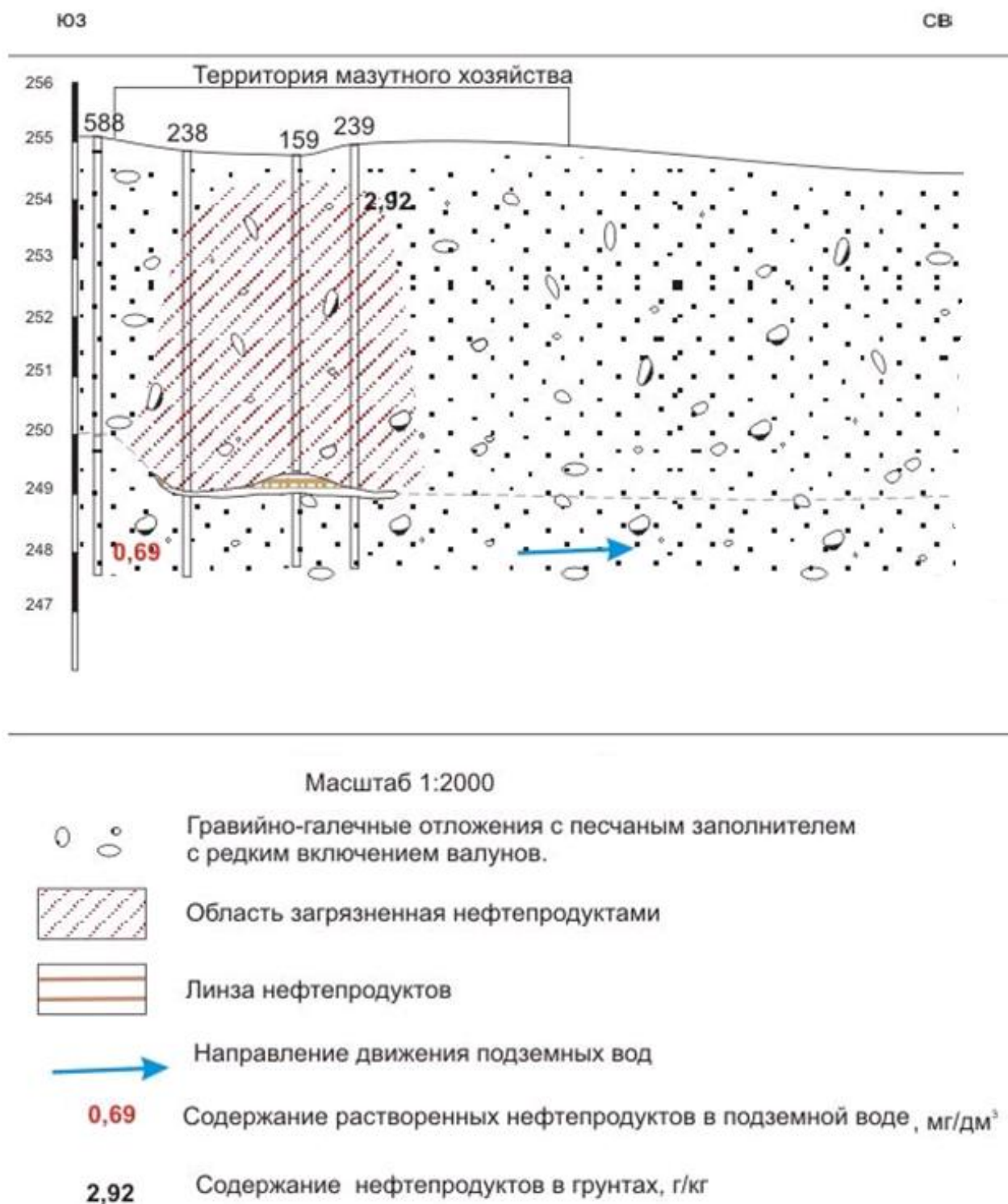


Рисунок 2.3 – Геологический разрез территории мазутного хозяйства ТЭЦ, загрязненной нефтепродуктами на начало исследования (2002 г.).

На территории мазутного хозяйства располагаются наблюдательные скважины. Схема расположения наблюдательных скважин представлена на рисунках 2.3 и 2.4.

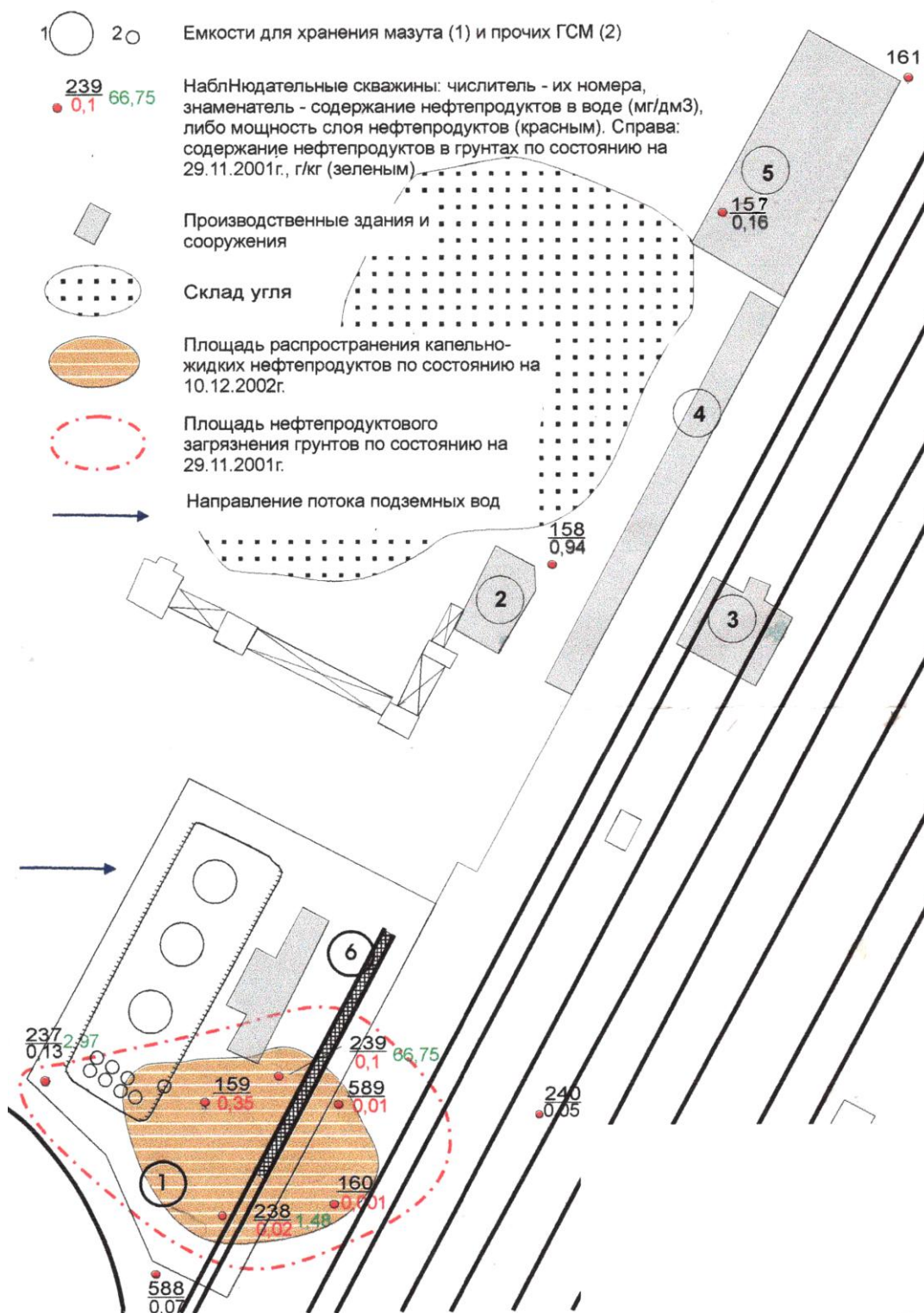


Рисунок 2.4 – Схема расположения очага загрязнения нефтепродуктами и наблюдательных скважин на территории мазутного хозяйства ТЭЦ.

Для анализа грунтовой воды отбирались пробы из наблюдательных скважин 159, 160, 161, 237, 238, 239, 588 и 589. Выбранные скважины расположены в областях с разным уровнем загрязнения. В области с высоким уровнем загрязнения (область выделена штриховкой на рис. 2.3) находятся скважины № 159, 160, 238, 239 и 589; скважины 237 и 588 находятся на границе загрязненного участка, а скважина 161 за его пределами. Загрязнение геологической среды произошло в результате эксплуатации мазутного хозяйства. На начало исследования в очаге загрязнения нефтепродукты содержались в капельно-жидком состоянии и образовывали линзу на поверхности грунтовых вод. В зоне аэрации углеводороды содержались в капельном и пленочном виде, в сорбированном состоянии на поверхности частиц грунта, а в грунтовых водах в растворенном виде. В основном загрязняющие органические вещества представлены смесью мазута, дизельного топлива, а также технологических масел. Загрязненная геологическая среда на начало исследования в разрезе представлена на рисунке 2.3.

Грунтовые воды на территории промышленной площадки Абаканской ТЭЦ по химическому составу относятся к типу сульфатно-гидрокарбонатных и гидрокарбонатных натриево-калиевых и смешанного катионного состава с минерализацией 0,37 – 1,5 г/дм³. Тип грунтовых вод может изменяться в сторону гидрокарбонатно-сульфатных. На участке мазутного хозяйства рН грунтовых вод изменяется от 6,6 до 8,5.

Содержание нефтепродуктов в грунтовых водах в зоне максимального загрязнения на начальном этапе достигало 350 – 400 мг/дм³ воды. Мощность слоя нефтепродуктов изменялась в зависимости от колебания уровня подземных вод: при максимальном подъеме уровня слой капельно-жидких нефтепродуктов исчезал, на поверхности водоносного горизонта отмечалась только пленка, при минимальном уровне подземных вод в скважинах отмечались максимальные мощности капельно-жидких нефтепродуктов. Максимальная мощность капельно-жидких нефтепродуктов на данном участке в 2002 г. наблюдалась в скважине 159 (толщина слоя нефтепродуктов 0,7 –

1,42 м), по скважине 589 составляла 0,12 – 0,3 м, по скважине 239 – 0,25 – 0,4 м, по скважине 238 – 0,03 – 0,07 м и по скважине 160 – 0,01 м.

2.3 Методы микробиологического анализа

Для культивирования углеводородокисляющих бактерий нефтезагрязненной почвы, использовали минерально-солевую среду (МСС) с нефтью следующего состава (г/л): KNO_3 – 4; KH_2PO_4 – 0,6; Na_2HPO_4 – 1,4; MgSO_4 0,4; выщелоченный агар – 20, рН 7,2-7,3 (Руководство к практическим..., 1983). В качестве источника углерода в среду вносили 2 мл/л сырой нефти, предоставленную ОАО «Трансибнефть». Нефть и другие углеводороды вносили несколькими способами: 1 – добавляли в среду во время посева, 2 – бумажные диски пропитывали углеводородами, укладывали на дно чашек Петри и сверху заливали средой (Руководство к практическим..., 1983). Культивирование аммонифицирующих бактерий проводили на пептоном агаре (Руководство к практическим..., 1983). Названные питательные среды используются для учета бактерий, но также в ряде случаев высевались дрожжи, поэтому в настоящей работе используется термин «микроорганизмы», под которым в первую очередь подразумеваются бактерии. Среда для выделения денитрифицирующих бактерий: пептонный агар (1,35%), KNO_3 (0,5%) и индикатор (бромтимолблау) (Bodenbiologische arbeitsmethoden, 1993). Для учета железоредуцирующих бактерий использовали среду Lovley (Lovley and Philips, 1986): NaHCO_3 (0,25%), KCl (0,01%), NH_4Cl (0,15%), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,06%), $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,01%), $\text{Fe}(\text{OH})_3$ или цитрат Fe^{3+} (0,5%), бензоат натрия (0,02%). Для учета сульфатредукторов – среду Баарса (в г/л): NH_4Cl – 1,0; KH_2PO_4 – 0,5; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; лактат Na (70%) – 3,5; вода водопроводная (Методы почвенной микробиологии ..., 1991).

Для учета численности микроорганизмов использовали два метода: посев в многослойный агар (Методы общей бактериологии, 1983; Хижняк и Мучкина, 2001; Sanders, 2012) и метод предельных разведений с высевом на агаризованную среду (Руководство к практическим..., 1983). Численность

пересчитывали на сухой вес почвы или грунта. Учет численности и выделение психрофильных (психротрофных) форм микроорганизмов проводили при температуре +5 – +10°C, мезофильных при +30 – +35°C, принимая во внимание температурные диапазоны их роста 0 – 20°C (0 – 35°C) и 15 – 35°C, соответственно (Лях, 1976; Звягинцев и др., 2005; Хижняк, 2009).

Для анализа роста выделенных изолятов бактерий на разных углеводородах использовали – октан, бензол, а также нефтепродукты предоставленные «Красноярскнефтепродукт» – дизельное топливо и масло «М₁₀Г₂». Учёт способности изолята к утилизации разных видов нефтепродуктов оценивали визуально после 7 суток культивирования, по следующей шкале: +/- – отсутствие роста, + – слабый рост, ++ – умеренный рост, +++ – интенсивный рост (Приложение 1).

Для определения температурного диапазона и оптимума роста, изоляты психрофильных бактерий выделяли при температуре +10°C, и культивировали при температурах +5, +15, +21, +28 и +33°C. Данные температуры выбирали исходя из температурных характеристик психрофильных и мезофильных микроорганизмов (Экология микроорганизмов, 2004). Для оценки роста изолятов бактерий при разных температурах, при культивировании микроорганизмов на чашках Петри, измеряли диаметр колоний. Для оценки скорости роста использовали отношение диаметра колоний (в миллиметрах) ко времени культивирования (в сутках). При культивировании бактерий в пробирках на «скошенном агаре», рост оценивали визуально и переводили в баллы: отсутствие роста – 0 баллов, слабый рост – 1 балл, умеренный рост – 2 балла, сильный рост – 3 балла, интенсивный рост – 4 балла (Приложение 2). На пептоном агаре время культивирования составляло 7 суток, на МСС – 10 – 14 суток.

2.4 Экспериментальные работы

2.4.1 Лабораторные эксперименты с почвенными микрокосмами

Оценка влияния температуры на численность бактерий в почвенных микрокосмах. В лабораторном эксперименте оценивали влияние температуры культивирования на соотношение численностей психрофильных и мезофильных бактерий (углеводородоокисляющих и аммонифицирующих) в почвенных микрокосмах. Для эксперимента отбирали замороженную нефтезагрязненную почву с участка (февраль), описанного в разделе 2.2. Почву для микрокосмом отбирали с горизонта А, очищали и равномерно перемешивали. Далее взвешивали по 200 г почвы и помещали в пластиковые емкости – микрокосмы. Влажность почвы в микрокосмах поддерживали на уровне 60%. Почвенные микрокосмы в течение 11 месяцев культивировали в разных температурных условиях:

- «холодный» микрокосм – при +5°C;
- «теплый» микрокосм – при +35°C;
- «переменный» микрокосм – при +5°C и +35°C с периодичностью двое суток. Температуру культивирования микрокосмов изменяли, для того чтобы имитировать природные колебания температуры. Каждый вариант закладывали в трех повторностях.

Оценка влияния карбамидоформальдегидного полимера на численность бактерий в почвенных микрокосмах. Коррекция условий среды развития растений и микроорганизмов с помощью карбамидоформальдегидных полимеров, выступающих в роли удобрения пролонгированного действия (Кузьмич и Переправо, 1985; Ягодин, 1989; Меньшикова, 2017) и структурообразователя (Кульман, 1982; Ягодин, 1989) – широко применяемый в агротехнической практике прием. В настоящей работе использовали карбамидоформальдегидный полимер марки Униполимер-М. Исследуемый полимер, используется при ремедиации нефтезагрязненных объектов в качестве сорбента нефти, а также в качестве удобрения пролонгированного действия

(Баронин и др., 2002, Мелкозеров и др., 2012; Меньшикова, 2017). Однако его применение в качестве удобрения и структурообразователя на нефтезагрязненных почвах требует дополнительных исследований.

Эксперимент 1. Пробы почвы для микрокосмов отбирали на нефтезагрязненном участке (описание в разделе 2.2), хранили при комнатной температуре, 200 г почвы помещали в пластиковые емкости, влажность поддерживали на уровне 60%.

Карбамидоформальдегидный полимер имеет рыхлую структуру, таким образом, при его внесении в почву, улучшается аэрируемость почвы. Для оценки влияния карбамидоформальдегидного полимера на численность мезофильных и психрофильных бактерий проводили лабораторный эксперимент, схема представлена в таблице 2.2. Перед началом эксперимента почву замораживали, с целью имитировать зимнее замерзание. Полимер вносили после оттаивания в количестве 1 г в микрокосм. Рыхление почвы проводили каждую неделю.

Таблица 2.2

Способы обработки почвенных микрокосмов

Вариант микрокосма	Почва	Способ обработки	
		Карбамидоформальдегидный полимер	Рыхление
1 вариант (контроль)	+	-	-
2 вариант	+	+	-
3 вариант	+	-	+

Эксперимент 2. Помимо того, что полимер влияет на аэрируемость почвы, он также изменяет ее теплофизические свойства. Для оценки этого воздействия анализировали скорость изменения температуры в почвенных микрокосмах с полимером и без. Почвенные микрокосмы (каждый вариант в трех повторностях) выдерживали при комнатной температуре в течение суток, для выравнивания температуры почвы. Начальная температура почвы во всех вариантах составляла 13,2°C. Далее микрокосмы переносили в термостат (35°C) и измеряли скорость нагревания почвы с полимером и без, а также скорость

охлаждения. Выявили, что с полимером почва медленнее нагревается и остывает.

Также оценивали, как карбамидоформальдегидный полимер влияет на численность бактерий в условиях переменных температур. Эксперимент проводили в почвенных микрокосмах, по следующей схеме:

- 1 вариант – почва (контроль);
- 2 вариант – почва с полимером.

Каждый вариант закладывали в трех повторностях. В пластиковые емкости помещали 200 г нефтезагрязненной почвы и добавляли полимер в дозе 1,5 г в микрокосм. Температуру почвы в микрокосмах изменяли, имитируя природные условия: переменная температура, оттаивание-замерзание почвы (табл. 2.3). Для этого микрокосмы каждую неделю перемещали в соответствующие температурные условия.

Таблица 2.3

Схема культивирования почвенных микрокосмов с полимером и без при разных температурах

Продолжительность	Температура (С°)
1 неделя (12.01-22.01)	+20
2 неделя (22.01-29.01)	+5
3 неделя (29.01-05.02)	-10
4 неделя (05.02-13.02)	+5
5 неделя (13.02-20.02)	+20
6 неделя (20.02-27.02)	+20
7 неделя (27.02-05.03)	+20

Условия зимних температур имитировали с помощью холодильной и морозильной камеры (температур +5 и -10°С). Теплый период года имитировали, культивируя микрокосмы в термостате.

2.4.2 Натурные эксперименты

Оценка численности почвенных микроорганизмов при коррекции условий среды. Исследовали участок земли, описание которого представлено в разделе 2.2. Наблюдения проводили на опытных площадках размером 2,5 м². Всего на загрязненном объекте было заложено 5 опытных площадок. Отбор проб почвы на опытных площадках проводили с горизонта А (10 – 15 см). Почвенные образцы для анализов помещали в стерильные бьюксы, которые хранили при температуре +5°С, высев проводили в течение суток. Масса почвенного образца составляла 15 – 20 г. Отбор почвы из микрокосмов и на опытных площадках проводили, используя метод «конверта» (Шараф и др., 1989; Ринькис и др., 1987).

В почву площадок вносили карбамидоформальдегидный полимер (Униполимера-М) в качестве удобрения пролонгированного действия и структурообразователя (Меньшикова, 2017); мел в качестве раскислителя почвы (Агрохимия, 1989; Зубайдуллин, 2003); ассоциации микроорганизмов (Таушева, 2003; Мелкозеров и др., 2010). Схема натурального эксперимента представлена в таблице 2.4.

Таблица 2.4

Варианты обработки экспериментальных площадок на нефтезагрязненном участке (Красноярский кр., Рыбинский р-он)

Реагент / Ассоциация микроорганизмов	№ опытной площадки				
	1	2	3	4	5 (контроль)
Карбамидоформальдегидный полимер (Униполимер-М)	+	-	+	+	-
Мел	+	+	-	+	-
Удобрения	+	+	+	+	+
Ассоциация микроорганизмов №1	+	-	-	-	-
Ассоциация микроорганизмов №2	-	+	+	+	-

Примечания: * «+» – вносили, «-» – не вносили

На все участки, включая контрольный №5, ежемесячно в период июнь – сентябрь, вносили азотно-фосфорное удобрение (Нитроаммофос), дозы внесения азота 35 кг/га и фосфора 22,5 кг/га. Карбамидоформальдегидный полимер вносили в почву гнездовым способом на глубину 5-10 см, расстояние между гнездами 20 см. При этом почву разрезали лопатой и отодвигали, чтобы сохранить почвенный профиль. Доза внесения составляла 40-50 кг/га (Мелкозеров и др., 2010), что примерно соответствовало 1,5 кг/га свободного азота, 2,22 кг/га фосфора (P_2O_5), 0,01 кг/га калия (K_2O) (Меньшикова, 2017). Форма – порошкообразная или легко рассыпающиеся гранулы с удельным весом 10 г/дм³. Доза внесения мела – 1200 кг/га.

В почву на опытных участках вносили два типа накопительных культур. На площадки №2 – 4 вносили культуру бактерий *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas sp.* (ассоциация микроорганизмов №2) по 1 л суспензии с титром 10^9 КОЕ/мл (табл. 2.4). Культура взята из установки очистки сточной воды производства фенол-формальдегидных смол, содержащей фенолы и различные продукты их поликонденсации с формальдегидом. Предварительная проверка показала, что она способна к росту на среде с сырой нефтью в качестве единственного источника углерода. Культура для этого процесса взята из аэротенка очистных сооружений коксохимического производства и активна в отношении ароматических углеводов (нафталина, фенантрена, антрацена, флуорена) (Гуревич и др., 1995). Ароматические углеводороды известны как наиболее токсичные и трудно разрушаемые компоненты нефти (Гриценко и др., 1997; Ветрова, 2010).

С целью обеспечения равных условий по начальной численности микроорганизмов на площадку №1 (см. табл. 2.4) вместо ассоциации бактерий №2 вносили аборигенные микроорганизмы (ассоциации бактерий №1) (5 л культуры с титром 10^8 КОЕ/мл). Для получения ассоциации №1 отбирали почву с загрязненного участка, делали почвенную суспензию, которую вносили в жидкую минерально-солевую среду с нефтью. Выращивание микроорганизмов проводили в накопительном режиме с аэрацией при комнатной температуре в

течение недели. Таким образом, на экспериментальных площадках (№№1 – 4) начальная численность углеводородокисляющих мезофилов и психрофилов составляла $10^5 - 10^6$ КОЕ/г.

На контрольной площадке №5 в момент отбора проб измеряли температуру почвы на поверхности, на глубине 5 см, для оценки температурных условий, в которых развиваются психрофильные и мезофильные микроорганизмы.

Для оценки общего влияния обработки почвы на микрофлору (различных комбинаций внесения полимера, мела и микроорганизмов) сравнивали среднюю численность бактерий на площадках № 1 – 4 (20 проб) со средней численностью на контрольной площадке № 5 (5 проб) (табл. 2.4). Для оценки влияния каждого из вышеперечисленных способов обработки в отдельности сравнивали среднюю численность бактерий в почве площадок, обработанных анализируемым способом (для каждого способа – 3 площадки), с численностью на площадке, которая не подвергалась обработке (табл. 2.4). Для оценки действия внесенных ассоциаций сравнивали данные на площадках № 1 и № 4.

Содержание нефти в почве опытных площадок и определяли стандартным методом ИК-спектрии после экстракции четыреххлористым углеродом (Методика выполнения ..., 1998). Актуальную кислотность почвы измеряли на рН-метре, влажность определяли весовым методом (Радов и др, 1971).

Для оценки разнообразия бактерий в почве на опытных площадках использовали индекс Шеннона. В данном случае, индекс отражает разнообразие бактерий, имеющих разные скорости роста при комнатной температуре. Для выращивания и подсчета бактерий использовали голодный агар с добавлением глюкозы. Индекс Шеннона (H) вычисляли по следующей формуле (Федоров и Гильманов, 1980; Тен Хак Мун, 1983).

$$H = -\sum n_i / (N \ln(n_i/N)), \text{ при } i \text{ от } 1 \text{ до } s,$$

где s – число видов.

n_i – оценка значимости каждого вида,

N – сумма оценок значимости

Оценка способов внесения карбамидоформальдегидного полимера в почву.

Также оценивали, как разные варианты внесения карбамидоформальдегидного полимера в почву влияют на численность микроорганизмов и влажность почвы. Для чего на нефтезагрязненном участке закладывали дополнительные опытные площадки, размером 2 м². На площадки вносили полимер в дозе 30 г/м². Карбамидоформальдегидный полимер вносили следующими способами:

- площадка №2-2 – верхний горизонт почвы до 10 см глубиной перемешивали с полимером;
- площадка №2-3 – полимер равномерным слоем, толщиной 1 см укладывали на поверхности почвы;
- площадка №2-4 – почву разрезали лопатой и вносили полимер.

В последнем варианте обработку проводили гнездовым способом, на глубину 5 – 0 см, расстояние между гнездами 20 – 30 см.

2.5 Методика проведения биостимуляции в грунтах, загрязненных нефтепродуктами

С 2004 года авторами совместно с сотрудниками Минусинской гидрогеологической партии на территории мазутного хозяйства Абаканской ТЭЦ проводятся работы по стимуляции автохтонной аэробной и анаэробной микрофлоры с целью восстановления геологической среды, загрязненной нефтепродуктами. Биоремедиационные мероприятия проводятся на наиболее загрязненном участке территории мазутного хозяйства (рис. 2.3 и 2.4). В качестве биоремедиационного мероприятия выбран метод *биостимуляции* – *стимуляция* развития автохтонных бактерий, в грунте посредством внесения биогенных минеральных элементов питания. Выбор технологической схемы обработки сделан на основании экспериментальных данных о распределении микроорганизмов в грунтах и грунтовых водах. Также во внимание брали и

другие характеристики объекта: концентрацию поллютанта, химический состав среды, направление потока воды, поглонительную способность грунта и др.

На начальном этапе в грунтах и грунтовых водах определили содержание биогенных элементов. Анализ химического состава грунтовых вод показал, что в воде достаточно калия, магния и серы для питания микроорганизмов, однако концентрация азота (аммонийного и нитратного) низкая и практически отсутствует фосфор. Содержание доступного растворенного фосфора в верхнем горизонте грунтов было менее предела обнаружения. В то же время концентрация фосфора в грунтовых водах имела выраженную тенденцию снижения в направлении потока воды и составляла менее $0,1 \text{ мг/дм}^3$. Это лимитирующая концентрация для роста микроорганизмов по отношению к наблюдаемым концентрациям азота на этом участке.

В связи с чем, в качестве метода стимулирующего автохтонную микрофлору грунта выбрано внесение в загрязненную систему биогенных химических элементов в виде удобрений, а именно аммофоса, нитроаммофоса, сульфата аммония, магния сернокислого. Удобрение, содержащее нитратную форму азота, также вносили для стимуляции развития анаэробных бактерий (денитрификаторов).

Расчет дозы внесения удобрений. При расчете дозы внесения минеральных химических элементов руководствовались следующим – концентрация углеводов нефти в наиболее загрязненной части грунтовых вод принята равной 1 г/дм^3 или обеспечивающей синтез $0,3 \text{ г}$ биомассы при окислении микроорганизмами. С учетом притока вещества будет окислено в 3 раза больше – $3 \cdot 0,3 \text{ г/дм}^3$ углеводов. Содержание фосфора в биомассе бактерий – $2,5\%$, азота – 11% . При полном удовлетворении потребности в фосфоре это соответствует $0,069 - 0,086 \text{ г нитроаммофоса/дм}^3$ (в зависимости от содержания фосфора). Если за базовый элемент принять азот, то потребуется $0,144 \text{ г/дм}^3$.

Выбор наблюдательных скважин. С целью определения возможности использования наблюдательных скважин для внесения минеральных элементов

путем налива водных растворов, были проведены измерения поглотительной способности исследуемых скважин. В таблице 2.5 представлены результаты определения поглощения воды при экспресс-наливе в скважины на опытном участке. В результате наиболее удовлетворяющими задаче приняты скважины 159 и 238, скорость поглощения воды в которых составляла 5,5 л/мин и 5,6 л/мин соответственно. Другие скважины могли «принимать» раствор минеральных элементов только в малых количествах или располагались на периферии загрязненного участка. Чтобы максимально охватить всю площадь загрязненного участка, растворы удобрений в меньших количествах вносили в скважины 238 и 239. Проницаемость грунта в районе скважины 239, расположенной вниз по потоку воды, очень низка, что минимизировало вынос азота и фосфора с грунтовыми водами за пределы загрязненной геологической среды.

Таблица 2.5

Поглощение воды грунтом при экспресс-наливе воды в наблюдательные скважины, расположенные на территории мазутного хозяйства ТЭЦ

Скважина	238	159*	589	160	239*
Скорость поглощения воды, л/мин	5,6	5,53 /10,0	12,0	0,53	– / менее 0,33

Примечания: * – в знаменателе данные измерений в июне 2005 г., остальные данные получены в августе 2006 г.

Описание биостимулирующих мероприятий. Биоремедиационные мероприятия проводили в два этапа: летом 2005 г. и 2006 г. Минеральные элементы вносили на поверхность загрязненной области и внутрь через систему наблюдательных скважин. Схема обработки опытного участка на территории мазутного хозяйства ТЭЦ представлена в таблице 2.6. Для проведения обработки на поверхности загрязненного участка в емкость (20 м³) набирали грунтовую воду с загрязненного участка, вносили минеральные элементы.

После пребывания в емкости в течение 7 – 10 суток суспензия разливалась вокруг скважины 159 в радиусе 5-6 м. Общая площадь обработанной территории около 200 м². При проведении мероприятий на первом этапе, акцент делали на стимуляцию аэробных гетеротрофных бактерий, поэтому азот вносили в аммонийной форме. В дальнейшем азот также вносился в нитратной форме, чтобы также стимулировать развитие денитрификаторов, и акцент делали на фосфор.

Таблица 2.6

Бистимулирующие мероприятия в грунтах зоны аэрации и насыщения территории мазутного хозяйства Абаканской ТЭЦ

Период внесения удобрения	Вид обработки	Удобрения	№ скважины			
			159	237	238	239
18.07.2005 – 25.08.2005	Внесение на поверхностный горизонт грунта	аммофос (NH ₄ H ₂ PO ₄), кг сульфат аммония (NH ₄) ₂ SO ₄ , кг	4,0 4,0	-	-	-
	Налив в скважины	нитроаммофос (NH ₄ H ₂ PO ₄ + NH ₄ NO ₃), кг сульфат аммония (NH ₄) ₂ SO ₄ , кг магний сернокислый, кг	15,5 11,0 0,9	3,0 2,0 -	0,12 - -	0,12 - -
02.09.2005 – 20.09.2005	Налив в скважины	нитроаммофос (NH ₄ H ₂ PO ₄ + NH ₄ NO ₃), кг сульфат аммония (NH ₄) ₂ SO ₄ , кг магний сернокислый, кг	6,0 4,5 0,9	-	-	-
	Внесение на поверхностный горизонт грунта	нитроаммофос (NH ₄ H ₂ PO ₄ + NH ₄ NO ₃), кг аммофос (NH ₄ H ₂ PO ₄), кг	2,5 1,0	-	-	-
17.09.2006	Налив в скважины	нитроаммофос (NH ₄ H ₂ PO ₄ + NH ₄ NO ₃), кг аммофос (NH ₄ H ₂ PO ₄), кг	3,75 1,5	-	3,75 1,5	-

Минеральные элементы вносили в наблюдательные скважины с периодичностью 2-3 раза в месяц. Наибольшее количество удобрений было внесено через скважину 159, которая находилась в зоне максимального загрязнения. Скважина 237 находилась выше по течению грунтовых вод. В скважины 238, 239 и на прилегающую к ним территорию, удобрения внесены

однократно (18.07.2005 г.) в небольшом количестве, которое могло создать концентрацию фосфора и азота в грунте и подземной воде одного порядка с фоновой. После внесения минеральных удобрений фиксировали изменение химического состава грунтовых вод, с целью исключить дополнительное загрязнение, все исследуемые показатели химического состава воды не отличались от проб воды из скважин, в которые удобрения не вносили.

В 2006 период количество вносимых в грунтовые воды удобрений было ниже, чем в 2005 году, также основная доля минеральных удобрений в загрязненную грунтовую систему была внесена через скважину 159. В дальнейшем обработку временно не проводили, чтобы оценить продолжительность действия внесенных химических элементов на численность аборигенных бактерий. После наблюдаемого положительного эффекта работа на загрязненном участке продолжилась.

Критерии эффективности. Для оценки эффективности предложенной методики биостимуляции в геологической среде использовали следующие критерии:

- 1) изменение численности психрофильных и мезофильных бактерий ключевых эколого-трофических групп: углеводородокисляющие, аммонифицирующие, денитрифицирующие, железоредуцирующие, сульфатредуцирующие;
- 2) изменение гидрохимических показателей: содержание нитратных форм азота (аммоний, нитрит, нитрат), содержание углекислого газа и иона гидрокарбоната, перманганатная окисляемость;
- 3) содержание нефтепродуктов в грунтовой воде.

Методы отбора образцов и проведения измерений. Для исследования микробного сообщества грунтов зонаэрации и насыщения отбирались пробы грунта из инженерно-геологических скважин глубиной 5-6 м. Перед проведением биоремедиационных мероприятий (июль 2004 г) была пробурена инженерно-геологическая скважина на 2 м южнее наблюдательной скважины №159, где отмечалась максимальная концентрация нефтепродуктов. После

проведения биоремедиационных мероприятий (октябрь 2005), была пробурена еще одна скважина южнее наблюдательной скважины 159. Пробы грунта массой 1 кг отбирали через 1 метр и помещали в стерильные боксы.

Пробы грунтовой воды отбирали из наблюдательных скважин после промывания. Отбор образцов грунта и грунтовой воды проводился сотрудниками Минусинской гидрологической партии. Далее воду помещали в стерильные бутылки объемом 1 л. До микробиологического анализа все емкости с образцами почвы, грунта и воды хранили при низкой температуре (до +10°C).

Химический анализ грунтовой воды проводили по стандартным методикам на Фотометре КФК-3, предел допускаемого значения основной абсолютной погрешности 0,5% (Гольдберг и др., 1988). Содержание нефтепродуктов в воде определяли флуориметрическим способом (Флуорат-02-2М), ошибка измерения для исследуемых диапазонов составляет 25% (Методические рекомендации по ..., 2002 г). Измерение рН воды и грунта проводили на рН-метре (Мультитест – ИПЛ-103).

2.6 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программного обеспечения «Пакет анализа», входящего в состав MS Excel 2007 (описательная статистика, однофакторный дисперсионный анализ, корреляционный анализ), а также пакета StatSoft STATISTICA 6.0 (кластерный анализ). Для оценки показателя силы влияния фактора «температура» на интенсивность роста бактерий при культивировании на пептонном агаре и минерально-солевой среде с нефтью применяли дисперсионный анализ (Лакин, 1990). Для дисперсионного анализа интенсивность роста исследуемых изолятов бактерий выражали в баллах (Приложение 2). Для оценки изолятов бактерий, использующих разные углеводороды в качестве единственного источника углерода, применяли кластерный анализ. Обработку данных по численности бактерий проводили с использованием статистики Пуассона (Методы общей

бактериологии, 1983; Хижняк и Мучкина, 2001), а также стандартных статистических методов для нормального распределения (Руководство к практическим..., 1983). В части случаев, для сравнения рядов данных по численности бактерий использовали непараметрический критерий Вилкоксона (Шараф и др., 1989).

Для оценки статистической взаимосвязи содержания химических соединений в грунтовой воде применяли корреляционный анализ. Для анализа большого объема данных гидрохимического состава грунтовых вод использовали нейронную сеть, реализованную в виде пакета расширения Microsoft Excel (Okhonin et al., 2001; Lankin et al., 2006). Сеть обучалась на основе алгоритма двойственного функционирования для выявления динамики изменения содержания в воде аммонийного, нитритного и нитратного азота, а также ионов гидрокарбоната и сульфатов. Для обучения нейросети использовались данные со скважин 589 и 239. Высокая обучаемость нейросети свидетельствует от наличия закономерностей (нелинейной корреляции) в изменении концентрации исследуемых химических веществ в грунтовых водах.

ГЛАВА 3. ИЗМЕНЕНИЕ ЧИСЛЕННОСТИ АВТОХТОННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЗАГРЯЗНЕННОЙ НЕФТЬЮ ПОЧВЕ ПРИ КОРРЕКЦИИ УСЛОВИЙ СРЕДЫ

Почвы зоны умеренного климата в течение года чаще подвергаются (включая летний период) действию низких температур, чем высоких. В связи с чем, в настоящей работе наряду с оценкой мезофильных микроорганизмов, также оценивали микроорганизмы способные образовывать колонии при низких температурах, а именно облигатные и факультативные психрофилы. При решении проблемы биодegradации нефтяного загрязнения, cold-adapted микроорганизмам уделяется большое внимание (Margesin et al., 2007; Филонов, 2016). Однако, до сих пор, нет детального исследования, показывающего вклад психрофилов в процессы биодegradации.

В настоящей работе исследованы автохтонные психрофильные микроорганизмы поверхностного горизонта почвы в условиях Средней Сибири. Стоит отметить, что на момент исследования загрязнение произошло относительно недавно, прошло менее месяца с момента аварийного разлива нефти. Несмотря на недавнее загрязнение, численность мезофильных и психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов была достаточно высока и сопоставима с численностью микроорганизмов, которая наблюдается исследователями при внесении в почву коммерческих биопрепаратов, содержащих микроорганизмы-деструкторы (Филонов, 2016). Численность психрофильных (образующих колонии при температуре +10°C) углеводородокисляющих микроорганизмов изменялась в пределах $10^5 - 10^6$ КОЕ/г. Численность мезофильных микроорганизмов (образующих колонии при температуре +33°C) была на порядок выше и составляла $10^6 - 10^7$ КОЕ/г. Следует отметить, что в группу психрофильных (cold-adapted) микроорганизмов попадают не только облигатные, но также и факультативные психрофилы (психротрофы), сохраняющие высокую скорость размножения в широком диапазоне температур (Хижняк и др., 2003).

3.1. Характеристика изолятов психрофильных бактерий верхнего горизонта почвы

Из образцов исследуемой почвы было выделено 22 изолята психрофильных микроорганизмов, способных расти при температуре +10°C на минерально-солевой среде содержащей сырую нефть в качестве источника углерода (Приложение 1). В основном микрофлора была представлена бактериями (95,5%). Кроме бактерий, были выделены дрожжеподобные грибы (4,5%). Из выделенных штаммов 60% были грамположительными неподвижными коккобациллами и короткими палочками. К денитрификации были способны 2 штамма. По морфологическим признакам большая часть изолятов была отнесена к *pp. Arthrobacter* и *Pseudomonas* (Определитель бактерий Берджи, 1997). По отношению к кислороду 27% являлись факультативными аэробами.

Для определения температурного диапазона и оптимума роста, выделенные изоляты выращивали при температурах +5, +15, +21, +27 и +35°C на пептоном агаре (ПА) и минерально-солевой среде (МСС) с нефтью. Анализ показал, что при культивировании изолятов на богатой органической среде (ПА), отмечалось изменение температурных оптимумов и диапазонов роста по сравнению с аналогичными показателями при культивировании на МСС с нефтью (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Характеристика изолятов почвенных углеводородокисляющих бактерий при культивировании на разных средах

Среда	Доля изолятов бактерий			
	не образующих колонии при +5°C	не образующих колонии при +35°C	имеющих оптимальную температуру близкую к +21°C	имеющих оптимальную температуру близкую к +27°C
Пептонный агар	12,5%	25%	63%	25%
Минерально-солевая среда с нефтью	66,7%	50%	16%	50%

При культивировании на ПА, 63% изолятов температурный оптимум приближается к +21°C и 25% – близкий к 27 °С. При культивировании этих же изолятов бактерий на среде с нефтью температурный оптимум смещается в более высокую область, у 50% изолятов температурный оптимум близок к +27°C (табл. 3.1). Один изолят при культивировании на среде с нефтью, имел температурный оптимум около +35°C. У ряда изолятов, при культивировании на среде с нефтью, отмечалось сужение температурного диапазона роста. Более того, 66% изолятов бактерий при культивировании на среде с нефтью вообще не образовывали колонии при температуре +5°C, а половина изолятов – при +35°C. Часть изолятов при культивировании на легкодоступном источнике углерода (ПА) также не образовывали колонии при +5°C и +35°C, однако их процент существенно ниже, чем при росте на среде с нефтью.

Для примера рассмотрим кривые роста отдельных изолятов при исследуемых температурах. На рисунках 3.1 и 3.2 приведены кривые роста изолята 1-1 при разных температурах на двух средах.

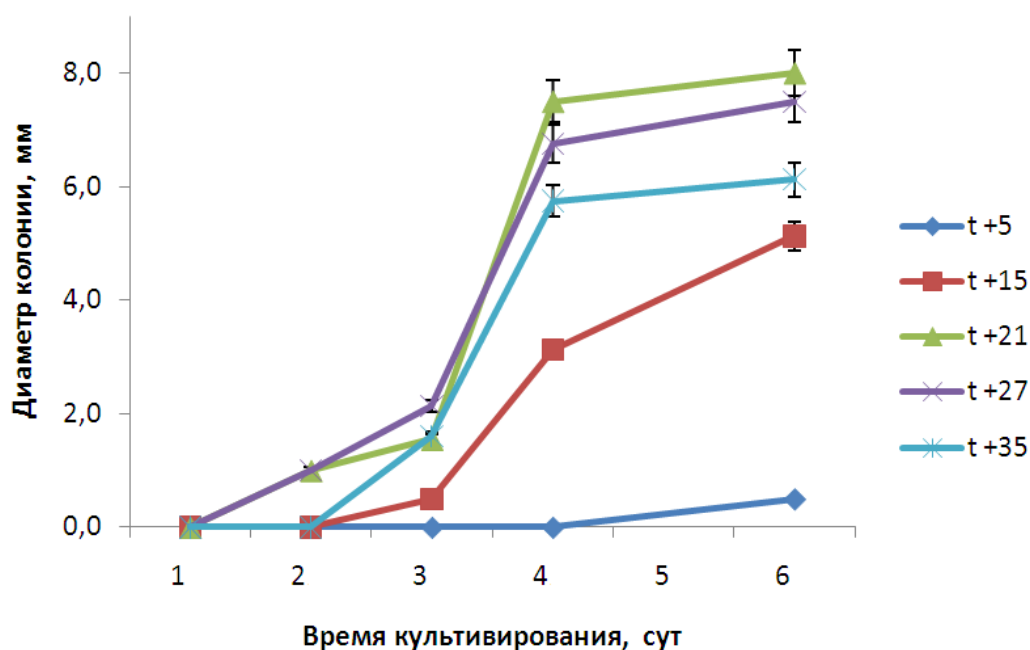


Рисунок 3.1 – Диаметр колонии изолята 1-1 при культивировании на пептонном агаре при разных температурах.

При росте на ПА микроорганизм максимальный диаметр колонии зафиксирован при температуре +21°C и, в целом отмечался рост в диапазоне температур от +5°C до +35°C, т.е. данный микроорганизм типичный факультативный психрофил с температурным оптимумом близким к +21°C (рис. 3.1). Конечный диаметр колоний изолята 1-1 при температуре +21°C на 6 сутки культивирования составлял 80 мм. При культивировании на МСС с нефтью, кривые роста при температурах +21°C, 27°C, на начальном этапе более интенсивный рост отмечался температуре +35°C (рис. 3.2).

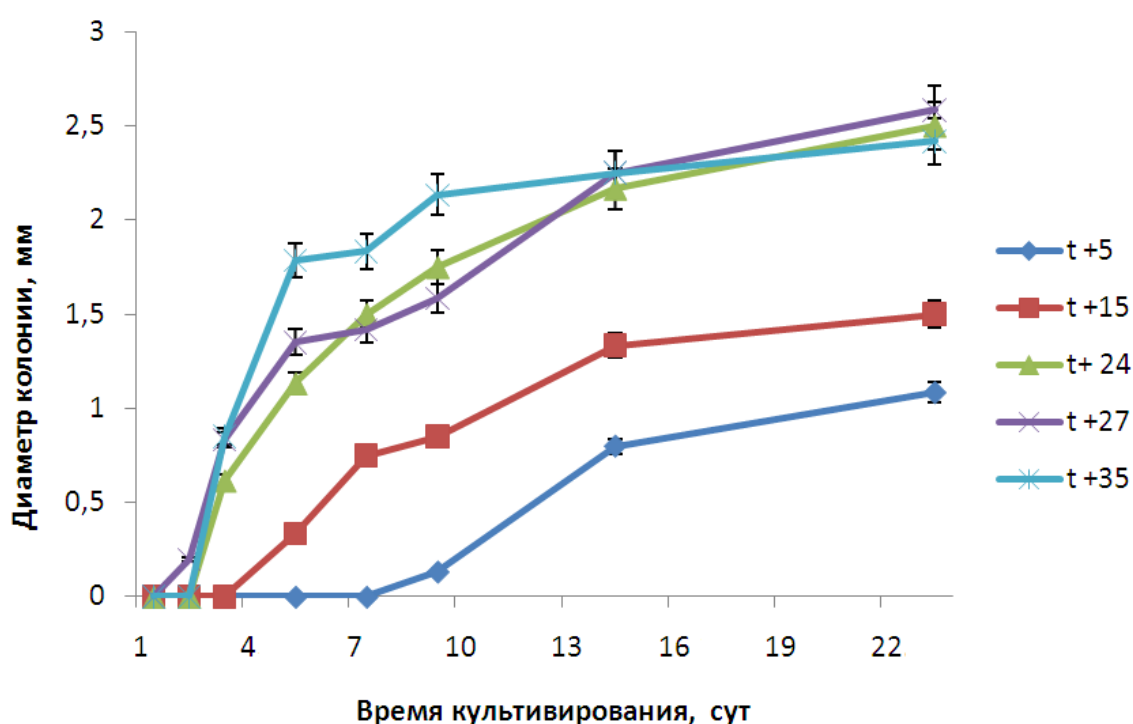


Рисунок 3.2 – Диаметр колонии изолята 1-1 на минерально-солевой среде с нефтью при разных температурах.

Чтобы более точно оценить температурные характеристики изолята 1-1 при культивировании на разных средах, оценивали максимальную скорость роста (увеличение диаметра колонии в сутки) при исследуемых температурах. Выявили, что максимальная скорость роста на ПА наблюдалась при температуре +21°C и составляла 1,88 мм/сут (рис. 3.3). На среде с нефтью скорость роста была существенно ниже, максимальная скорость роста

наблюдалась при температурах +27°C и +35°C и составляла 0,278 мм/сут и 0,283 мм/сут, соответственно. В то время как при температуре +21°C, составляла 0,23. Таким образом, при культивировании на МСС у исследуемого штамма температурный оптимум сдвинулся в более высокую область.

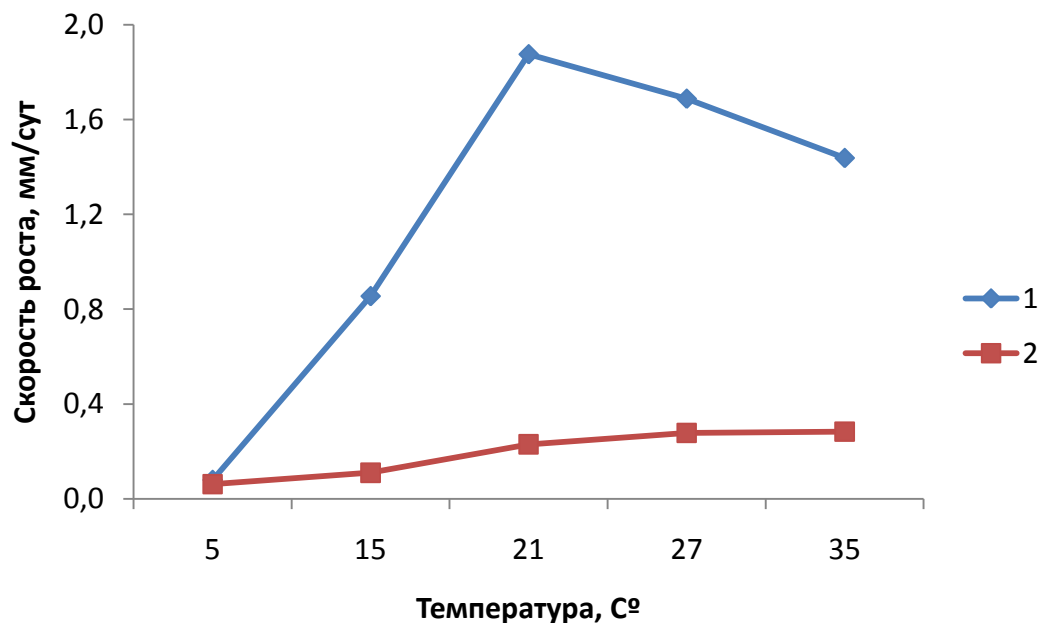


Рисунок 3.3 – Максимальная скорость роста колонии изолята 1-1 на пептоном агаре (1) минерально-солевой среде с нефтью (2) при разных температурах.

На рисунках 3.4 и 3.5 приведены кривые роста изолята 3-1. Если анализировать изменение диаметра колоний на ПА, то можно заключить, что данный микроорганизм является факультативным психрофилом с температурным оптимумом близким к +21°C (рис. 3.4), на шестые сутки максимальный диаметр колонии составлял 12 мм. У изолята 3-1 рост наблюдался во всем исследуемом диапазоне температур. При культивировании на МСС с нефтью, у изолята сужается диапазон роста, он не образует колонии при температуре +35°C, а максимальный диаметр колонии наблюдался при температуре +27°C и составлял 0,6 мм (рис. 3.5).

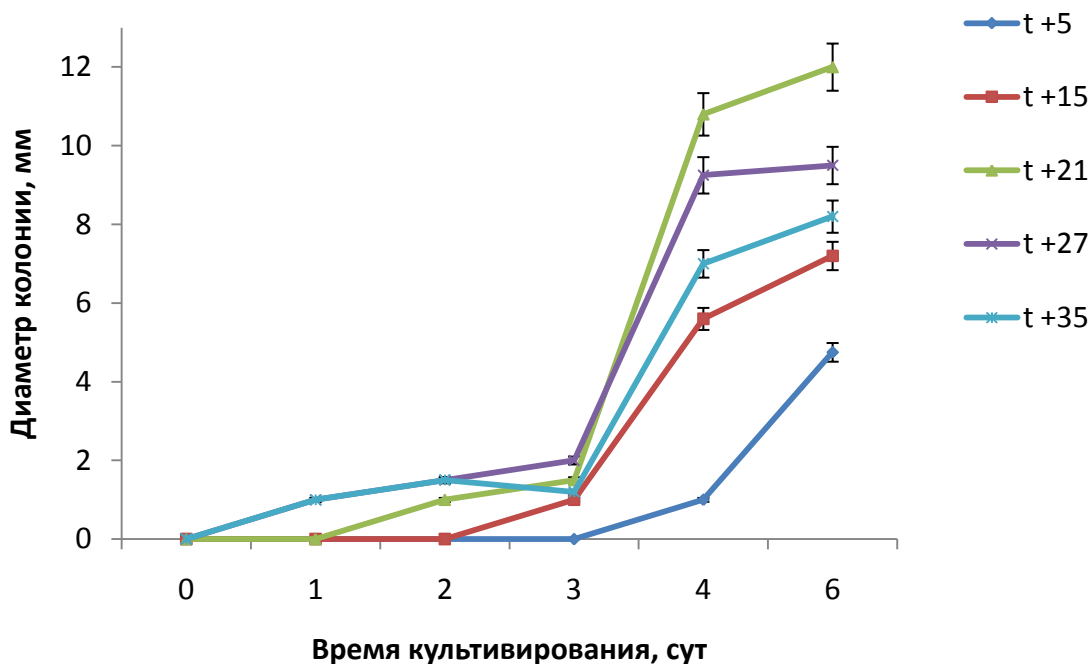


Рисунок 3.4 – Диаметр колонии изолята 3-1 на пептонном агаре при разных температурах.

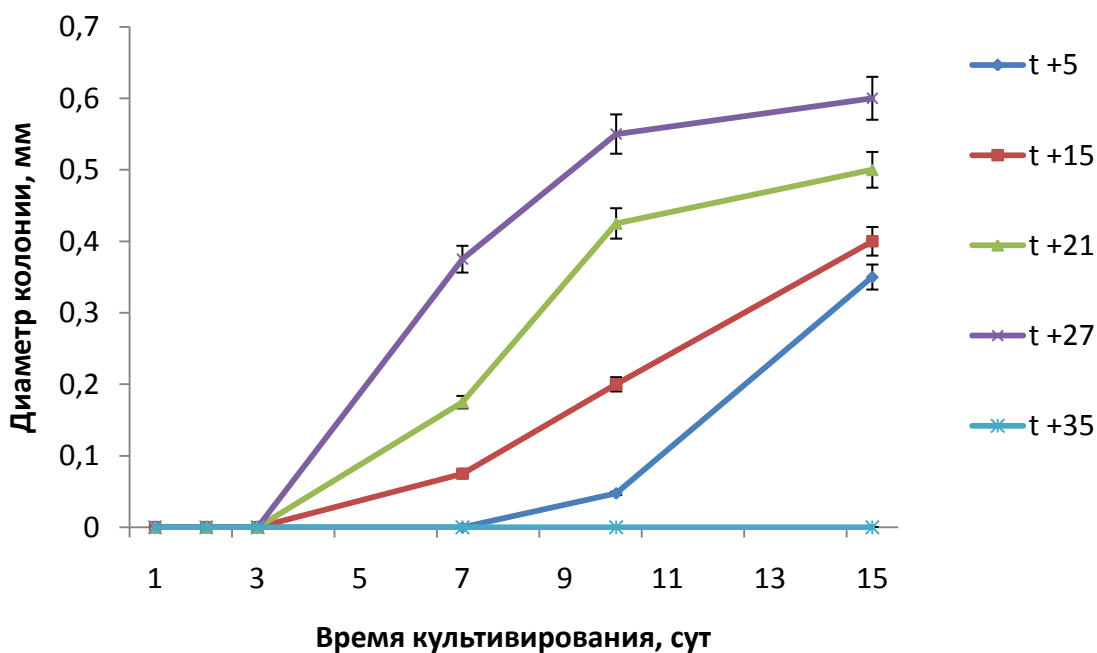


Рисунок 3.5 – Диаметр колонии изолята 3-1 на минерально-солевой среде с нефтью при разных температурах.

Оценка скорости роста показала, что при культивировании на ПА максимальная скорость роста наблюдалась при температуре +21°C, и составляла 2,7 мм/сут (рис. 3.6). При культивировании на МСС с нефтью также,

как и у изолята 1-1, наблюдалось смещение оптимума роста в более теплую область, максимальная скорость роста наблюдалась при температуре +27°C и составляла 0,33 мм/сут, при температуре +21°C – 0,25 мм/сут (рис. 3.7).

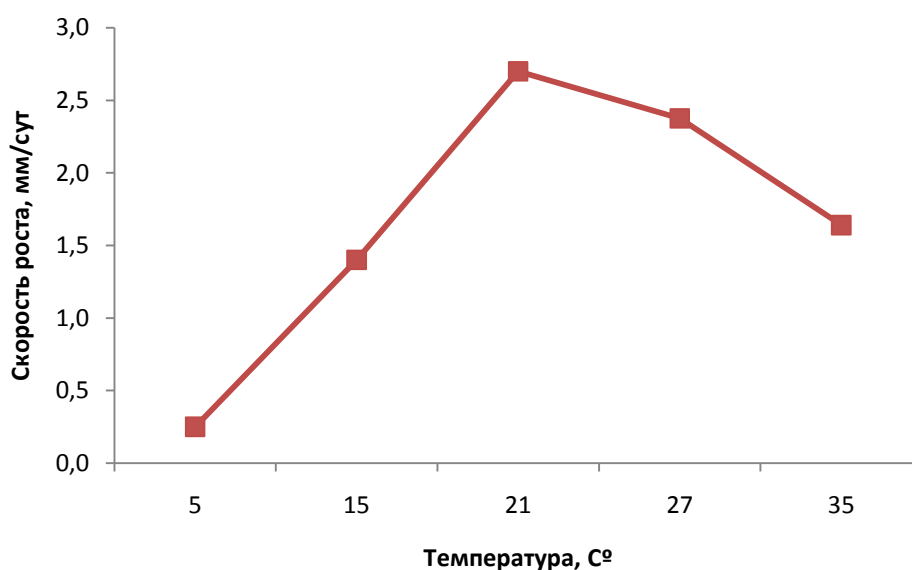


Рисунок 3.6 – Максимальная скорость роста изолята 3-1 на пептоном агаре при разных температурах.

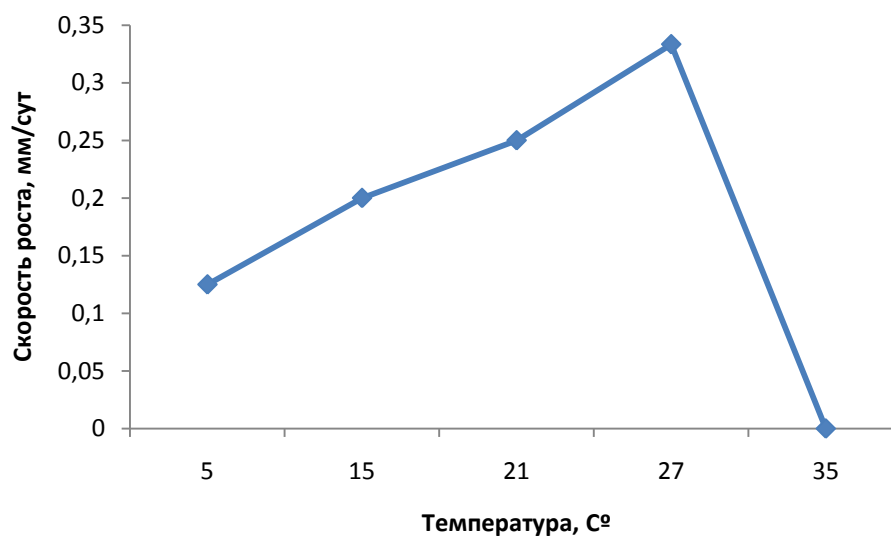


Рисунок 3.7 – Максимальная скорость роста изолята 3-1 на минерально-солевой среде с нефтью при разных температурах.

В результате проведенных исследований установлено что, температурные характеристики бактерий зависят от среды культивирования. Данные по росту

исследуемых изолятов бактерий на разных средах представлены в приложении 2. С помощью однофакторного дисперсионного анализа выявили, что показатель силы влияния температуры на рост изолятов при выращивании на пептонном агаре составляет 38,2% (уровень значимости $P < 0,05$; $F_{\phi} = 5,40$, $F_{\text{табл.}} = 2,64$), в то время как при культивировании на МСС с нефтью – 84,7% (уровень значимости $P < 0,05$; $F_{\phi} = 46,98$, $F_{\text{табл.}} = 2,64$). Двухфакторный дисперсионный анализ показал статистически значимый ($P < 0,05$) эффект взаимодействия факторов «температура» и «среда» на интенсивность роста бактерий. Показатель силы влияния для взаимодействия составляет 15,2%. Таким образом, на среде с нефтью бактерии более «чувствительны» к температуре, чем на богатой органической среде. Вероятнее всего это связано с доступностью углеводов нефти. При снижении температуры, вязкость и плотность нефти увеличиваются, в результате клетка не способна использовать ее в качестве питательного субстрата (Margesin, 2000; Белякова и Таушева, 2004). Таким образом, низкая температура среды влияет на активность клетки как непосредственно через скорость ферментативных реакций, так и через доступность питательного субстрата.

В целом анализ роста бактерий на ПА показал, что 93,7% исследуемых психрофильных изолятов, можно отнести к факультативным микроорганизмам, а 6,3% – облигатным психрофилам. На среде с нефтью, как уже было сказано выше, температурные показатели отличаются.

Выделенные изоляты бактерий были способны расти на минерально-солевой среде с нефтепродуктами – дизельным топливом и маслами ($M_{10}G_2$), индивидуальными субстратами – октаном и бензолом при температуре $+10^{\circ}\text{C}$ (Приложение 1).

При проведении кластерного анализа выявили, что углеводороды объединяются в два кластера по способности поддерживать рост исследуемых изолятов при использовании в качестве единственного источника углерода: ароматические и линейные углеводороды. Разные способы кластеризации дают сходные результаты (рис. 3.8). При этом не было обнаружено достоверных

отличий по доступности разных углеводов между представителями *pp. Arthrobacter* и *Pseudomonas*.

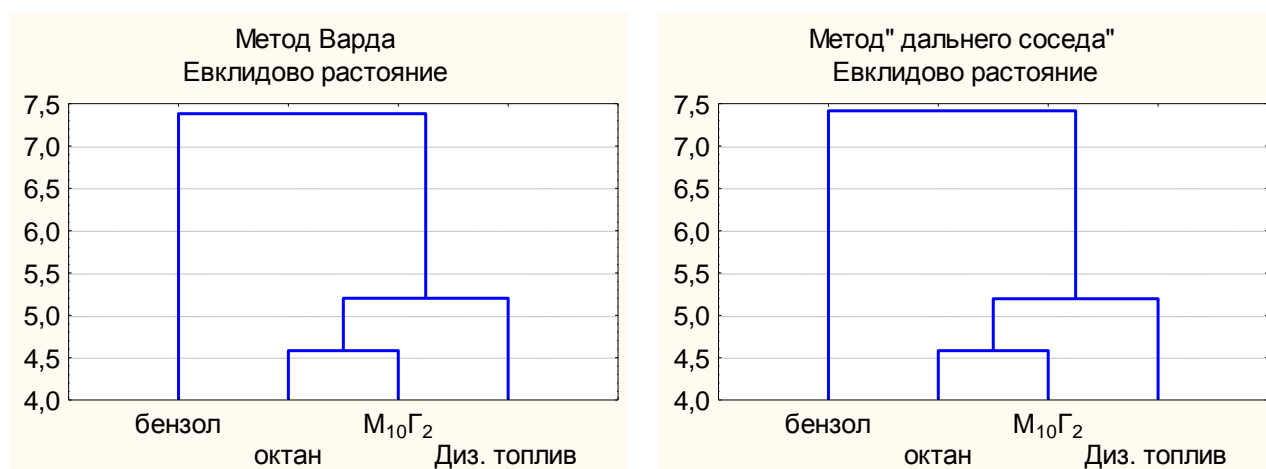


Рисунок 3.8 – Кластеризация углеводов по способности поддерживать рост исследуемых изолятов при использовании в качестве единственного источника углерода.

Как правило, в видовой структуре биологических сообществ можно выделить доминирующие виды микроорганизмов, которые осуществляют основную часть работы по трансформации (органического) вещества, т.е. сообщества имеют иерархическую структуру (Свирижев и Логофет, 1978; Ген Хак Мун, 1983). В почвенной микробиологии под доминированием понимается численное преобладание того или иного вида микроорганизмов. Для количественного учета почвенной микрофлоры проводятся многократные разведения посевного материала, что позволяет учитывать только те виды, которые представлены в данном сообществе многочисленными популяциями, т.к. вероятность попадания редких микроорганизмов исключительно мала. По мнению Звягинцева (Звягинцев, 1978), при проведении экологических исследований нет необходимости определять все существующие в данной почве виды микроорганизмов, а достаточно ограничиться выявлением тех форм микроорганизмов, которые доминируют среди микрофлоры, осуществляющей наиболее важные для данного типа почв процессы. Это справедливо в тех

случаях, когда нужно получить характеристику видовой структуры микробного сообщества, существующего в данный период времени. Однако, следует учитывать, что при значительных антропо(техно)генных изменениях условий среды в число доминантных могут перейти минорные виды сообщества, которые ранее не были идентифицированы.

В исследуемой почве было выделено 7 изолятов cold-adapted углеводородокисляющих бактерий, которые являлись доминирующими. В основном они представлены грамотрицательными палочками (85%), предварительная идентификация показала, что данные бактерии относятся к р. *Pseudomonas* (Определитель бактерий Берджи, 1997). Поскольку загрязнение системы произошло недавно (месяц после аварии), доминирование псевдомонад, которые являются r-стратегами, легко объяснить (Parry, 1981; Кожевин, 1989). Один изолят был представлен грамположительными кокками и отнесен к р. *Arthrobacter*.

Можно заключить, что психрофильные углеводородокисляющие бактерии исследуемой нефтезагрязненной почвы в основном являются факультативными психрофилами (93,7%). Выявлено, что температурный оптимум и температурный диапазон роста у исследуемых изолятов бактерий зависит от среды культивирования – источника питания. На МСС с нефтью бактерии более «чувствительны» к температуре, чем на богатой органической среде. Таким образом, активность углеводородокисляющих бактерий в большей степени зависит от температуры окружающей среды, чем других гетеротрофных групп микроорганизмов, использующих более легкие источники питания. При выделении и подборе микроорганизмов для различных биотехнологических процессов (создание биопрепаратов и т.д.) это нужно учитывать.

3.2 Сравнительный анализ численности психрофильных и мезофильных микроорганизмов в почве

Для оценки влияния температуры на соотношение численностей микроорганизмов разных температурных групп в исследуемой почве, был проведен лабораторный эксперимент с почвенными микроекосмами, культивируемыми в разных температурных условиях. Стоит отметить, что на используемых средах в подавляющем большинстве случаев выделяются бактерии, но, иногда также встречаются и дрожжевые грибы. При очистке объектов от углеводородного загрязнения ключевая роль принадлежит бактериям, поэтому в настоящей работе акцент делали на данную группу микроорганизмов.

Поскольку многие исследователи отмечают, что до сих пор нет четкого определения границ роста у облигатно психрофильных, психротрофных и мезофильных микроорганизмов (Хижняк и др., 2003; Хижняк, 2009; Илиенц, 2011; Овсянкина, 2013), то в данной работе все микроорганизмы, способные образовывать колонии при низкой температуре (+5°C) определяли как психрофильные, сюда относятся облигатные и факультативные формы. Микроорганизмы, образующие колонии при температуре +35°C и выше, но не имеющие роста при +5°C, отнесены к мезофильным.

Данные по численности психрофильных и мезофильных бактерий разных эколого-трофических групп в почвенных микроекосмах представлены в таблице 3.2. В течение всего периода наблюдений в «теплом» микроекосме отмечалось численное преобладание мезофильных аммонификаторов (средняя численность – $(1,38 \pm 0,85) \cdot 10^7$ КОЕ/г) над психрофильными (средняя численность – $(0,61 \pm 0,13) \cdot 10^7$ КОЕ/г) с доверительной вероятностью 0,97 (критерий Вилкоксона). В «холодном» микроекосме численность психрофильных микроорганизмов держалась на одном уровне с численностью мезофильных и составляла $10^6 - 10^7$ КОЕ/г, достоверных отличий между ними обнаружено не было ($P > 0,05$). Также достоверные отличия ($P < 0,05$) наблюдались между численностью мезофильных и психрофильных углеводородокисляющих

микроорганизмов как в «холодном», так и «теплом» микрокосмах. В «холодном» микрокосме мезофильные (средняя численность – $(1,47 \pm 0,61) \cdot 10^7$ КОЕ/г) по численности преобладали над психрофильными (средняя численность – $(0,48 \pm 0,30) \cdot 10^7$ КОЕ/г). В почве «теплого» микрокосма средняя численность мезофилов составляла $(1,22 \pm 0,82) \cdot 10^7$ КОЕ/г, психрофилов – $(0,19 \pm 0,03) \cdot 10^7$ КОЕ/г. Что подтверждает вышесказанное, что углеводородокисляющие бактерии более чувствительны к температуре, поскольку доступность углеводов также зависит от температуры.

Таблица 3.2

Численность аммонифицирующих и углеводородокисляющих микроорганизмов (КОЕ/г) в почвенных микрокосмах с разной температурой культивирования

Эколого-трофическая и температурная группа	Дата	Температура микрокосма, °С		
		+5 «холодный» микрососм	+35 «теплый» микрососм	+5 и +35 «переменный» микрососм
Мезофильные аммонифицирующие	29.10.02	$(3,60 \pm 0,45) \cdot 10^7$	$(2,90 \pm 0,04) \cdot 10^7$	$(1,96 \pm 0,03) \cdot 10^7$
	03.04.03	$(4,98 \pm 0,52) \cdot 10^7$	$(1,34 \pm 0,35) \cdot 10^7$	$(149,00 \pm 3) \cdot 10^7$
	01.07.03	$(0,20 \pm 0,11) \cdot 10^7$	$(0,42 \pm 0,15) \cdot 10^7$	$(1,00 \pm 0,15) \cdot 10^7$
	28.07.03	$(0,95 \pm 0,08) \cdot 10^7$	$(1,23 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(2,04 \pm 0,11) \cdot 10^7$
	05.11.03	$(6,57 \pm 0,16) \cdot 10^7$	$(1,02 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(0,69 \pm 0,06) \cdot 10^7$
Психрофильные аммонифицирующие	29.10.02	$(2,20 \pm 0,37) \cdot 10^7$	$(1,10 \pm 0,30) \cdot 10^7$	$(1,60 \pm 0,31) \cdot 10^7$
	03.04.03	$(3,20 \pm 0,41) \cdot 10^7$	$(0,75 \pm 0,20) \cdot 10^7$	$(158,49 \pm 3) \cdot 10^7$
	01.07.03	$(3,83 \pm 0,47) \cdot 10^7$	$(0,11 \pm 0,08) \cdot 10^7$	$(0,40 \pm 0,15) \cdot 10^7$
	28.07.03	$(2,55 \pm 0,12) \cdot 10^7$	$(0,49 \pm 0,10) \cdot 10^7$	$(1,40 \pm 0,09) \cdot 10^7$
	05.11.03	$(0,60 \pm 0,06) \cdot 10^7$	$(0,59 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(0,3 \pm 0,04) \cdot 10^7$
Мезофильные углеводородокисляющие	29.10.02	$(1,82 \pm 0,11) \cdot 10^7$	$(1,32 \pm 0,24) \cdot 10^7$	$(1,18 \pm 0,08) \cdot 10^7$
	03.04.03	$(2,11 \pm 0,12) \cdot 10^7$	$(1,33 \pm 0,09) \cdot 10^7$	$(1,85 \pm 0,1) \cdot 10^7$
	01.07.03	$(0,17 \pm 0,03) \cdot 10^7$	$(0,18 \pm 0,01) \cdot 10^7$	$(0,25 \pm 0,02) \cdot 10^7$
	28.07.03	$(1,35 \pm 0,09) \cdot 10^7$	$(2,59 \pm 0,12) \cdot 10^7$	$(1,14 \pm 0,08) \cdot 10^7$
	05.11.03	$(1,92 \pm 0,04) \cdot 10^7$	$(0,68 \pm 0,06) \cdot 10^7$	$(0,75 \pm 0,04) \cdot 10^7$
Психрофильные углеводородокисляющие	29.10.02	$(0,17 \pm 0,03) \cdot 10^7$	$(0,04 \pm 0,01) \cdot 10^7$	$(0,13 \pm 0,01) \cdot 10^7$
	03.04.03	$(1,12 \pm 0,08) \cdot 10^7$	$(0,38 \pm 0,04) \cdot 10^7$	$(2,10 \pm 0,11) \cdot 10^7$
	01.07.03	$(0,05 \pm 0,02) \cdot 10^7$	$(0,14 \pm 0,01) \cdot 10^7$	$(0,09 \pm 0,02) \cdot 10^7$
	28.07.03	$(1,03 \pm 0,08) \cdot 10^7$	$(0,38 \pm 0,05) \cdot 10^7$	$(0,47 \pm 0,06) \cdot 10^7$
	05.11.03	$(0,04 \pm 0,01) \cdot 10^7$	$(0,03 \pm 0,01) \cdot 10^7$	$(0,04 \pm 0,02) \cdot 10^7$

Таким образом, независимо от температуры культивирования численность мезофильных аммонифицирующих и углеводородокисляющих

микроорганизмов в исследуемой почве выше. За исключением аммонификаторов «холодного» микрокосма, где численность психрофильных и мезофильных достоверно не отличалась. В среднем численность углеводородокисляющих была на порядок ниже, чем аммонифицирующих. Уровень численности (уровни стабилизации (Кожевин, 1989)), который устанавливался в исследуемой почве, для аммонификаторов составлял 10^7 КОЕ/г, а углеводородокисляющих – 10^6 КОЕ/г. С течением времени отмечалось увеличение доли углеводородокисляющих от 0,4 до 0,5, что, вероятно, связано с истощением питательных субстратов, которые разрушаются легче, чем углеводороды нефти.

Следующая задача заключалась в сравнении численности микроорганизмов внутри одной температурной группы в «теплом» и «холодном» микрокосмах. Выявили, что длительное культивирование при низких температурах приводит к увеличению численности психрофильных аммонифицирующих и углеводородокисляющих микроорганизмов с достоверностью $P=0,97$ и $0,94$, соответственно (критерий Вилкоксона). Средняя численность психрофильных аммонификаторов в «теплом» микрокосме составляла $(1,24 \pm 2,5) \cdot 10^7$ КОЕ/г, в то время как в «холодном» – $(3,0 \pm 0,6) \cdot 10^7$ КОЕ/г, углеводородокисляющих – $(0,19 \pm 0,03) \cdot 10^7$ КОЕ/г и $(0,48 \pm 0,3) \cdot 10^7$ КОЕ/г, соответственно. Культивирование микрокосма при постоянной низкой температуре ($+5^\circ\text{C}$) приводило к увеличению численности психрофильных микроорганизмов в 2 – 5 раза. Таким образом, для экосистем с постоянной низкой температурой, целесообразно оценивать численность психрофильных микроорганизмов, участвующих в процессах очищения. Средняя численность аммонификаторов в «холодном» микрокосме составляла $(3,26 \pm 1,2) \cdot 10^7$ КОЕ/г, в теплом – $(1,38 \pm 0,92) \cdot 10^7$ КОЕ/г, однако однофакторный дисперсионный анализ не показал достоверность отличий ($P > 0,05$). Относительно углеводородокисляющих также не фиксировались отличия по численности в «холодном» и «теплом» микрокосмах.

Помимо этого в эксперименте отмечалось значительное увеличение численности микроорганизмов всех исследуемых групп в микрокосме, который культивировался при переменных температурах. Через 3 месяца здесь наблюдалось увеличение численности на 2 – 3 порядка относительно «холодного» и «теплого» микрокосма. Однако в дальнейшем численности здесь достоверно не отличались (табл. 3.2). На данный факт хочется обратить внимание, поскольку в природе температура колеблется иногда в очень больших пределах и биологические сообщества имеют способность быстро реагировать на эти изменения. Для естественных микробных сообществ переменные условия более «привычны», о чем и свидетельствовало увеличение численности. В дальнейшем это, видимо, привело к дефициту биогенных элементов в микрокосмах, и, как следствие, к последующему снижению численности. Возможно, периодическое внесение биогенов позволило бы поддерживать численность на высоком уровне.

Таким образом, анализ численности микроорганизмов в «холодном» и «теплом» микрокосмах, показал, что в целом численность мезофильных аммонифицирующих и углеводородоокисляющих выше, чем психрофильных. При этом в условиях постоянных низких температур, численность психрофильных увеличивается в 2-5 раз.

3.3 Динамика численности микроорганизмов в почвенных микрокосмах при внесении карбамидоформальдегидного полимера

Один из основных факторов, ограничивающих биологическое окисление поллютанта в почве – дефицит кислорода. Это особо актуально при биоремедиации нефтезагрязненных почв, поскольку углеводороды – восстановленные соединения и для их окисления требуется кислород. Выше говорилось о часто используемых приемах, позволяющих увеличить аэрируемость почв, в числе которых называют и рыхление (Зубайдуллин, 1998). К недостаткам рыхления относят то, что оно требует применения специальной

техники, которая нарушает плодородный слой почвы, при этом, эффект действия кратковременный, т.е. процедуру рыхления нужно неоднократно повторять. В связи с чем, необходим поиск альтернативных решений, позволяющих улучшить аэрируемость нефтезагрязненной почвы, для стимуляции развития аэробной нефтеокисляющей микрофлоры.

Структурообразователи по механизму действия представляют собой вещества, которые влияют на процессы, протекающие на поверхности раздела двух фаз, и тем самым изменяют физические, химические и физико-химические свойства почвы (Кульман, 1982). В лабораторном эксперименте анализировали влияние однократного внесения карбамидо-формальдегидного полимера в качестве удобрения и структурообразователя, как альтернативного рыхлению варианта на численность мезофильных и психрофильных бактерий (*эксперимент 1* в разделе 2.4.1).

Численность мезофильных и психрофильных микроорганизмов в почве с полимером и аэрируемой почве выше, чем в контроле (рис. 3.9 и 3.10).

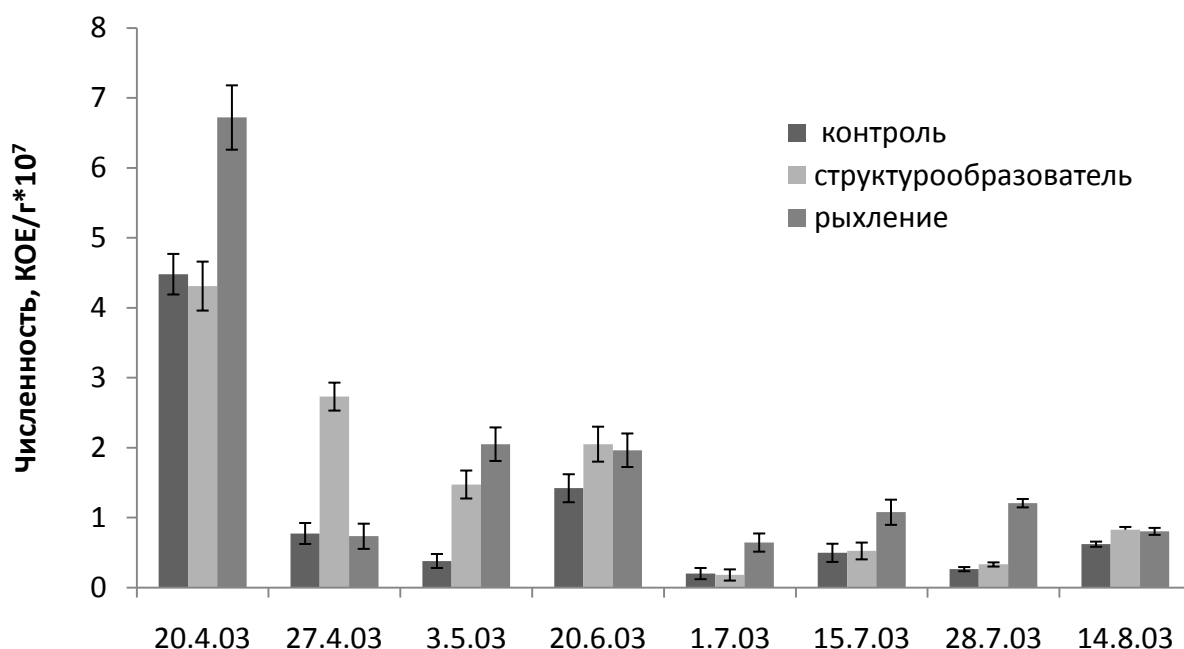


Рисунок 3.9 – Динамика численности мезофильных аммонифицирующих бактерий в почве микрокосмов.

По критерию Вилкоксона достоверность отличий между контролем и микрокосмом, в котором почва аэрировалась, составляет 0,99. Численность микроорганизмов в почве с полимером, в начале эксперимента была близка к аэрируемой почве, а в конце эксперимента она снижалась и приближалась к контролю. В течение всего эксперимента численность микроорганизмов в микрокосме с еженедельным рыхлением была самой большой, однако, в некоторых случаях внесение полимера приводило к более высоким численностям. Однократное внесение полимера в лабораторном эксперименте позволяло заменить 4-5 рыхлений.

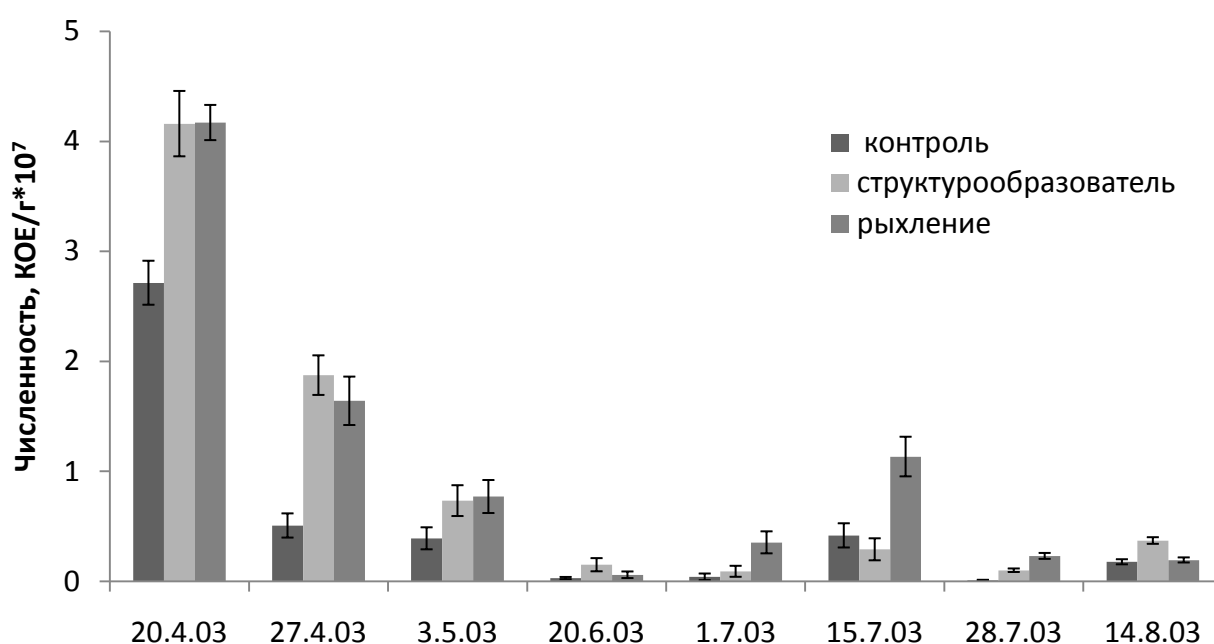


Рисунок 3.10 – Динамика численности психрофильных аммонифицирующих бактерий в почве микрокосмов.

Далее оценивали влияние карбамидоформальдегидного полимера как соединения изменяющего теплофизические свойства почвы. Данный полимер имеет низкий коэффициент теплопроводности 0,023 – 0,03 ккал/м•час•градус (Баронин и др., 2002; Кульман, 1982), его внесение в почву изменяет также ее теплофизические свойства. В лабораторном эксперименте по определению динамики температуры почвы с исследуемым полимером и без него при изменении внешней температуры воздуха на 4°С скорость изменения

температуры почвы составляли 1,0°C и 2,2°C в час, соответственно. Таким образом, внесение карбамидоформальдегидного полимера в почву меняет ее теплофизические свойства. То есть в условиях переменных температур, почва будет медленнее остывать или нагреваться.

Для оценки влияния полимера на численность мезофильных и психрофильных бактерий в условиях переменных температур (имитация сезонных колебаний температуры) проводили эксперимент с почвенными микрокосмами (*эксперимент 2* в разделе 2.4.1). Анализ данных показал, что в микрокосме с полимером численность мезофильных и психрофильных аммонифицирующих микроорганизмов была выше на протяжении всего периода наблюдений с доверительной вероятностью 0,89 (критерий Вилкоксона) (рис. 3.11 и 3.12).

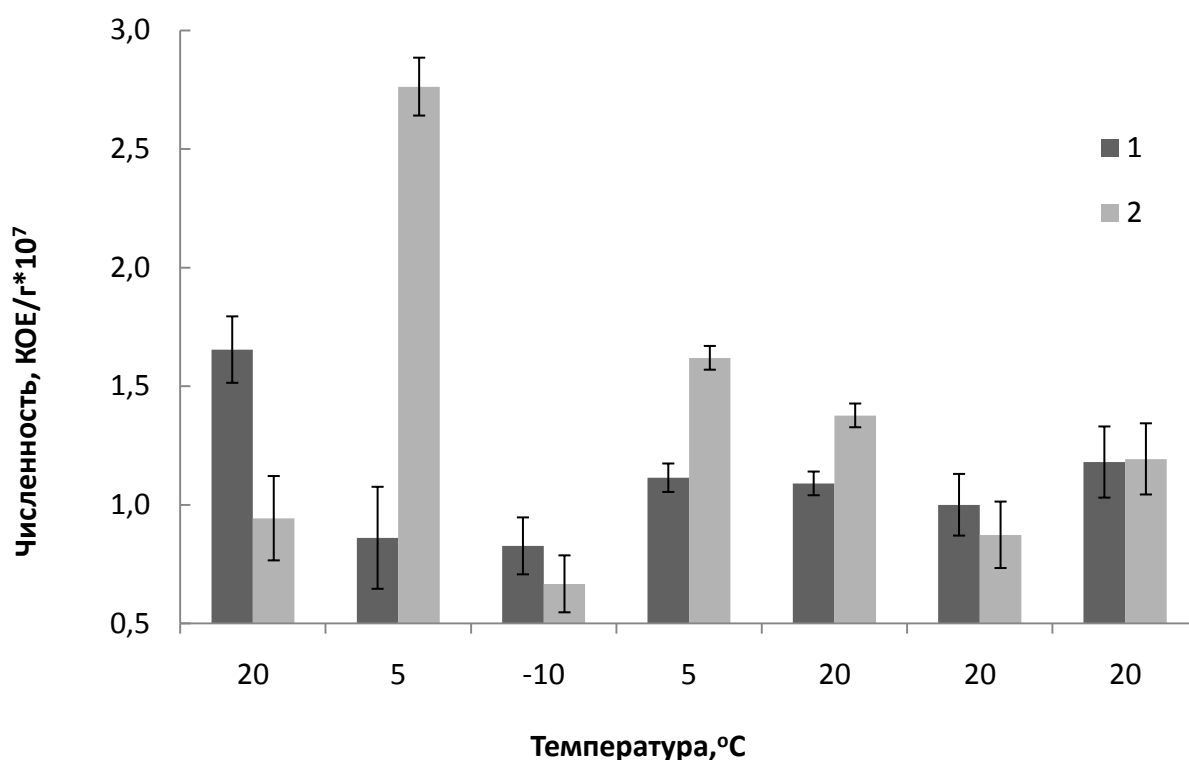


Рисунок 3.11 – Численность мезофильных аммонифицирующих бактерий в почвенных микрокосмах: 1 – контроль, 2 – карбамидоформальдегидный полимер.

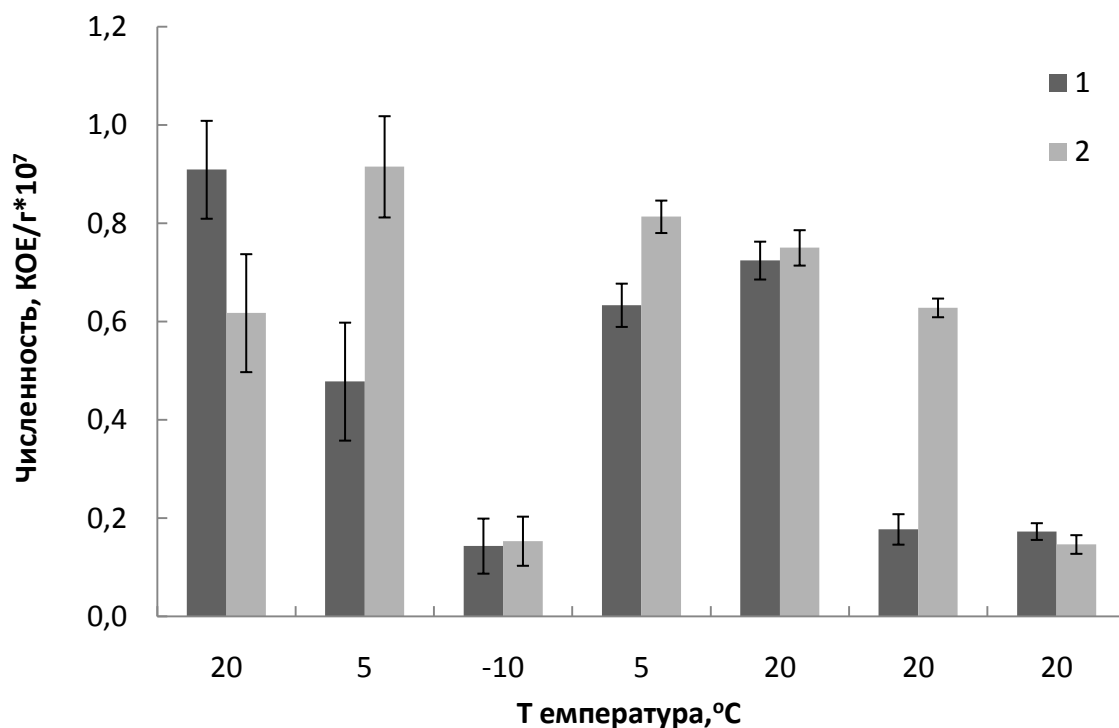


Рисунок 3.12 – Численность психрофильных аммонифицирующих бактерий в почвенных микрокосмах: 1 – контроль, 2 – карбамидоформальдегидный полимер.

Можно отметить, что при уменьшении температуры с +20 до +5°C, численность аммонифицирующих микроорганизмов снижалась в контроле, в то время как присутствие полимера позволило увеличить численность психрофильных и мезофильных микроорганизмов. В точке замораживания численность мезофилов, и психрофилов в обоих вариантах снижалась до минимума, при оттаивании, снова численность микроорганизмов в микрокосме с полимером становилась выше.

Также, в течение всего периода наблюдений, численность углеводородокисляющих микроорганизмов в микрокосмах с полимером была выше (доверительная вероятность 0,98) (рис. 3.13 и 3.14).

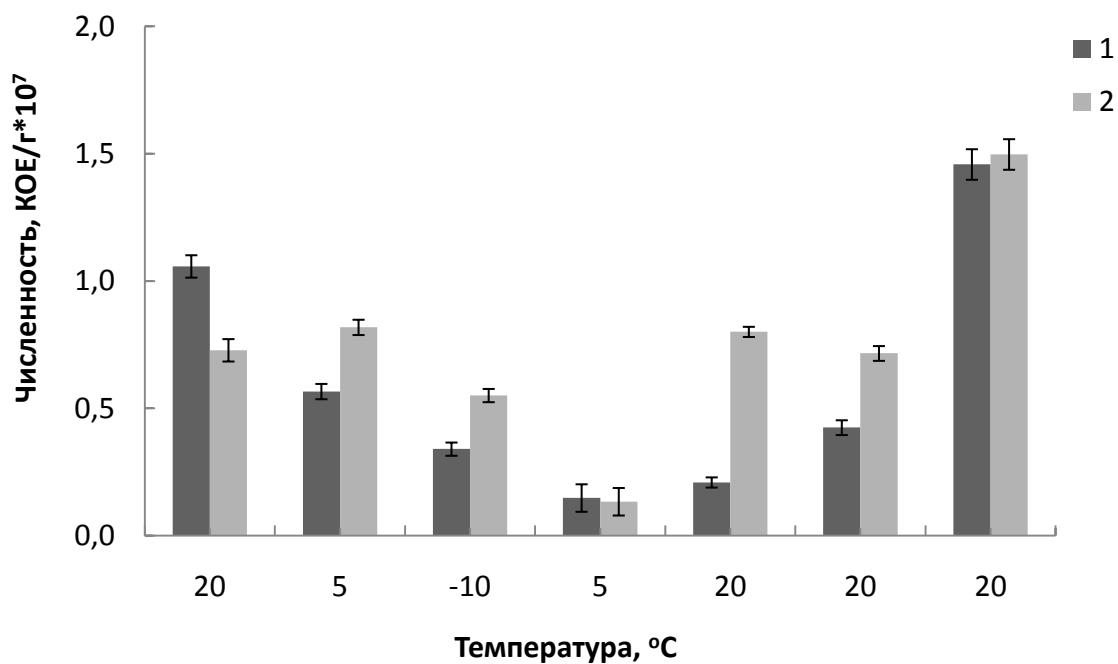


Рисунок 3.13 – Влияние внесения карбамидоформальдегидного полимера на численность мезофильных углеводородокисляющих микроорганизмов. 1 – контроль, 2 – карбамидоформальдегидный полимер.

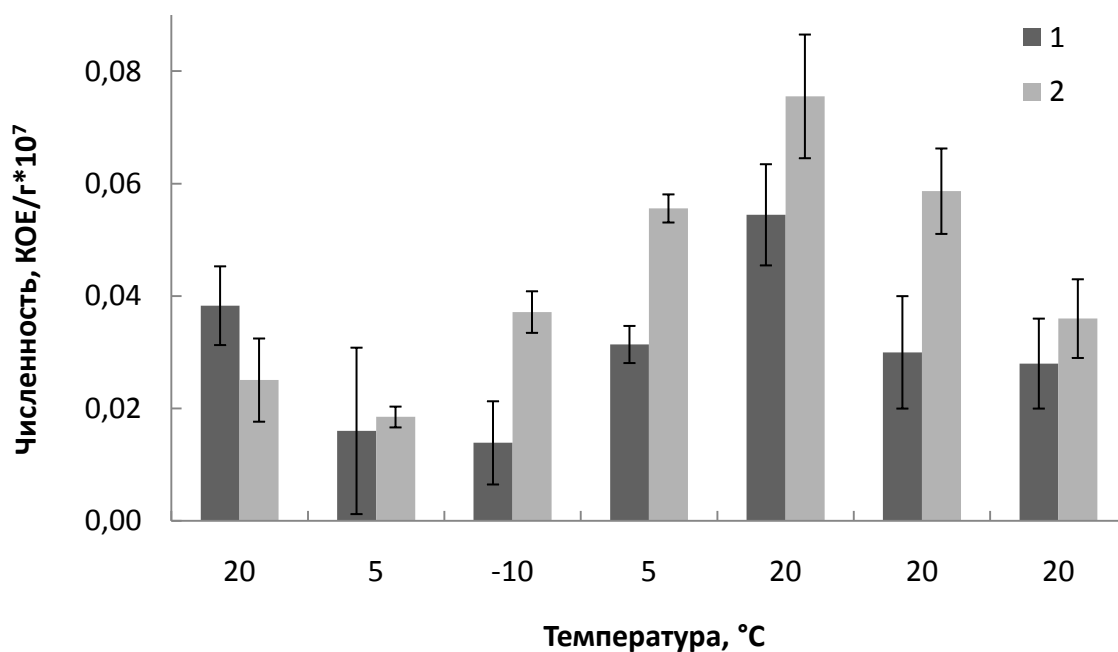


Рисунок 3.14 – Влияние внесения карбамидоформальдегидного полимера на численность психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов. 1 – контроль, 2 – карбамидоформальдегидный полимер.

Таким образом, коррекция условий среды с помощью карбамидоформальдегидного полимера, в качестве структурообразователя и удобрения пролонгированного действия, позволяет поддерживать численность микроорганизмов нефтезагрязненной почвы на более высоком уровне. Карбамидоформальдегидный полимер влияет на воздушные и теплофизические свойства нефтезагрязненной почвы, поддерживая более благоприятные условия для развития автохтонной психрофильной и мезофильной микрофлоры.

3.4 Стимуляция автохтонной микрофлоры в нефтезагрязненной почве *in situ*

Полевой эксперимент проводили на участке загрязненном в результате аварийного разлива нефти. Схема внесения реагентов и ассоциаций микроорганизмов в почву опытных площадок представлена в таблице 2.2. Основная задача эксперимента состояла в оценке возможности увеличения в нефтезагрязненной почве численности автохтонных микроорганизмов, корректируя условия их развития с помощью карбамидоформальдегидного полимера и мела (Трусей и др., 2016). Также анализировали эффективность биоаугментации, для чего в нефтезагрязненную почву вносили ассоциации микроорганизмов.

На момент исследования концентрация нефти на опытных площадках варьировала в диапазоне от 97 г/кг до 167 г/кг почвы в течение всего эксперимента. Это связано с тем, что опытные площадки располагались в нижней части (по уровню) загрязненной территории. Поэтому стимулирование микрофлоры происходило в условиях продолжающегося поступления нефти и сохранения большой концентрации ее на протяжении длительного периода времени, что нередко имеет место. В этой ситуации концентрация нефти не может служить адекватным показателем идущих в почве процессов восстановления, и более информативным становится определение динамики численности углеводородокисляющих микроорганизмов.

На протяжении всего периода наблюдений численность исследуемых групп микроорганизмов на обработанных площадках была выше, чем контрольной. В целом данные по численности исследуемых эколого-трофических групп микроорганизмов (с ошибками измерения) в образцах почвы экспериментальных площадок приведены в приложении 3.

В наибольшей степени обработка почвы стимулировала рост углеводородокисляющих микроорганизмов, численность которых на обработанных площадках была выше на 1-2 порядка по отношению к контрольной. Данные о средней численности мезофильных и психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов на обработанных участках №№1 – 4, а также контрольном участке №5 представлены на рисунках 3.15 и 3.16.

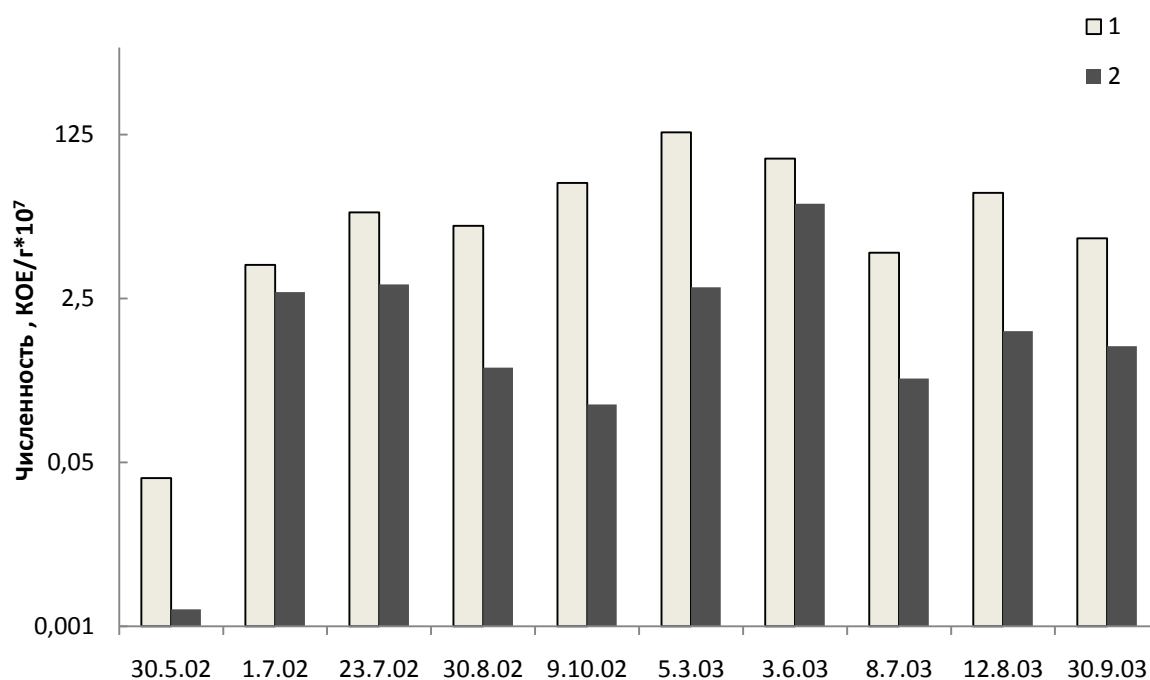


Рисунок 3.15 – Изменение численности мезофильных углеводородокисляющих микроорганизмов: 1 – среднее по площадкам №№ 1-4; 2 – контрольная площадка № 5.

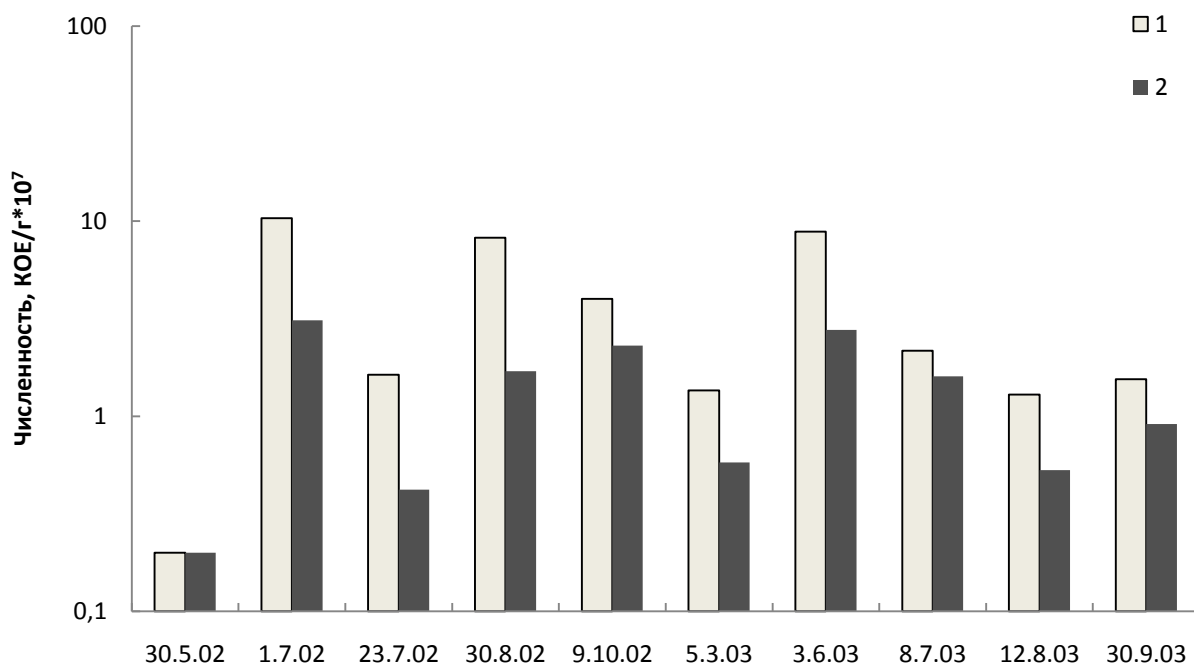


Рисунок 3.16 – Динамика численности психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов: 1 – среднее по площадкам №№ 1-4; 2 – контрольная площадка № 5.

Результаты исследования показывают, что простые биоремедиационные приемы позволяют увеличить численность микроорганизмов на 2-3 порядка. Средняя численность мезофильных углеводородокисляющих микроорганизмов на площадках №№1 – 4 возросла с $2,8 \cdot 10^5$ до $1,95 \cdot 10^8$ КОЕ/г (рис. 3.15), а психрофильных – с $2,0 \cdot 10^5$ до $1,9 \cdot 10^7$ КОЕ/г (рис. 3.16). Эффект от стимулирования стал еще более заметным через год после обработки, численность углеводородокисляющих микроорганизмов увеличилась на 3 – 4 порядка, численность аммонификаторов достигла $4,92 \cdot 10^9$ КОЕ/г.

При этом значительное увеличение численности всех групп микроорганизмов за исключением психрофильных, окисляющих углеводороды, отмечается в марте, когда почва еще замерзшая. Это связано с эффектом оттаивания замерзшей почвы, при котором происходит десорбция большей части микроорганизмов с частичек почвы (Кряжевских и др., 2012). Однако у

психрофильных микроорганизмов, окисляющих углеводороды, такой эффект не отмечался, что, вероятно, связано с более низкой скоростью их размножения.

Влияние исследуемых способов обработки загрязненной почвы на численность микроорганизмов было неодинаково. Наибольшее положительное влияние отмечается при внесении карбамидоформальдегидного полимера, внесение мела угнетало развитие почвенной микрофлоры. Интродукция оказывала положительное влияние на одну эколого-трофическую группу микроорганизмов почвы.

Положительное влияние карбамидоформальдегидного полимера на развитие почвенных микроорганизмов отмечено в течение всего эксперимента. Это следует из сравнения динамики их численностей на площадке №2 и обработанных полимером площадках №№1, 3 и 4 (рис. 3.17 и 3.18).

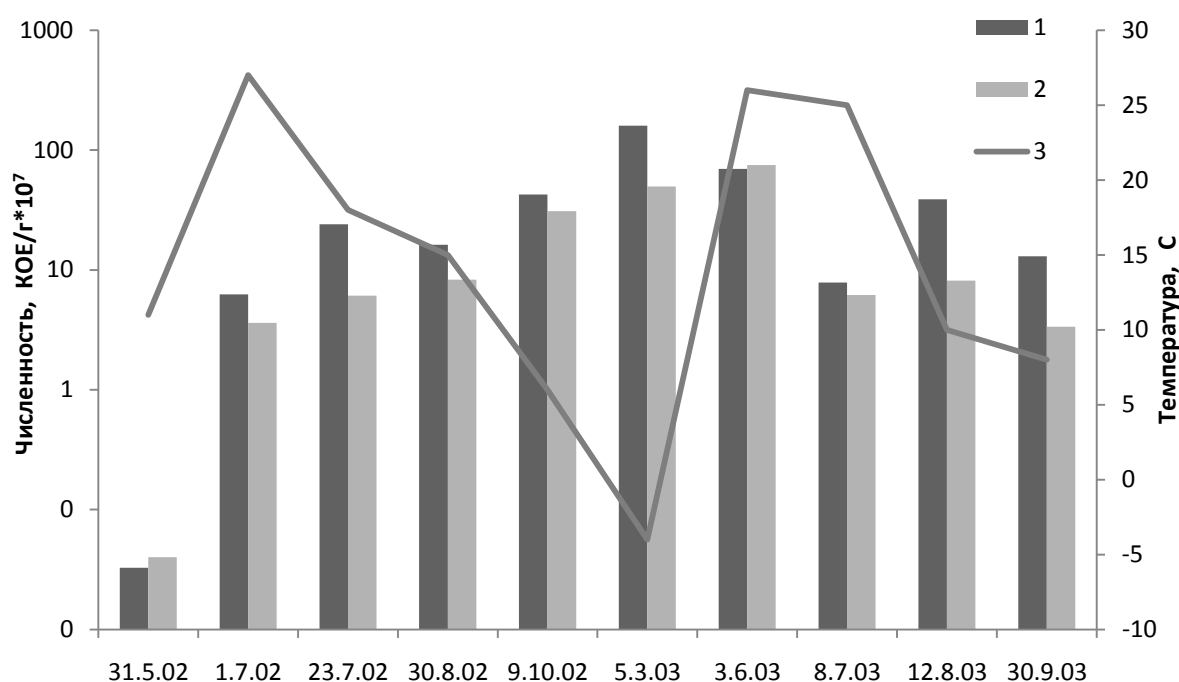


Рисунок 3.17 – Влияние карбамидоформальдегидного полимера на численность мезофильных углеводородокисляющих микроорганизмов: 1 – среднее по площадкам №№1, 3, 4 (с полимером); 2 – площадка №2 (без полимера); 3 – температура почвы на глубине 5 см.

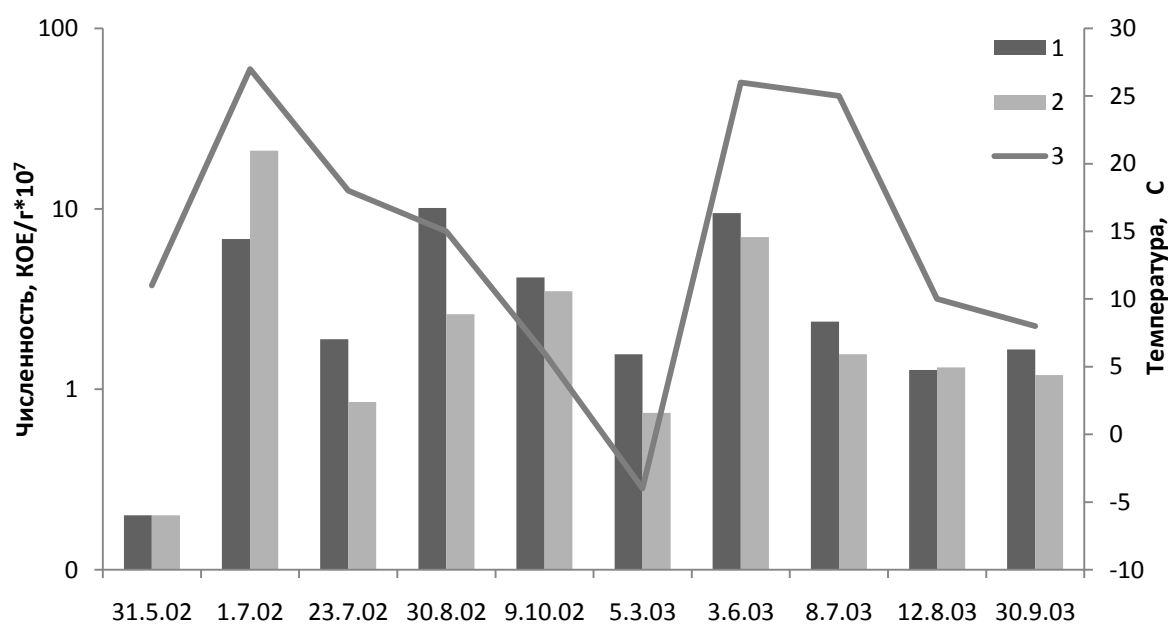


Рисунок 3.18 – Влияние карбамидоформальдегидного полимера на численность психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов: 1 – среднее по площадкам №№1, 3, 4 (с полимером); 2 – площадка №2 (без полимера); 3 – температура почвы на глубине 5 см.

В целом, анализ показал, что психрофильные микроорганизмы более чувствительны к изменениям температуры в почве. Увеличение температуры сопровождалось увеличением численности психрофилов, однако при температуре почвы более 25°C, численность психрофилов снижалась. Это вероятно происходило за счет облигатных психрофилов. Присутствие карбамидоформальдегидного полимера в почве, позволило микроорганизмам достичь более высоких численностей (рис. 3.19). С наступлением холодного времени года снижение численности микроорганизмов на площадках с полимером было меньше, чем на площадке №2. Такой эффект от обработки вызван тем, что полимер изменяет теплофизические свойства почвы.

Внесение мела в почву хорошо известный агротехнический прием. Авторы ряда работ отмечают положительное влияние этой обработки на развитие автохтонной микрофлоры нефтезагрязненной почвы, особенно в северных регионах, где почвы характеризуются низкими значениями рН (Зубайдуллин, 2003). На исследуемой почве подобный эффект обнаружен не

был. Динамика численностей углеводородокисляющих мезофилов на площадке №3 (без мела) и на обработанных мелом площадках №№1, 2 и 4 показана на рисунке 3.16. На начальном этапе внесение мела сказалось отрицательно на развитии углеводородокисляющих мезофилов и психрофилов. То же самое наблюдалось в отношении общей численности аммонификаторов. Этот вывод можно сделать с доверительной вероятностью 0,95 или 0,90 (Критерий Вилкоксона) для мезофилов и психрофилов, соответственно. Вероятно, при внесении мела в почвенном растворе появлялся свободный кальций, который связывал необходимый микроорганизмам фосфат-ион (Robertson and Alexander, 1992).

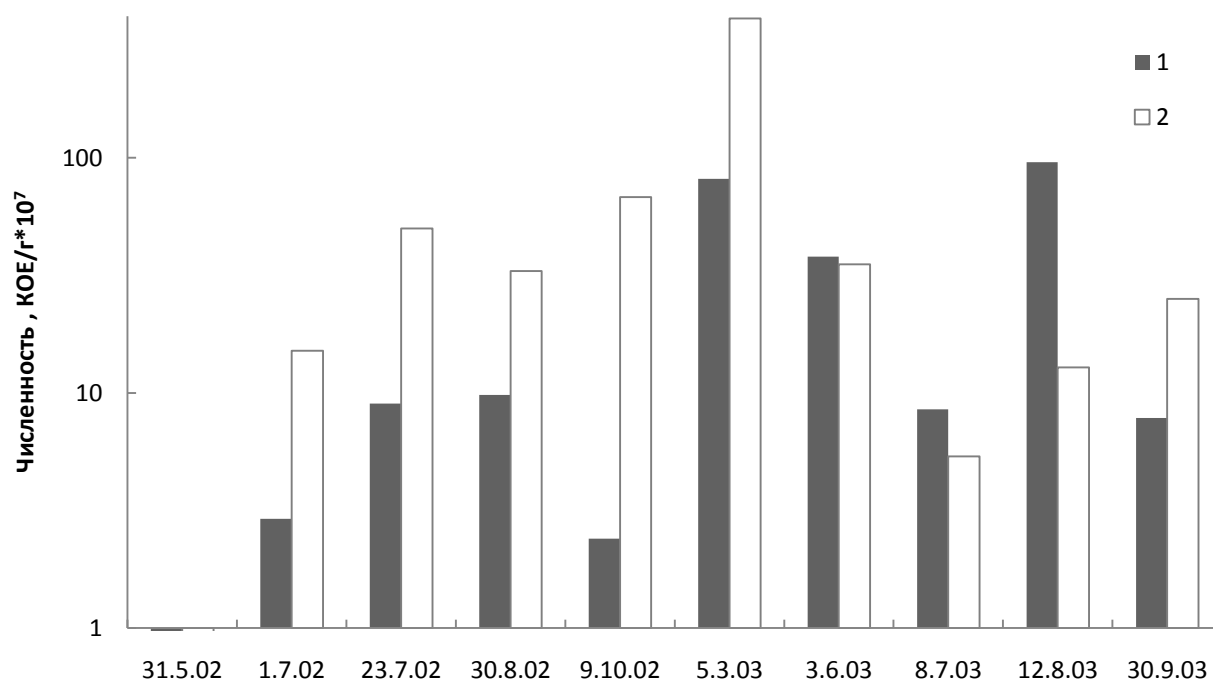


Рисунок 3.19 – Влияние мела на численность мезофильных углеводородокисляющих микроорганизмов: 1 – среднее по площадкам №№1, 2, 4 (с мелом); 2 – площадка №3 (без мела).

В целом кислотность почвы на исследуемых площадках в начале вегетационного периода (и эксперимента) составляла около 6 единиц рН. В последующий период на всех участках наблюдалось повышение. На

кислотность почвы повлияло также внесение мела. Так, через месяц рН почвы на участке без внесения мела (№3) была несколько ниже (6.0), чем в почве с мелом (6.5 – среднее по площадкам №№1, 2 и 4). В конце сезона (через 3-4 месяца от начала эксперимента) рН на участке без мела – 7.4, в то время как в почве с мелом 7.7. Именно в этот период времени отмечается более низкая численность исследуемых групп микроорганизмов на участках с мелом. Этот вывод можно сделать с доверительной вероятностью 0,95 или 0,90 (Критерий Вилкоксона) для мезофилов и психрофилов, соответственно.

Для оценки эффективности ассоциации №2 сравнивали численности микроорганизмов на площадках №1 и №4. Использование ассоциации №2 с вероятностью 0,98 (критерий Вилкоксона) повлияла только на численность психрофильных аммонификаторов. На численность других эколого-трофических групп эта процедура не оказала значимое влияние. В связи с этим заметим, что одно из наиболее часто применяемых и рекламируемых биоремедиационных мероприятий в нефтезагрязненной почве – внесение микробных препаратов. Однако в обзорной работе Margesin and Schinner (Margesin and Schinner, 1999) отмечается, что это приводит к незначительному уменьшению углеводородного загрязнения (5 – 7%) в бедных азотом и фосфором почвах, а в богатых – положительный эффект вовсе не наблюдается. Для получения регулярного и более положительного эффекта, видимо, необходим детальный анализ условий развития микрофлоры в почве, на которой планируется проведение биоремедиационных работ, и соответствующий подбор интродуцируемых микроорганизмов.

Для оценки разнообразия микробного сообщества использовали индекс Шеннона (Федоров и Гильманов, 1980; Тен Хак Мун, 1983; Simpanen et al., 2016). Данный индекс позволил оценить разнообразие микроорганизмов, имеющих разные скорости роста. Показатели индекса Шеннона по участкам приведены в таблице 3.3. В целом анализ показывает, что нефтяное загрязнение привело к увеличению разнообразия микроорганизмов, имеющих разные скорости роста. Так на фоновой площадке незагрязненной нефтью индекс

Шеннона составлял 0,668, на контрольной площадке, загрязненной нефтью №5 – 0,795. Самое большое разнообразие по Шеннону ($H=0,99$) отмечалось на 4-ом участке, в почву которого вносили мел, полимер и ассоциацию микроорганизмов №2. Самое низкое разнообразие ($H=0,659$) – на участке №3, куда не вносили мел, здесь индекс Шеннона приближается к показателю фоновой почвы. При загрязнении нефтью разнообразие микроорганизмов в экосистеме, в частности почвах может, как снижаться, так и увеличиваться (Колесников и др., 2007). С одной стороны высокое разнообразие положительный показатель, свидетельствующий о стабильности экосистемы, с другой это может свидетельствовать о том, что система не адаптировалась к изменениям.

Таблица 3.3

Оценка разнообразия микроорганизмов верхнего горизонта почвы на опытных площадках по индексу Шеннона

№ площадки	n1	n2	n3	n4	n5	n6	n7	n8	N	H
1	1	-	3	-	-	2	2	5	13	0.748
2	16	7	19	13	34	27	11	51	178	0.778
3	13	3	4	3	14	12	2	30	81	0.659
4	6	2	5	10	20	8	6	64	121	0.99
5	6	6	7	2	10	11	1	30	73	0.795
Незагрязненная почва	8	6	1	-	4	4	-	2	25	0.668

Обозначения: n1, n2, n3... – численность колоний по суткам, N-общая численность колоний на чашке, H - индекс Шеннона.

Чтобы выявить оптимальный способ внесения полимера и оценить его влияние на влажность почвы, был проведен полевой эксперимент на том же нефтезагрязненном объекте (верхний горизонт почвы). Влияние разных способов внесения полимера оценивали на опытных площадках, куда он вносился тремя способами. Схема внесения карбамидоформальдегидного полимера в почву представлена в разделе 2.4.2.

Как известно, основным природным фактором, корректирующим численность почвенных микроорганизмов, является влажность почвы

(Головченко и др., 2004; Звягинцев и Зенова, 2004). На опытных площадках был проведен анализ влажности почвы. Учитывая маленькое расстояние между экспериментальными площадками (менее метра), внесение карбамидоформальдегидного полимера заметно повлияло на водные свойства почвы (рис. 3.20). Достоверные отличия были обнаружены между участком №2-2 и №2-3 ($P < 0,05$). Средняя влажность почвы на участке №2-3 составляла $0,60 \pm 0,07$, а на участке №2-2 – $0,70 \pm 0,08$. Однако, несмотря на максимально значения влажности на участке №2-2, где полимер равномерно перемешивали с почвой, наблюдались резкие перепады влажности почвы. Пики влажности приходились на летний (возможно последождевой) период (8.07.03) и весенний, когда в почве очень много влаги (6.04.04). Далее влажность резко падала, связать это можно с тем, что вскапывание увеличило площадь испарения участка, поэтому вода как быстро впитывалась поверхностью, так и быстро испарялась. Таким образом, перемешивание верхнего слоя почвы с полимером позволяет поддерживать более высокую влажность почвы, однако почва и быстрее теряет влагу.

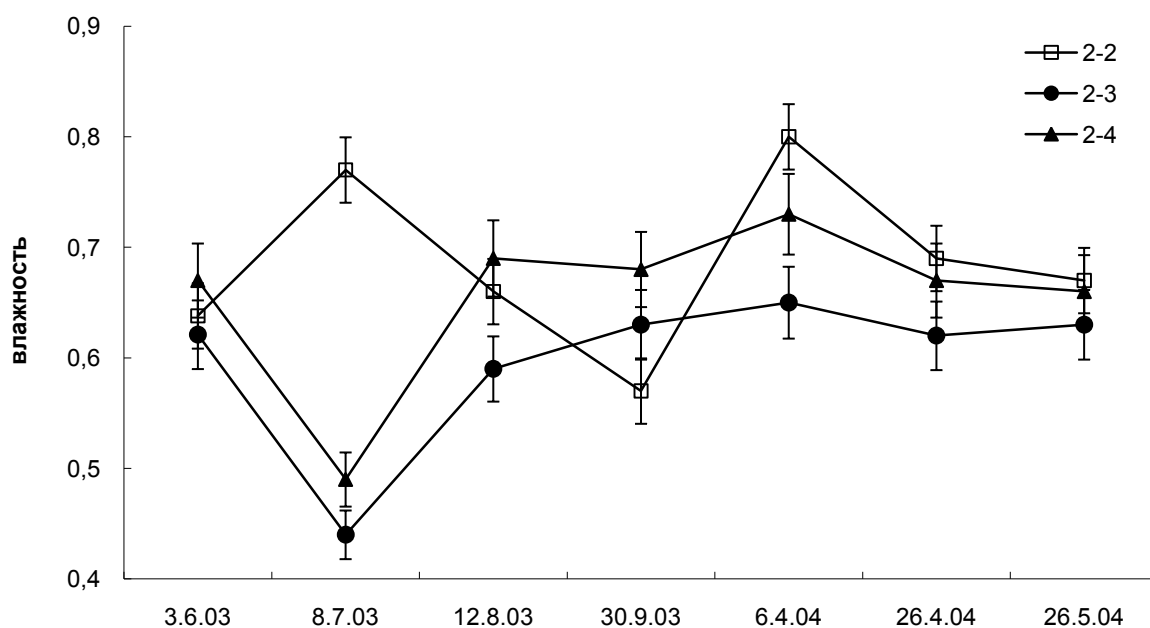


Рисунок 3.20 – Динамика влажности почвы на опытных площадках с разными способами внесения карбамидоформальдегидного полимера в почву.

На участке №2-3, где полимер вносили на поверхность, наблюдалась самая низкая влажность почвы. Вероятно, полимер сорбировал влагу из почвы и испарял ее. На участке № 2-4 средняя влажность воздуха составляла $0,66 \pm 0,08$ и в течение всего периода наблюдений была выше, чем на участке №2-3. То есть, полимер, находящийся внутри почвы, позволял удерживать влагу.

Самые высокие численности микроорганизмов также фиксировались на участке №2-2 в периоды, когда влажность почвы была максимальной. На этом участке численность углеводородокисляющих мезофилов и психрофилов была достоверно ($P < 0,05$) выше на порядок, чем на участке №2-3 (рис. 3.21).

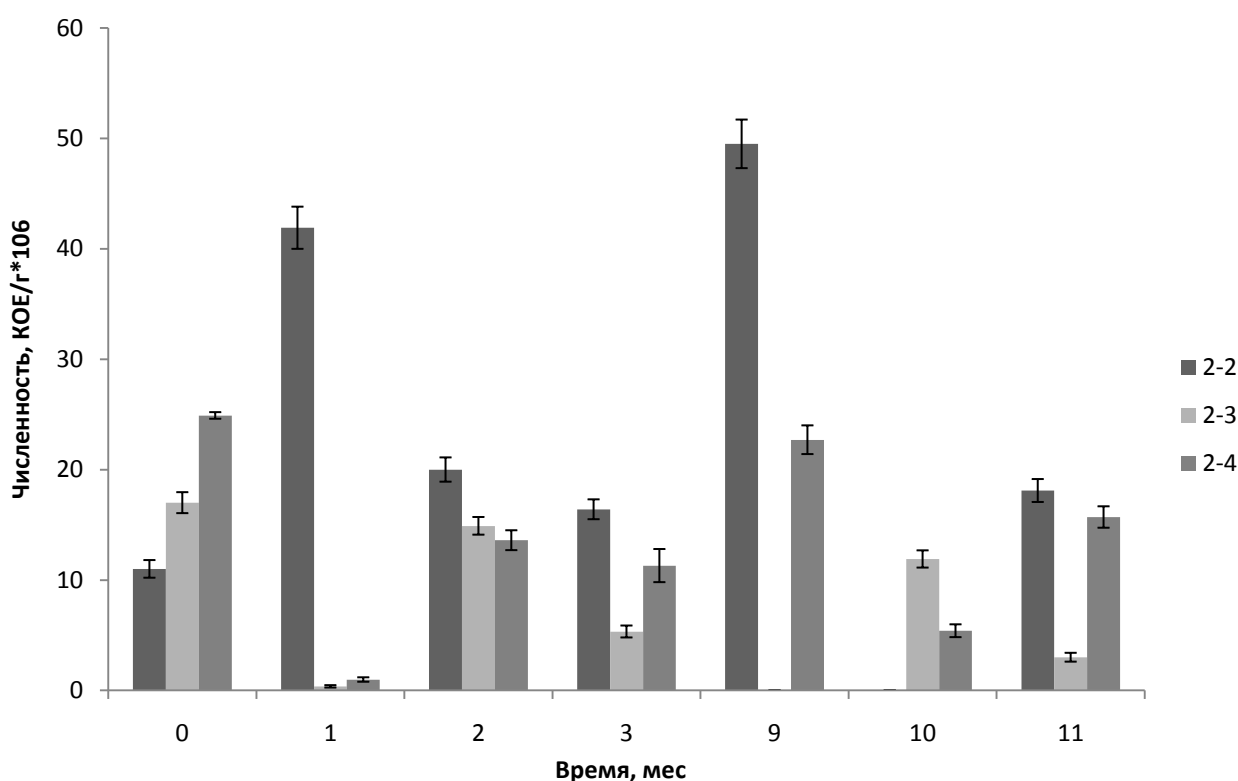


Рисунок 3.21 – Динамика численности мезофильных углеводородокисляющих микроорганизмов в почве опытных площадок с разными способами внесения карбамидоформальдегидного полимера.

Средняя численность углеводородокисляющих мезофилов на площадке №2-2 составляла $(2,25 \pm 0,65) \cdot 10^7$ КОЕ/г, а на участке №2-3 $(5,91 \pm 2,69) \cdot 10^6$ КОЕ/г, а психрофилов $(1,36 \pm 0,63) \cdot 10^7$ КОЕ/г и $(9,7 \pm 3,3) \cdot 10^6$ КОЕ/г, соответственно (3.21). На участке №2-4 численность углеводородокисляющих

мезофилов также была ниже, чем на №2-2, но достоверно выше, чем на №2-1 (по критерию Вилкоксона $P=0,92$). Отличия в численности психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов обнаружены не были.

Что касается численности аммонифицирующих бактерий. Достоверные различия в численности наблюдались только между участком №2-2 и №2-4, на участках №2-2 и №2-3 обнаружены не были. На участке №2-2 численность бактерий была выше с доверительной вероятностью для мезофильных аммонификаторов 0,85 и психрофильных – 0,95 (Шараф и др., 1989) (рис. 3.22).

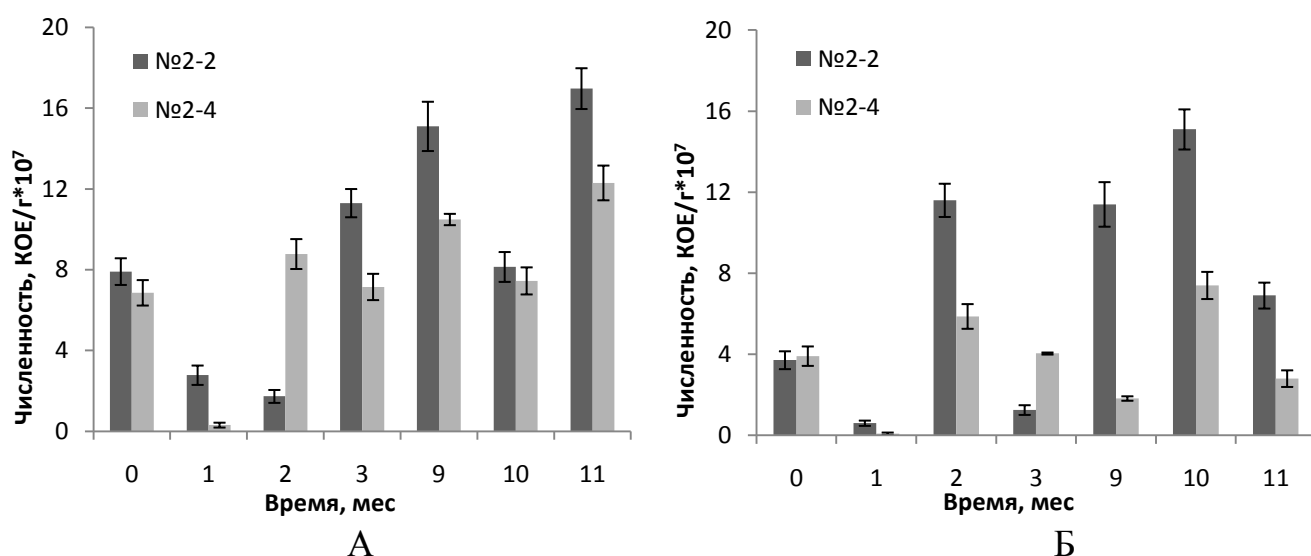


Рисунок 3.22 – Динамика численности мезофильных (А) и психрофильных (Б) аммонифицирующих бактерий в почве опытных площадок №2-2 и №2-3.

В целом, численность микроорганизмов была выше на тех участках, где карбамидоформальдегидный полимер находился внутри почвенного профиля. Здесь же отмечалась и более высокая влажность почвы. При этом максимальная численность была на том, участке, где верхний слой был вскопан, и, соответственно поступление кислорода в почву было лучше. Как известно, при разливе нефть на поверхности образует пленку, которая препятствует диффузии кислорода вглубь почвы и тем самым, лимитируется развитие автохтонной микрофлоры. При проведении биоремедиационных работ, аэрируемости и влажности почвы необходимо уделять внимание в первую очередь. Тем не менее, если биоремедиационные мероприятия проводятся в

сильно обводненных экосистемах, то более всего подходит способ №2-3, при котором наблюдалась самая низкая влажность почвы.

Таким образом, в исследуемой почве присутствует микробное сообщество, способное к биодegradации углеводородного загрязнителя в широком диапазоне температур. В образцах исследуемой почвы, загрязненной сырой нефтью, уже через месяц численность психрофильных и мезофильных углеводородокисляющих микроорганизмов была достаточно высокой и составляла $10^5 - 10^6$ КОЕ/г и $10^6 - 10^7$ КОЕ/г, соответственно. В целом, сравнительный анализ показывает, что, не смотря на преобладающую низкую температуру в регионе, численность мезофильных микроорганизмов исследуемых эколого-трофических групп выше, чем психрофильных примерно на порядок. При этом в условиях постоянных низких температур, отмечается увеличение численности психрофильных микроорганизмов в 2-5 раз, в части случаев она становится сопоставимой с численностью мезофильных. В основном (93,7%) cold-adapted микрофлора исследуемого почвенного горизонта представлена психротрофными формами, способными к росту в широком диапазоне температур.

Хорошо известный факт, что внесение биогенных элементов позволяет стимулировать развитие автохтонных микроорганизмов (биостимуляция) (Коронелли, 1996; Adams et al., 2015). В настоящей работе помимо, биогенных элементов исследовали возможность карбамидоформальдегидного полимера (используемого на практике в качестве сорбента нефти и удобрения пролонгированного действия), стимулировать развитие микробного сообщества в нефтезагрязненной почве. В целом, стимулирование привело к увеличению численности микроорганизмов исследуемых эколого-трофических групп на 2 – 4 порядка.

ГЛАВА 4. СТИМУЛЯЦИЯ АВТОХТОННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ IN SITU В ГРУНТАХ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЕПРОДУКТАМИ

В настоящем нефть и углеводороды – один из распространенных поллютантов не только почвенных экосистем, но и грунтов. В значительной степени углеводородами загрязнены грунты и подземные воды в районе крупных городов, особенно под промышленными объектами. При биоремедиации таких систем имеется ряд трудностей, связанных с труднодоступностью, низкой температурой среды и ограничением поступления кислорода, биогенных элементов и др. В связи с чем, крайне важна оценка биоремедиационной способности микрофлоры данной экосистемы. И, особенно, оценка способов стимуляции ключевых эколого-трофических групп микроорганизмов, участвующих в деградации углеводородного загрязнения, включая анаэробных.

4.1 Факторы, определяющие распределение микроорганизмов в грунтах

Наличие и соотношение численностей разных функциональных и температурных групп в подземной среде зависит от ряда факторов. Важный фактор, влияющий на численность микроорганизмов – наличие воды. Как отмечают исследователи, основной средой обитания микроорганизмов в грунтах является вода, удерживаемая капиллярными силами в микроскопических порах минералов (Звягинцев, 1987). Ряд исследователей отмечают, что в обводненном грунте доля закрепленных микроорганизмов составляет 96 – 99 % (Holm et al., 1992; Franzmann et al., 2002). При исследовании образцов грунта на территории ТЭЦ отмечается, что в грунтах и грунтовых водах присутствуют все исследуемые аэробные и анаэробные группы микроорганизмов. Однако порядок численностей отличен. Например, в воде численность аммонификаторов была ниже, чем в образцах грунта на 1 порядок, т.е. в зоне насыщения основная доля клеток находится в закрепленном

состоянии (табл. 4.1). В связи с чем, особое значение для распределения бактерий в грунтах имеют гидрогеологические свойства породы.

Таблица 4.1

Численность аммонифицирующих бактерий в грунтах зон аэрации и грунтовых водах, загрязненных углеводородами (территория мазутного хозяйства ТЭЦ)

Место отбора пробы	Тип	Численность аммонифицирующих, КОЕ/г	
		мезофильных	психрофильных
Грунты зоны насыщения	закрепленные	$(2,40 \pm 0,22) \cdot 10^6$	$(1,94 \pm 0,20) \cdot 10^6$
Грунтовая вода (скв. 238)	свободные	$(4,00 \pm 0,09) \cdot 10^5$	$(5,74 \pm 0,34) \cdot 10^5$
Грунтовая вода (скв. 589)	свободные	$(8,80 \pm 0,13) \cdot 10^5$	$(1,55 \pm 0,06) \cdot 10^5$

Второй важный фактор, влияющий на распределение микроорганизмов в грунтах – окислительно-восстановительный потенциал среды (Крайнов и др., 2004; Водяницкий, 2011). Он определяет наличие аэробных и анаэробных зон, и, соответственно, активность аэробных и анаэробных групп микроорганизмов. Поэтому в зонах аэрации и насыщения в зависимости от концентрации органических загрязнений, проницаемости грунта, скорости фильтрации грунтовых вод и активности микроорганизмов происходит пространственное распределение областей аэробных и анаэробных процессов биоремедиации (Margesin et al., 2008; Трусей и др., 2009). В подземных системах роль анаэробных бактерий в процессах биоремедиации возрастает. В анаэробной области в зависимости от окислительно-восстановительного потенциала среды бактерии используют в качестве акцепторов электронов нитрат, железо (III), сульфат и уголекислоту для разложения органических соединений в процессах денитрификации, железо- и сульфатредукции, метаногенеза, соответственно (Крайнов и др., 2004; Margesin et al., 2008; Водяницкий, 2011). При этом химический состав грунтовых вод и активность различных эколого-трофических групп взаимосвязаны (Крайнов и др., 2004).

При исследовании геологической среды, загрязненной в результате утечки нефтепродуктов, выявили, что в грунтах, происходит спонтанное развитие аэробной и анаэробной углеводородокисляющей микрофлоры. Несмотря на неблагоприятный кислородный режим, численность аэробных

бактерий достаточно высока – 10^7 КОЕ/г, т.е. сопоставима с численностью на поверхности. Наличие аэробов свидетельствует о том, что скорость потока воды в исследуемых грунтах, достаточно высока, чтобы доставлять на большую глубину растворенный кислород и биогенные элементы.

Грунты имеют низкую температуру среды, которая в течение года изменяется в узких пределах $+4 - +8$ °С, в связи с чем, представляют естественную эконишу для психрофильных микроорганизмов. Анализ показал, что в грунтах численность психрофилов, в отличие от поверхностного почвенного горизонта этой же климатической зоны, сравнима с численностью мезофилов, а в нижнем горизонте на порядок выше (рис. 4.1). Таким образом, психрофилы играют одну из ключевых ролей в биоремедиации загрязненных нефтью грунтов.

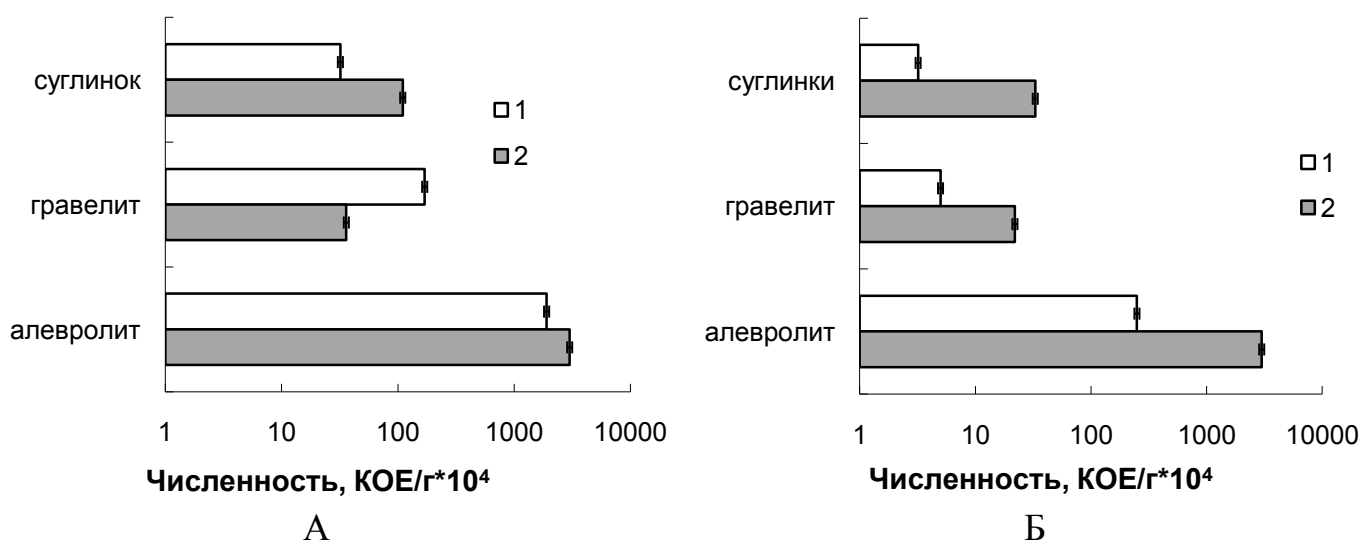


Рисунок 4.1 – Распределение аммонифицирующих (А) и углеводородокисляющих (Б) микроорганизмов в грунтах хранилища нефтепродуктов: 1 – мезофильные, 2 – психрофильные.

Помимо биохимических особенностей самих микроорганизмов, которые выбирают наиболее благоприятную экологическую нишу, на их распределение в грунтах влияют гидрогеологические свойства несущей породы. Особую роль среди таких свойств играют пористость, проницаемость грунта, коэффициент

фильтрации, поскольку они определяют скорость потока инфильтрационной воды в породе и степень закрепления микробных клеток на поверхности минеральных частиц.

Для оценки распределения микроорганизмов в грунтах, анализировали породы находящиеся в зоне аэрации – суглинки и породы зоны насыщения – гравелит и алевролит. Анализ показал, что суглинки зоны аэрации характеризуются, в основном, низкой численностью всех групп микроорганизмов, что можно объяснить неблагоприятными условиями обитания: в зоне аэрации нет скоплений гравитационных вод, в которых обитают микроорганизмы. Численность мезофильных аммонификаторов составляла $(3,2 \pm 0,3) \cdot 10^5$ КОЕ/г, психрофильных – $(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^6$ КОЕ/г. Численность углеводородокисляющих была на порядок ниже, мезофильных – $(3,2 \pm 0,3) \cdot 10^4$ КОЕ/г, психрофильных – $(3,3 \pm 0,3) \cdot 10^5$ КОЕ/г (рис. 4.1).

Наиболее высокая численность всех изучаемых аэробных групп микроорганизмов наблюдалась в алевролитах на глубине 13,0 – 15,0 м (рис. 4.1). В отличие от гравелитов, которые также находятся в зоне насыщения, алевролиты обладают минимальной проницаемостью и низким коэффициентом фильтрации (0,00023 м/сут, см. табл. 2.1). Поэтому в гравелитах, имеющих больший коэффициент фильтрации (0,0033 м/сут) и более высокую скорость движения подземных вод, возможен вынос клеток микроорганизмов фильтрационным потоком. Численность микроорганизмов в гравелитах на порядок ниже, чем в алевролитах.

Еще одной особенностью нефтезагрязненных грунтовых систем является большая доля углеводородокисляющих бактерий относительно общего числа гетеротрофов. Как правило, в почвенных незагрязненных биоценозах доля нефтедеструкторов составляет 0,1% (Шкидченко и Аринбасаров, 2002), в нефтезагрязненных системах увеличивается до 10% от общей численности гетеротрофных (Atlas, 1995; Назаров, 2013). В обследованных грунтах доля углеводородокисляющих возрастает с глубиной от 30 до 83%. Из чего можно заключит, что окисляемое бактериями органическое вещество в загрязненных

грунтах в основном представлено нефтепродуктами. При этом наиболее высокое содержание нефтепродуктов также наблюдалось в алевролитах и составляло 500 мг/кг (для сравнения в суглинках – 15 мг/кг, в гравелитах – 51 мг/кг), видимо, это также связано с низким коэффициентом фильтрации. В алевролитах численность углеводородокисляющих была на порядок выше, чем в суглинках и гравелитах, и составляла психрофильных – $(3,0 \pm 0,4) \cdot 10^7$ КОЕ/г, мезофильных – $(2,5 \pm 0,5) \cdot 10^6$ КОЕ/г.

Также в грунтах анализировали численность анаэробных бактерий – железоредуцирующих и денитрифицирующих. Железоредуцирующие бактерии, в отличие от денитрификаторов встречаются во всех исследуемых образцах, что указывает на их большую распространенность и активность в данной системе (рис. 4.2). Денитрификаторы были обнаружены только в алевролитах, их численность составляла $(8,3 \pm 0,9) \cdot 10^5$ КОЕ/г грунта. Стоит отметить, что в основном, денитрификаторы – это факультативно аэробные микроорганизмы, которые в зависимости от условий в качестве конечного акцептора электронов могут использовать или кислород или нитрат-ион.

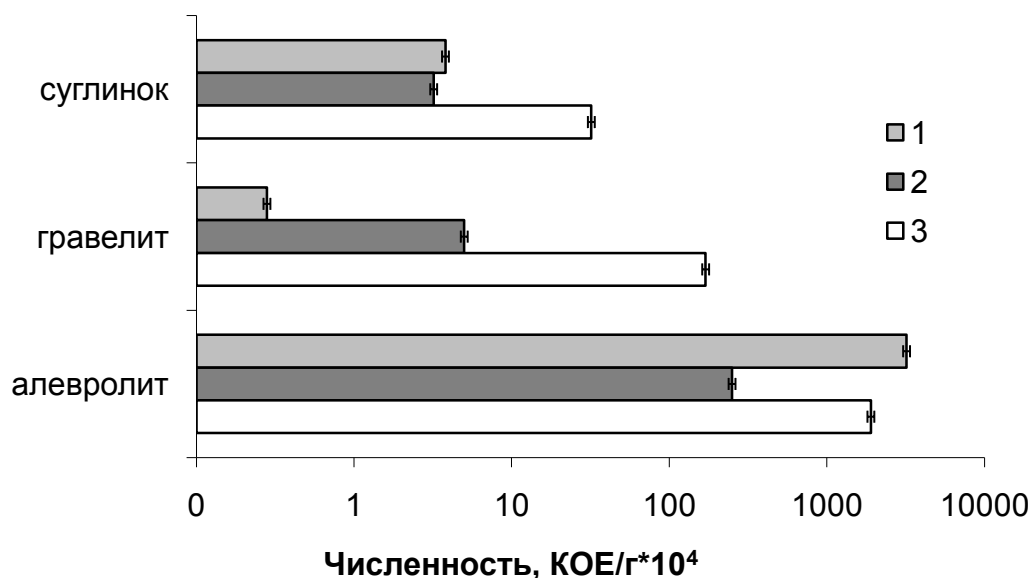


Рисунок 4.2 – Численность мезофильных микроорганизмов в грунтах хранилища нефтепродуктов: 1 – железоредуцирующие, 2 – углеводородокисляющие, 3 – аммонифицирующие.

Сравнительный анализ численности железоредуцирующих и аэробных бактерий показал, что в нижнем горизонте их численности сопоставимы, численность железоредукторов составляет $(3,2 \pm 0,4) \cdot 10^7$ КОЕ/г (рис. 4.2). В данном случае, высокая численность железоредукторов обусловлена, тем, что в состав алевролитов входят гидроокислы железа. Гидроокислы железа являются конечным акцептором электронов для железоредуцирующих бактерий (Водяницкий, 2011).

Таким образом, распределение микроорганизмов в грунтах зависит от ряда показателей среды – температура, окислительно-восстановительный потенциал, гидродинамические свойства породы, наличие субстрата. С глубиной увеличивается численность психрофильных и анаэробных микроорганизмов. Грунты, с определенным размещением пород по профилю, служат своего рода “хроматографической колонкой”, в которой происходит пространственное перераспределение нефтепродуктов и микроорганизмов. Показано, что чем выше скорость фильтрации воды через породу, тем ниже численность микроорганизмов. Максимальная численность микроорганизмов была приурочена к алевролитам, имеющих низкий коэффициент фильтрации. Соответственно при биоремедиации загрязненной геологической среды необходимо стимулировать и аэробные, и анаэробные группы микроорганизмов.

4.2 Стимуляция автохтонных микроорганизмов в грунтах зоны аэрации

Работу по стимуляции автохтонной микрофлоры грунтов, загрязненных нефтепродуктами проводили на наиболее загрязненном участке территории мазутного хозяйства ТЭЦ. Коэффициент фильтрации исследуемых грунтов колебался в пределах 0,52 – 108 м/сут, что свидетельствует о достаточно высокой скорости фильтрации грунтовых вод в исследуемой зоне. Микробиологический анализ показал, что в грунтах присутствуют разные группы микроорганизмов, которые могут разрушать загрязнение в условиях ограниченного поступления кислорода и низких температур (Ladygina et al.,

2008). Микрофлора исследуемого грунта представлена аэробными аммонифицирующими, в том числе углеводородокисляющими – до 95%, и анаэробными микроорганизмами. Доля анаэробных – денитрифицирующих, железоредуцирующих и сульфатредуцирующих бактерий была существенно меньше. В целом, разнообразие эколого-трофических групп свидетельствовало о возможности удаления из загрязненного грунта нефтепродуктов с помощью микроорганизмов-деструкторов в аэробных и анаэробных условиях.

Изменение численности аэробных бактерий. Биоремедиационные мероприятия включали внесение биогенных элементов питания в геологическую среду через верхний горизонт (0 – 0,5 м) и систему наблюдательных скважин (рис. 2.3). Схема мероприятий представлена в таблице 2.6. На поверхность элементы вносили для того, чтобы стимулировать развитие автохтонной микрофлоры в зоне аэрации. В скважины элементы вносили для стимуляции микрофлоры зоны насыщения. Также предполагалось, что минеральные элементы при изменении уровня грунтовых вод будут транспортироваться из зоны насыщения в зону аэрации. Проведение биоремедиационных мероприятий на загрязненном участке повлияло на численность аэробных микроорганизмов по всей толще грунтов вплоть до зоны насыщения.

Анализ численности психрофильных и мезофильных микроорганизмов в грунтах, показал, что их численности сопоставимы. После внесения биогенных элементов через верхний горизонт, численность аэробных микроорганизмов увеличилась. На начало исследования наиболее высокая численность мезофильных аммонификаторов фиксировалась в верхнем горизонте $(7,27 \pm 0,4) \cdot 10^6$ КОЕ/г, с глубиной наблюдалось незначительное снижение до $(1,81 \pm 0,06) \cdot 10^6$ КОЕ/г (рис. 4.3).

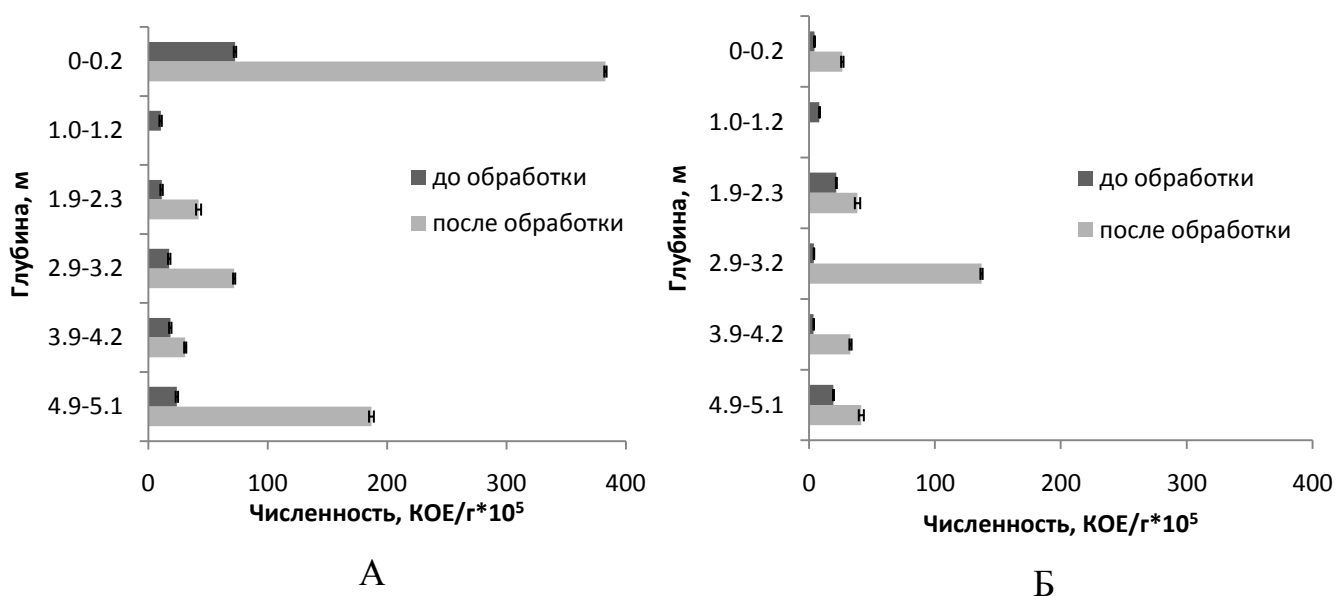


Рисунок 4.3 – Влияние биоремедиационной обработки на распределение мезофильных (А) и психрофильных (Б) аммонифицирующих бактерий в грунтах мазутного хозяйства ТЭЦ.

После обработки грунтов численность мезофильных аммонификаторов увеличилась на порядок, и в верхнем горизонте составляла $(3,83 \pm 1,85) \cdot 10^7$ КОЕ/г (рис. 4.3). Численность психрофильных аммонификаторов после обработки также увеличилась на порядок, на начало исследования их численность колебалась в пределах $10^5 - 10^6$ КОЕ/г, после обработки $10^6 - 10^7$ КОЕ/г.

Анализ образцов грунта на интервале глубин 1 – 5 м показал, что доля углеводородокисляющих от общей численности составляет от 35% до 97,6%. В ответ на внесение минеральных элементов также увеличилась численность мезофильных и психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов с 10^5 КОЕ/г до 10^6 КОЕ/г (рис. 4.4). После проведенной обработки численность психрофильных микроорганизмов стала сопоставимой с мезофильными.

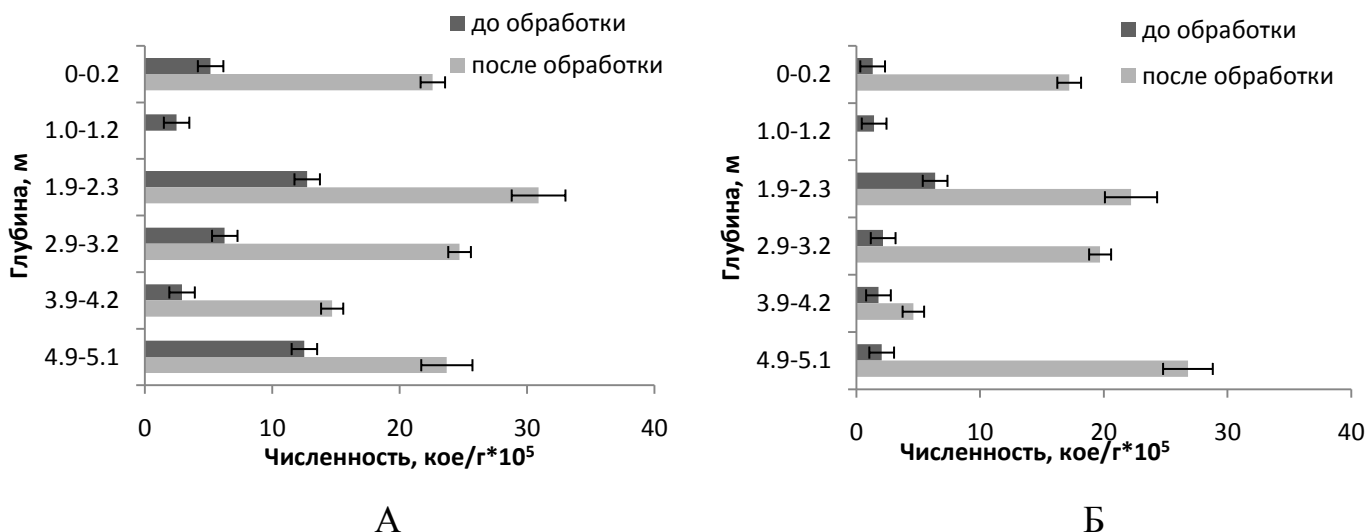


Рисунок 4.4 – Влияние биоремедиационной обработки на распределение мезофильных (А) и психрофильных (Б) углеводородокисляющих микроорганизмов в грунтах мазутного хозяйства ТЭЦ.

Помимо того, что в целом увеличилась численность мезофильных и психрофильных микроорганизмов, изменилось их соотношение. На начальном этапе доля психрофильных аммонификаторов от общего числа аммонификаторов в верхнем горизонте составляла 6%. В нижних горизонтах она увеличивалась до 44 – 66%, далее снова уменьшалась до 18% в зоне насыщения. После внесения биогенов, достоверных отличий по изменению соотношения мезофильных и психрофильных аммонификаторов не обнаружено, в целом фиксировалось незначительное увеличение доли психрофильных. На глубине от 1 – 4 м доля психрофильных аммонификаторов колебалась от 48% до 66%.

Что касается углеводородокисляющих психрофилов, на начальном этапе, их доля от общего числа углеводородокисляющих существенно выше уже на поверхности, она составляла 20%, с глубиной увеличивалась до 38% (рис. 4.5). После внесения минеральных биогенных элементов доля психрофильных углеводородокисляющих увеличилась во всех образцах до 40 – 53%.

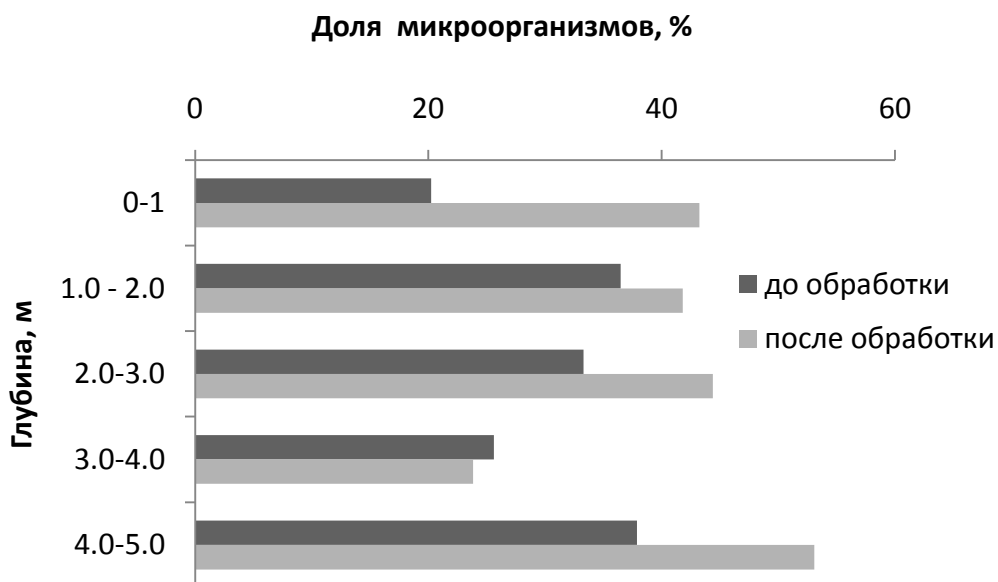


Рисунок 4.5 – Доля психрофильных от общего числа углеводородокисляющих микроорганизмов в грунтах мазутного хозяйства ТЭЦ до и после внесения биогенов.

Таким образом, в грунтах уровень численности психрофильных и мезофильных микроорганизмов различается по глубине. Внесение биогенных элементов питания через верхний горизонт грунтов, увеличило численность всех исследуемых аэробных групп микроорганизмов в зоне аэрации на порядок. При этом наблюдалось увеличение доли психрофильных по отношению к мезофильным: аммонификаторов до 48 – 66%, углеводородокисляющих до 40 – 53%. Такое увеличение доли психрофильных свидетельствует об их большей активности в данной экосистеме.

Изменение численности анаэробных бактерий. В почве мазутного хозяйства возле наблюдательных скважин были обнаружены денитрифицирующие, железоредуцирующие микроорганизмы как мезофильной, так и психрофильной температурных групп. Численности мезофильных денитрификаторов в почве составляла $10^2 - 10^3$ КОЕ/г, они были обнаружены во всех образцах почвы, психрофильные встретились только в двух образцах их численность составляла $10^2 - 10^3$ кое/г. Численность мезофильных железоредуцирующих была того же порядка. Что касается

психрофильных железоредуцирующих, то в образцах почвы они не обнаруживались. При внесении минеральных элементов в почву численность денитрификаторов и железоредуцирующих существенно не изменилась. Это, видимо, связано с тем, что в почве лимитирующим фактором для них служат не биогенные элементы, а кислород. Однако при внесении минеральных биогенных элементов питания в грунты зоны аэрации наблюдалось изменение численности анаэробов. В целом данные по численности бактерий (с ошибками измерения) в образцах грунта мазутного хозяйства ТЭЦ приведены в приложении 4.

Так, анализ численности денитрификаторов на начальном этапе, до проведения обработки, показал, что грунтах присутствуют мезофильные и психрофильные денитрификаторы (рис. 4.6). Численность мезофильных денитрификаторов в грунте составляла порядка $10^3 - 10^4$ КОЕ/г, и с глубиной снижалась. Напротив численность психрофильных с глубиной увеличивалась и составляла $10^4 - 10^5$ КОЕ/г. Более того, с глубиной численность психрофильных микроорганизмов по отношению к мезофильным становилась выше, т.е. в нижних горизонтах ведущая роль принадлежит психрофильным денитрификатором. После проведенной обработки на поверхности загрязненного участка, численность денитрификаторов по всей толще грунтов снизилась на 2 – 4 порядка (рис 4.7). Мезофильные денитрификаторы встречались во всех образцах, их численность составляла 10^2 КОЕ/г, только в зоне насыщения имела тот же порядок численности, что и до обработки $1,15 \cdot 10^4$ КОЕ/г. Сильнее всего на внесение удобрений в отрицательную сторону «среагировали» психрофильные денитрификаторы, их численность снизилась до $10 - 10^2$ КОЕ/г. Можно увидеть, что после обработки в некоторых образцах они вообще не фиксировались.

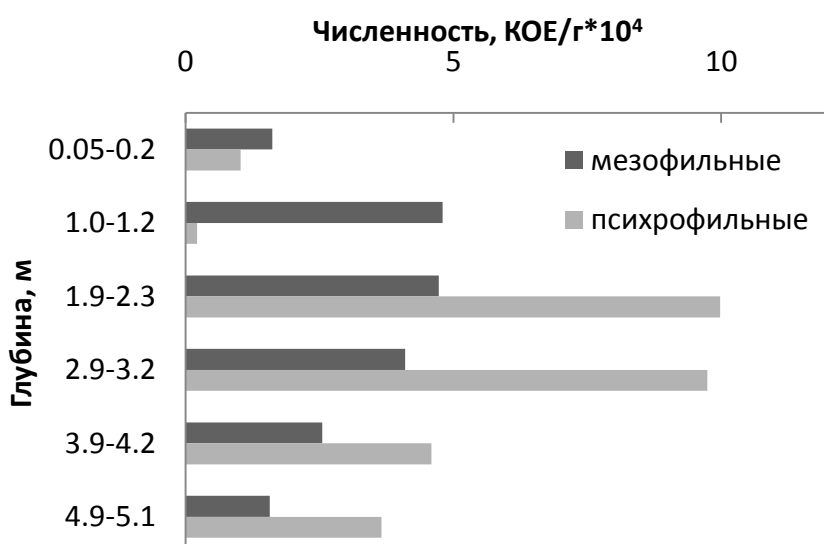


Рисунок 4.6 – Численность денитрифицирующих бактерий в грунтах мазутного хозяйства ТЭЦ до внесения биогенных элементов.

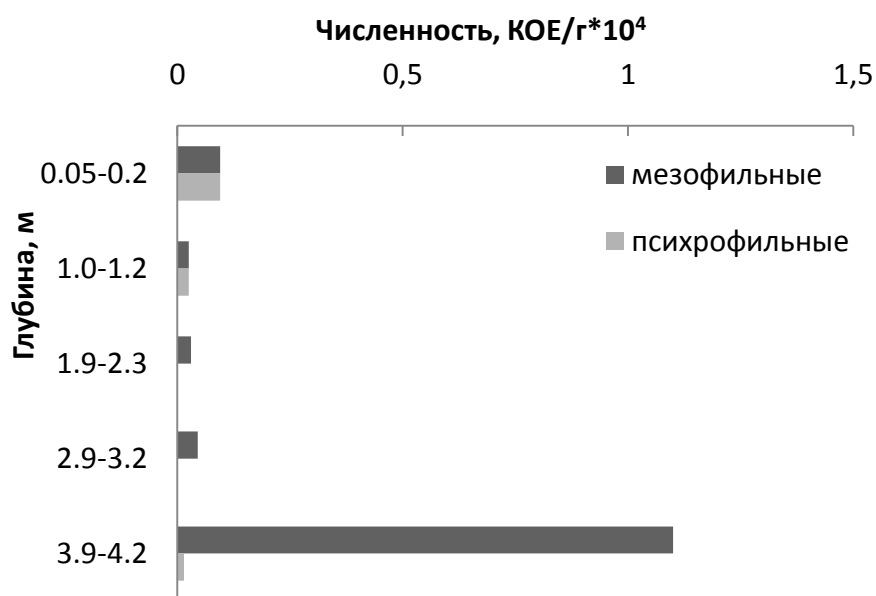


Рисунок 4.7 – Численность денитрифицирующих бактерий в грунтах мазутного хозяйства ТЭЦ после внесения биогенных элементов.

Также анализировали изменение численности железоредуцирующих бактерий (рис. 4.8 и 4.9). На начальном этапе в соотношении численностей мезофильных и психрофильных железоредуцирующих бактерий наблюдалась картина похожая с денитрификаторами. На всех исследуемых глубинах

фиксируются обе группы микроорганизмов, при этом доля психрофильных форм с глубиной увеличивалась. Численность мезофильных и психрофильных железоредуцирующих составляла порядка 10^2 КОЕ/г (рис. 4.8).

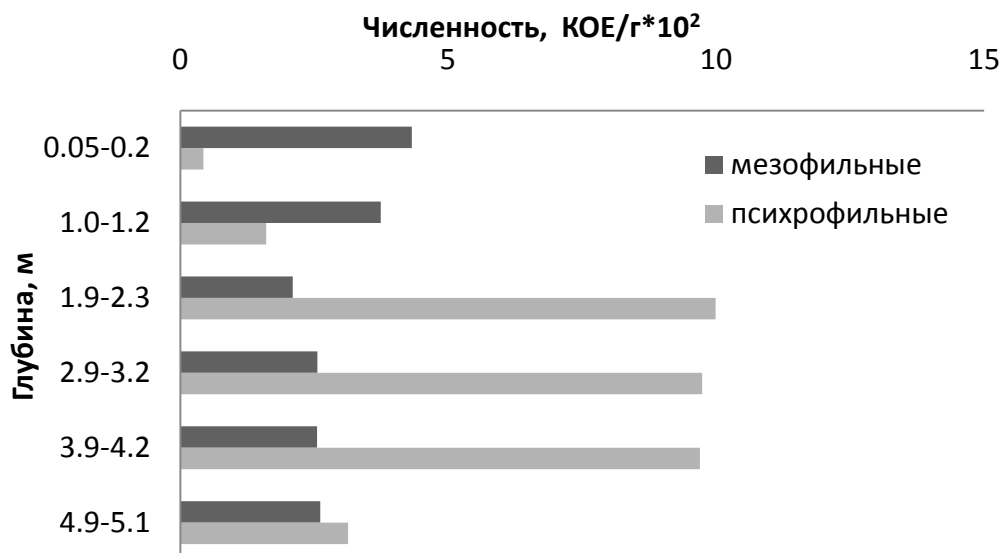


Рисунок 4.8 – Численность железоредуцирующих бактерий в грунтах мазутного хозяйства ТЭЦ до внесения биогенных элементов.

После проведенной обработки произошло увеличение численности мезофильных железоредукторов только в верхнем горизонте, в нижних – численность снизилась на порядок. Что касается психрофильных железоредукторов, они вообще не обнаруживались в грунте после проведенной обработки (рис. 4.9).

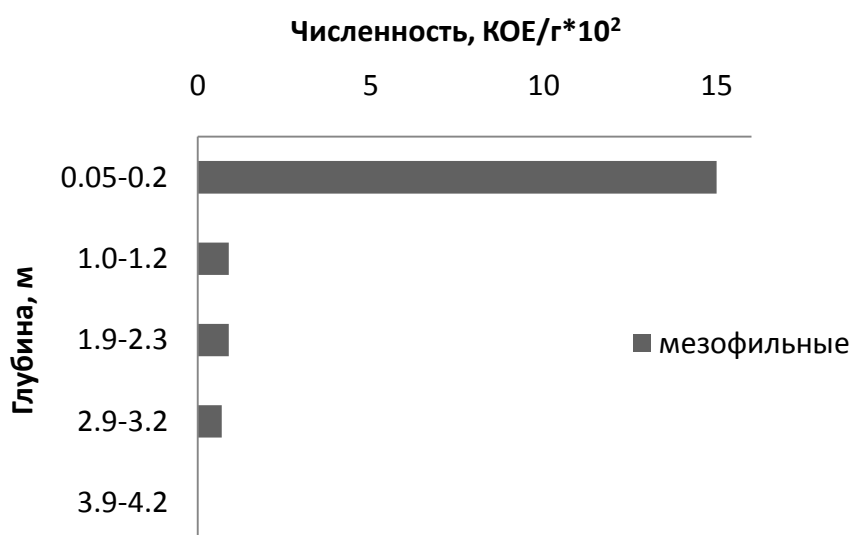


Рисунок 4.9 – Численность железоредуцирующих бактерий в грунтах мазутного хозяйства ТЭЦ после внесения биогенных элементов.

Внесение минеральных элементов также повлияло на численность сульфатредуцирующих бактерий. Их численность немного снизилась, но порядок остался таким же – 10^2 КОЕ/г (рис. 4.10 и 4.11). При этом на начальном этапе численность мезофильных сульфатредукторов была выше или сопоставима с численностью психрофильных, после внесения численность психрофильных преобладала.

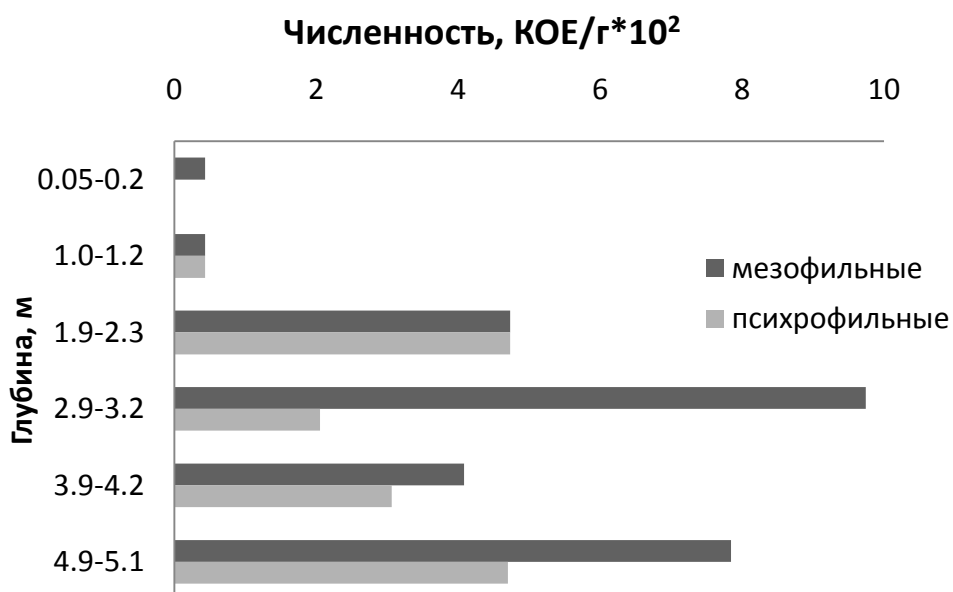


Рисунок 4.10 – Численность сульфатредуцирующих бактерий в грунтах мазутного хозяйства ТЭЦ до внесения биогенных элементов.

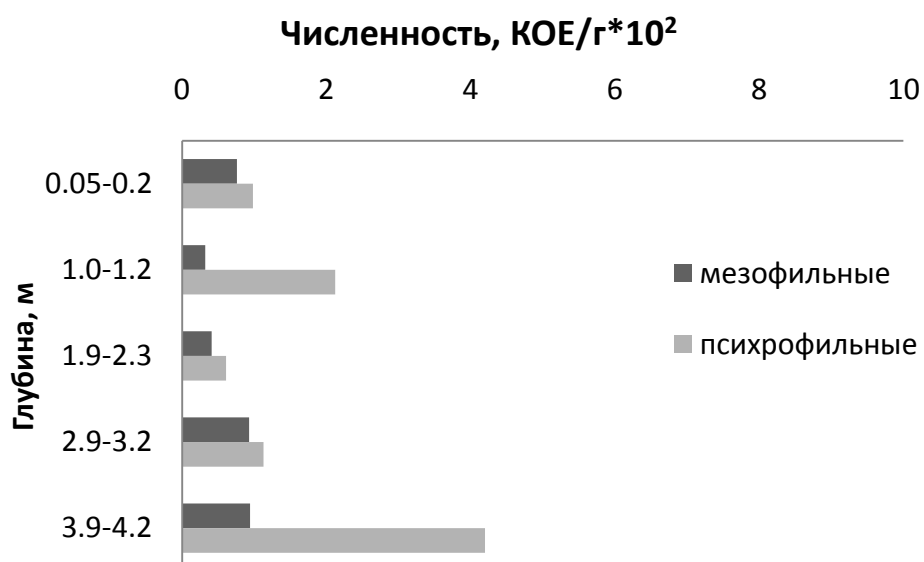


Рисунок 4.11 – Численность сульфатредуцирующих бактерий в грунтах мазутного хозяйства ТЭЦ после внесения биогенных элементов.

Таким образом, внесение биогенных элементов питания в грунты, загрязненные нефтепродуктами, оказывает существенное влияние на численность аэробных и анаэробных микроорганизмов. В данном случае обработка биогенными элементами оказывала положительное воздействие на численность аэробных микроорганизмов, рост которых ограничивался низким содержанием биогенных элементов. При этом в большей степени увеличивалась численность психрофильных. Однако внесение минеральных элементов приводило к снижению в грунтах численности анаэробных бактерий всех исследуемых групп – денитрифицирующих, железоредуцирующих и сульфатредуцирующих. Особенно чувствительны к обработке оказались психрофильные денитрификаторы и железоредукторы. Возможно, уменьшение численности анаэробных бактерий связано с увеличением активности аэробных, что приводило к конкурентному вытеснению анаэробов.

4.3 Стимуляция автохтонных микроорганизмов в грунтовых водах

Динамика численности аэробных микроорганизмов. Предварительный микробиологический анализ, показал, что в грунтовых водах загрязненных нефтепродуктами присутствуют аэробные (аммонифицирующие, углеводородокисляющие) и анаэробные (денитрификаторы и сульфатредукторы) микроорганизмов. Внесение минеральных элементов в грунтовые воды повлияло на численность всех исследуемых групп микроорганизмов.

Также как и в грунтах зоны аэрации, после внесения минеральных элементов численность аммонифицирующих и углеводородокисляющих микроорганизмов увеличилась. В целом данные по численности микроорганизмов (с ошибками измерения) в образцах грунтовой воды из скважины 159 приведены в приложении 5. Наиболее значительный прирост численности всех групп микроорганизмов отмечен в скважине 159 (расположена в зоне максимального загрязнения нефтепродуктами), где была проведена наиболее интенсивная обработка. Уже через два месяца после мероприятий численность мезофильных аммонификаторов увеличилась на порядок с $(1,45 \pm 0,05) \cdot 10^5$ КОЕ/мл до $(13,9 \pm 0,4) \cdot 10^5$ КОЕ/мл (рис. 4.12). Через три месяца численность была выше на 2 порядка, а весной 2006 года составляла $(1,79 \pm 1,04) \cdot 10^8$ КОЕ/мл, т.е. от изначальной численности отличалась на 3 порядка. Изменение численности углеводородокисляющих мезофилов имело тот же характер: через 2 месяца она увеличилась с $(1,26 \pm 0,21) \cdot 10^5$ КОЕ/мл до $(31,6 \pm 18,0) \cdot 10^5$ КОЕ/мл, пик численности также наблюдался через полгода – $(2,31 \pm 1,14) \cdot 10^7$ КОЕ/мл (рис. 4.13).

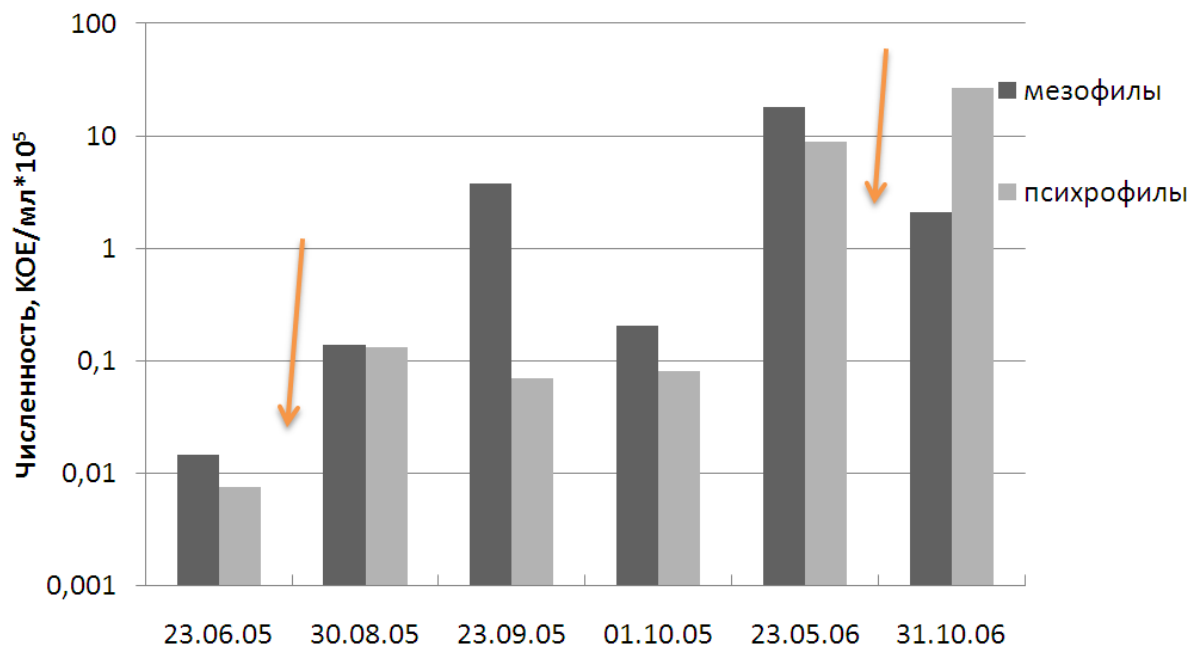


Рисунок 4.12 – Динамика численности мезофильных и психрофильных аммонифицирующих бактерий в грунтовых водах скважины 159 на территории мазутного хозяйства ТЭЦ. (Стрелка – момент внесения биогенных элементов питания).

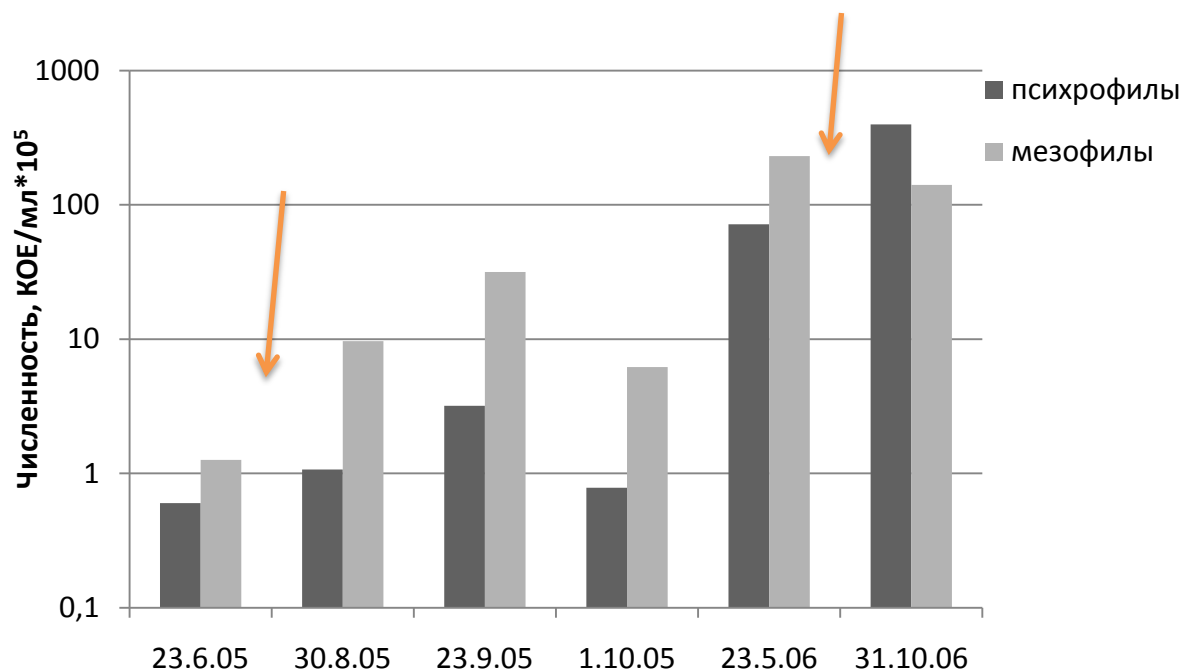


Рисунок 4.13. – Динамика численности мезофильных и психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов в грунтовых воде скважины 159 на территории мазутного хозяйства ТЭЦ. (Стрелка – момент внесения биогенных элементов питания).

Последующее внесение минеральных биогенных элементов питания уже не повлияло на численность мезофильных микроорганизмов. Несмотря на то, что в летне-осенний период 2006 года в скважину 159 продолжали вносить биогенные элементы (в меньшем количестве), численность мезофильных аммонификаторов снизилась до $(2,08 \pm 1,33) \cdot 10^7$ КОЕ/мл, а углеводородокисляющих до $(1,41 \pm 0,9) \cdot 10^7$ КОЕ/мл (рис. 4.12 и 4.13).

Характер динамики численности психрофильных аммонификаторов и углеводородокисляющих отличается от мезофильных. Можно увидеть, что начальное внесение биогенов повлияло на их численность. Численность психрофильных аммонификаторов увеличилась с $(0,74 \pm 0,05) \cdot 10^5$ КОЕ/мл до $(8,86 \pm 4,43) \cdot 10^7$ КОЕ/мл (рис. 4.12). Повторное внесение биогенов продолжало стимулировать рост психрофилов, и к концу биоремедиационных мероприятий, их численность была в 2 раза выше, чем численность мезофилов в пик роста – $(2,67 \pm 0,94) \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Та же динамика наблюдалась и в отношении углеводородокисляющих психрофилов. Численность углеводородокисляющих менялась с $(0,6 \pm 0,32) \cdot 10^5$ КОЕ/мл до $(3,98 \pm 2,83) \cdot 10^7$ КОЕ/мл (рис. 4.13).

Аналогичные наблюдения относительно психрофильных аммонификаторов наблюдались и в других скважинах. На рисунке 4.14 показана динамика изменения численности психрофильных аммонификаторов в грунтовой воде опытных скважин 237, 238, 239 (25.10.05 образцы воды из скважины 238 не отбирались). Можно отметить, что уже первая серия мелиоративных мероприятий 2005 года повлияла на численность бактерий, вторая серия в 2006 году дополнительно стимулировала рост психрофильных аммонификаторов. В воде скважины 237, куда непосредственно вносили биогенные элементы, численность бактерий увеличилась на 2 порядка с $(1,42 \pm 0,7) \cdot 10^4$ КОЕ/мл до $(4,44 \pm 0,74) \cdot 10^6$ КОЕ/мл. При этом отмечалось изменение численности бактерий также в пробах грунтовых вод из скважин, в которые не вносили минеральные элементы. Например, в воде скважины 239, численность аммонификаторов увеличилась на два порядка. Это указывает на постепенное распространение вносимых биогенных элементов с током воды.

После прекращения подпитки в 2007 году наблюдалось снижение численности всех исследуемых групп аэробных микроорганизмов.

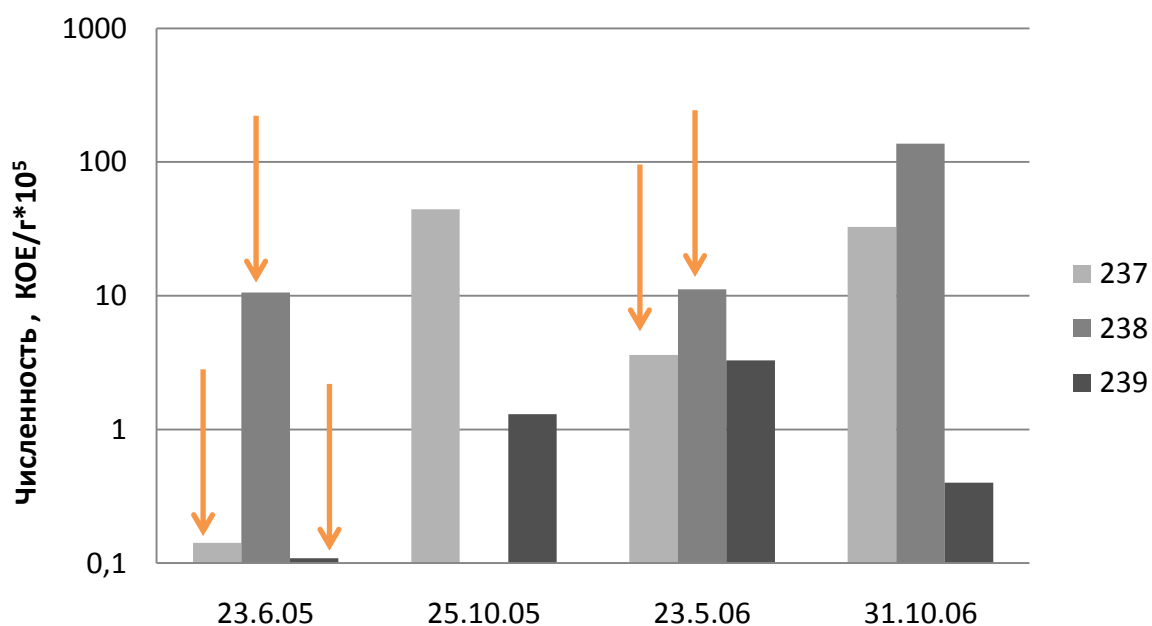


Рисунок – 4.14. Динамика численности психрофильных аммонифицирующих бактерий в грунтовых водах наблюдательных скважин (стрелка – внесение биогенных элементов питания).

Таким образом, изменение численности психрофильных микроорганизмов происходило не синхронно с динамикой численности мезофильных. На фоне обработки психрофильные медленнее реагируют на внесение биогенных элементов питания, однако достигают больших значений численности, чем мезофильные микроорганизмы.

Динамика численности денитрифицирующих бактерий. Численность денитрифицирующих бактерий относительно железоредуцирующих и сульфатредуцирующих в исследуемых грунтовых водах была на 2 – 3 порядка выше и составляла 10^3 – 10^5 КОЕ/мл. В работе анализировали динамику численности денитрифицирующих бактерий двух температурных групп (мезофильные и психрофильные), при внесении биогенных элементов питания. В отличие от грунтов зоны аэрации, где при внесении биогенов численность

денитрификаторов снижалась, в грунтовых водах наблюдалось увеличение их численности. Такие различия, вероятно, связаны с тем, что минеральные соли, вносимые в грунтовые воды, содержали нитрат, который служит конечным акцептором электронов для денитрификаторов.

Численность мезофильных и психрофильных денитрификаторов в грунтовых водах приведена в таблице 4.2. На начальном этапе исследования, мезофильные денитрификаторы в грунтовых водах не фиксировались, в то время как психрофильные обнаруживались во всех образцах воды, что уже свидетельствует об их большей активности, относительно мезофильных. Начальная численность психрофильных денитрификаторов была в пределах от $10 - 10^2$ КОЕ/мл (табл. 4.2). При этом численность психрофильных денитрификаторов изменялась в соответствии с уровнем загрязнения скважины нефтепродуктами. В скважинах, где уровень загрязнения был ниже, численность денитрификаторов была выше. Это известный факт, что денитрификация лимитируется большим количеством органического загрязнения (Rivett et. al., 2008). После внесения биогенных элементов в скважины 159 и 273 численность психрофильных денитрификаторов увеличилась на 1 – 2 порядка и составляла $10^3 - 10^5$ КОЕ/мл. Внесение минеральных элементов также стимулировало развитие мезофильных денитрификаторов, численность которых после обработки составляла $10^4 - 10^5$ КОЕ/мл. Повторное внесение минеральных элементов снова привело к увеличению численности мезофильных и психрофильных денитрификаторов, за исключением скважины № 159, где вероятно численность микроорганизмов достигла своего максимума. При этом увеличение численности на 1-2 порядка также отмечалось в образцах воды из скважин, в которые биогенные элементы непосредственно не вносили. Очевидно, увеличение численности микроорганизмов обусловлено диффузией биогенов в толще поземных вод.

Таблица 4.2

Численность мезофильных и психрофильных денитрифицирующих бактерий в грунтовых водах на территории мазутного хозяйства ТЭЦ (КОЕ/мл)

Температурная группа	№ скважины	Численность / Верхний и нижний пределы, КОЕ/мл•10 ³	Дата отбора образцов воды					
			2005 июнь	2005 октябрь	2006 май	2006 октябрь	2007 март	
мезофильные	159	численность	Н.о*	45,00	0,07	95,00	-	
		верхний нижний	-	9,60 210,60	0,02 0,33	20,00 445,00	-	
	237	численность	Н.о.	200,00	0,15	1,50	0,20	
		верхний нижний	-	42,70 936,00	0,03 0,70	0,32 7,02	0,04 0,94	
	589	численность	Н.о.	-	0,06	0,14	300,00	
		верхний нижний	-	-	0,01 0,28	0,03 0,66	64,00 1404,00	
	588	численность	Н.о.	-.	Н.о.	0,04	7,50	
		верхний нижний	-	-	-	0,01 0,19	1,60 35,10	
	психрофильные	159	Численность	0,06	3,05	350,00	40,00	-
			верхний нижний	0,01 0,28	0,64 14,00	75,00 1638,00	8,60 187,20	-
237		численность	0,20	2,50	0,07	2,50	0,09	
		верхний нижний	0,04 0,94	0,53 11,70	0,02 0,33	0,53 11,71	0,02 0,42	
589		численность	0,09	-	0,45	0,95	2,50	
		верхний нижний	0,02 0,42	-	0,10 2,11	0,20 4,45	0,53 11,70	
588		численность	Н.о.	-	0,09	0,04	0,45	
		верхний нижний	-	-	0,02 0,42	0,01 2,11	0,10 2,10	

*Примечание: Н.о. – не обнаружено, « - » – не определяли.

Для наглядности, данные по численности мезофильных денитрификаторов в скважинах с разной интенсивностью обработки (см. табл. 2.6) представлены также на рисунке 4.15. Отмечается, что в скважине, которая находится на периферии загрязненного участка – 588 (южнее скв. 159 на 70 м, рис. 2.3) увеличение численности (на 1-2) порядка психрофильные и мезофильных денитрификаторов наблюдалось существенно позднее, через 2 года после первоначальной обработки (табл. 4.2).

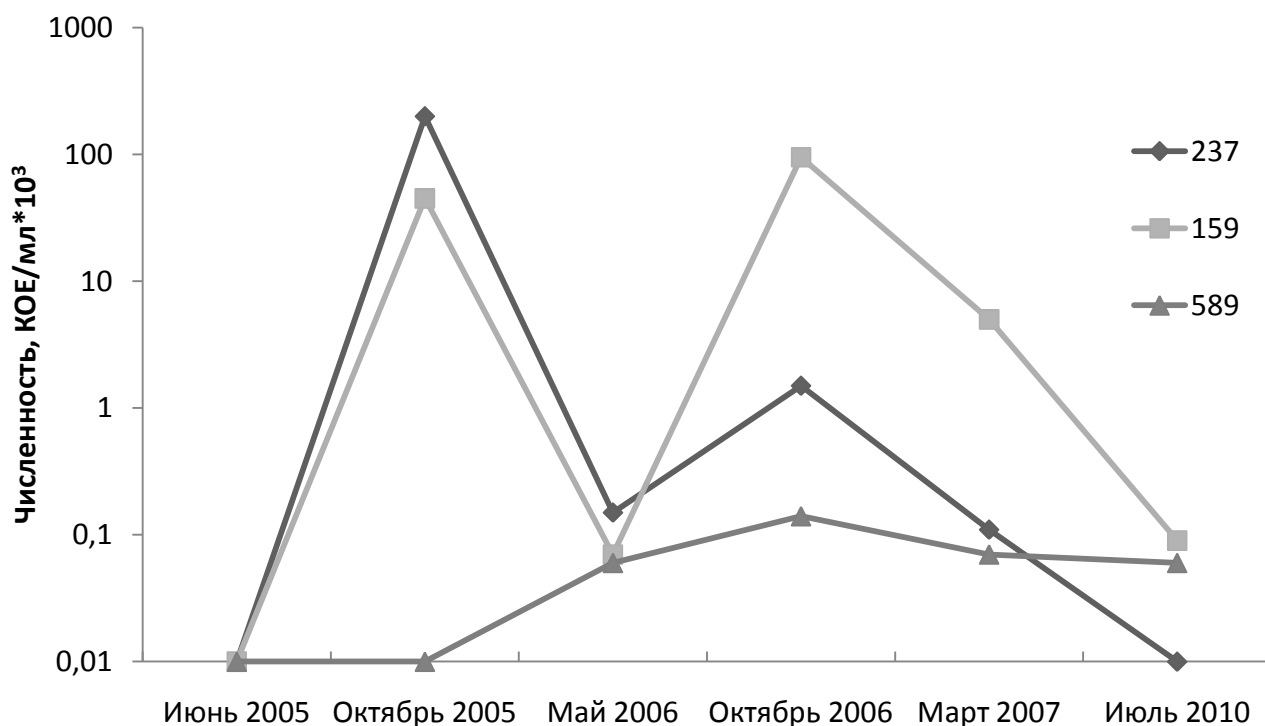


Рисунок 4.15 – Динамика численности мезофильных денитрифицирующих бактерий в грунтовых водах наблюдательных скважин мазутного хозяйства ТЭЦ.

Анализ изменений численности психрофильных денитрификаторов показывает, что в сравнении с мезофильными увеличение их численности происходит медленнее (табл. 4.2). Несмотря на повторное внесение, имеется всего один пик, т.е. повторное внесение нитрата не повлияло на их численность. При этом численность психрофильных денитрификаторов, подобно психрофильным аэробам, достигает больших значений, чем мезофильных. В общем виде характер реакции мезофильных и психрофильных денитрификаторов можно представить в виде кривых (рис. 4.16). После прекращения подпитки численность мезофильных и психрофильных денитрификаторов в течение 1-2 лет вернулась к значениям $10-10^2$ КОЕ/мл.

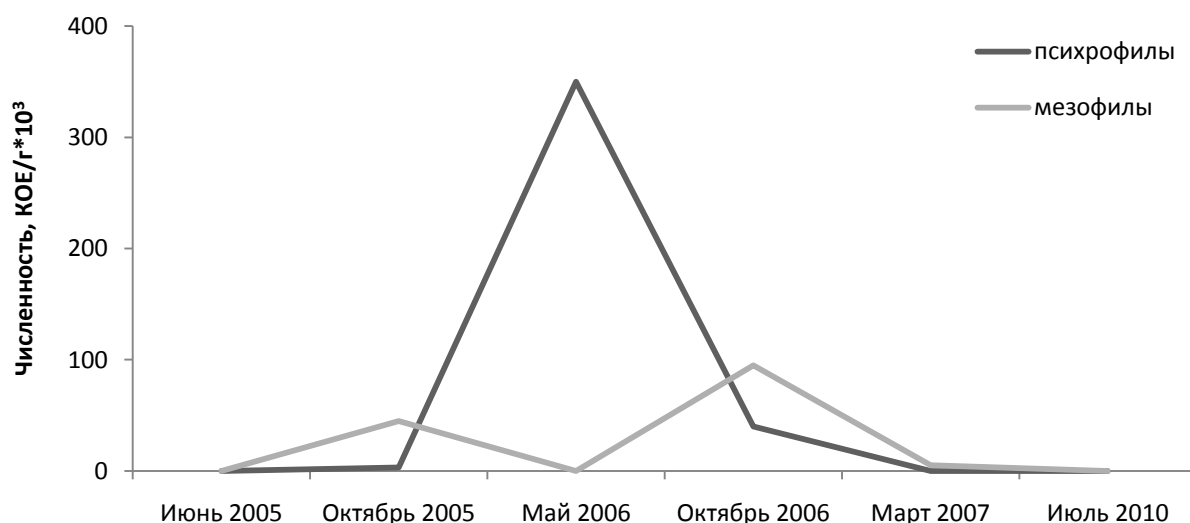


Рисунок 4.16 – Динамика численности психрофильных и мезофильных денитрификаторов в грунтовых водах мазутного хозяйства ТЭЦ в ответ на внесение биогенных элементов.

Таким образом, внесение нитрата и других минеральных элементов питания в грунтовые воды, загрязненные нефтепродуктами, оказывает положительное влияние на развитие психрофильных и мезофильных денитрификаторов.

4.4 Динамика гидрохимических показателей грунтовых вод при проведении биостимуляции

Для оценки процессов биодegradации нефтепродуктов анализировали изменение химического состава грунтовых вод. В ряде случаев численность микроорганизмов находится вблизи порога обнаружения, особенно это касается анаэробных микроорганизмов. В этой ситуации методы измерения не позволяют зафиксировать достоверные изменения численности микроорганизмов при воздействии на систему. Более информативным является оценка изменения химического состава грунтовых вод, которое происходит в результате жизнедеятельности микроорганизмов. Как известно, показатели химического состава грунтовых вод (концентрация аммония, сульфата,

щелочность и др.) могут служить индикаторами биodeградации нефтепродуктов (Eriksson et. al., 2006; Паничева и др., 2012).

Деградация нефтепродуктов протекает в аэробных и анаэробных микроразонах загрязненной области. По аэробному пути биodeградация, в большинстве случаев, протекает до углекислого газа и воды, поэтому этот процесс называют минерализацией. При этом углекислый газ выделяется так же и при анаэробных процессах деградации углеводов. Таким образом, появление углекислого газа (CO_2) и иона гидрокарбоната (HCO_3^-) свидетельствует о биологических процессах окисления органического загрязнения. Соотношение содержания CO_2 и HCO_3^- зависит от pH и температуры воды. При pH 7-8 выше концентрация гидрокарбоната, при pH 8,5 их концентрации уравниваются. В щелочной области выше концентрация углекислого газа (Крайнов и др., 2004).

Вклад аэробных и анаэробных процессов в биodeградацию может меняться в зависимости от условий среды (Паничева и др., 2012). При этом нельзя не учитывать вклад микроорганизмов с низкой численностью в процессы биodeградации загрязнения. По данным исследователей вклад анаэробных процессов в северных и умеренных широтах в биохимическую трансформацию нефтепродуктов составляет до 80% (Паничева и др., 2012).

Динамика содержания углекислого газа и иона гидрокарбоната. В ответ на внесение минеральных элементов отмечалось увеличение концентрации углекислого газа в грунтовых водах, которое свидетельствует об интенсификации процессов биodeградации. Так, на начальном этапе исследования концентрация углекислого газа колебалась в пределах 6,6 – 13,2 мг/дм³ (табл. 4.4). После внесения минеральных элементов концентрация CO_2 в пятне загрязнения увеличилась в 10 раз до 66 – 136,4 мг/дм³. Через полгода данный показатель вернулся к исходным величинам. Повторное внесение химических элементов в скважину 159 снова привело к увеличению углекислого газа в воде (табл. 4.3).

Таблица 4.3

Содержание углекислого газа в грунтовых водах мазутного хозяйства ТЭЦ

Дата отбора образцов	Концентрация CO ₂ в грунтовой воде скважин, мг/дм ³					
	159	160	237	238	239	589
Апрель 2004	6.6	13.2	8.8	8.8	-*	17.6
Сентябрь 2004	13.2	17.6	6.6	22	-	11
Апрель 2005	0	17.6	-	-	-	8.8
Октябрь 2005	66	26.4	136.4	0	17.6	17.6
Март 2006	17.6	8.8	8.8	8.8	17.6	13.2
Октябрь 2006	73.2	-	8.8	17.6	8.8	13.2
Апрель 2007	-	26.4	8.8	22	26.4	17.6

*Примечания: «-» – не измеряли

В целом, рН грунтовых воды колебалась в пределах 8 – 9 единиц. До обработки грунтов и грунтовых вод среднее значение рН по всем скважинам опытного участка (май, июнь 2005 г) было 8,4 – 8,6, а после обработки (октябрь 2005 г) – 7,62. Динамика иона гидрокарбоната представлена в таблице 4.4.

Таблица 4.4

Содержание иона гидрокарбоната в грунтовых водах мазутного хозяйства ТЭЦ

Дата отбора образцов	Концентрация HCO ₃ ⁻ в грунтовой воде скважин, мг/дм ³					
	159	160	237	238	239	589
Апрель 2004	793	366	305	1244	366	402.6
Сентябрь 2004	500.2	512	317.2	168.6	-*	329.4
Апрель 2005	-	-	512.4	13.42	427	366
Сентябрь 2005	85.4	634	195.2	1232.2	610	390.4
Октябрь 2005	242.4	286	652.7	643.5	225.8	176
Март 2006	988.2	622.2	219.6	1403	561.2	353.8
Октябрь 2006	744	-	244	378.2	353.8	317.2
Апрель 2007	-	586	329.4	1098	512.4	231.8

*Примечания: «-» – не измеряли

Можно отметить, что изменение концентрации иона гидрокарбоната не было синхронным с изменением концентрации углекислого газа. Сначала в

грунтовой воде фиксировалось увеличение концентрации углекислого газа, затем, увеличение концентрации гидрокарбонат-иона (табл. 4.3 и 4.4). То есть постепенно углекислый газ, образующийся в процессе биодegradации, переходил в гидрокарбонат.

Корреляционный анализ показал, что после внесения минеральных элементов (в 2005 г.) отмечалась сильная положительная связь между концентрацией аммония и углекислого газа (коэффициент корреляции r менялся от 0,9 до 0,95) в грунтовой воде скважин (Приложение 6). Это может свидетельствовать о том, что в процессе окисления азотсодержащих углеводов происходит высвобождение аммония и углекислого газа. В более поздний период после обработки (апрель 2007) отмечалась положительная связь между концентрациями аммония и гидрокарбоната (коэффициент корреляции $r=0,93$) (Приложение 6). Эти данные согласуются с динамикой концентрации углекислого газа и гидрокарбоната в грунтовой воде.

Также, увеличилась перманганатная окисляемость грунтовой воды. Перманганатная окисляемость характеризует содержание в воде легкоокисляемых органических веществ (в основном гуминовые кислоты и фульвокислоты), которые могут быть окислены кислородом. Этот показатель очень часто используют на практике для оценки органического загрязнения воды. Для фоновых грунтовых вод он составляет 2 – 4 мг $O_2/дм^3$. В данном случае, нефтепродукты не относятся к легкоокисляемой органике, а вот продукты их распада могут.

На начало исследования перманганатная окисляемость в очаге загрязнения колебалась в пределах 0,11 – 6 мг $O_2/дм^3$, после внесения минеральных элементов 1,6 – 11,68 мг $O_2/дм^3$ (табл. 4.5). При этом прирост перманганатной окисляемости отмечался, в период, когда уже минеральные элементы не вносили (август 2007), т.е. биодegradация продолжалась. Перманганатная окисляемость коррелировала с концентрацией углекислого газа (коэффициент корреляции $r=0,91$) и концентрацией гидрокарбоната

(коэффициент корреляции $r=0,93$), а также с концентрацией аммония (коэффициент корреляции $r=0,86$) (Приложение 6).

Таблица 4.5

Перманганатная окисляемость грунтовых вод мазутного хозяйства ТЭЦ

	Перманганатная окисляемость грунтовой воды скважин, мг О/дм ³ .					
	159	160	238	239	589	237
Апрель 2004	1,76	1,6	3,36	-	2,08	0,11
Сентябрь 2004	-	6,24	2,56	5,76	1,28	1,44
Апрель 2005	2,24	3,68	2,08	5,12	3,04	2,24
Октябрь 2005	2,72	4,48	3,04	3,04	2,4	12,8
Март 2006	3,2	-	2,4	6,24	1,6	-
Апрель 2006	8,16	-	3,36	2,88	4,16	1,6
Октябрь 2006	-	4,64	1,28	5,76	0,96	3,04
Август 2007	-	-	10,56	7,36	11,68	0,96

*Примечания: «-» – не измеряли

Таким образом, увеличение численности исследуемых эколого-трофических групп микроорганизмов сопровождалось увеличением концентрации органического вещества, концентрации углекислого газа и иона гидрокарбоната в грунтовой воде. Изменение данных показателей свидетельствует об интенсификации процессов микробной биодegradации нефтепродуктов.

Динамика содержания химических форм азота. При внесении биогенных элементов в грунты контролировали содержание гидрохимических показателей в воде. Все исследуемые показатели оставались в пределах нормы, за исключением концентрации нитрата в скважине 159 (табл. 4.6). Концентрация нитрата 81,1 мг/дм³ превышает ПДК (45,0 мг/дм³). Однако в скважине 239, которая находится ниже по направлению потока вод на расстоянии 25 м, его концентрация была намного меньше (0,69 мг/дм³). При последующем анализе воды (через 6 месяцев) этот показатель тоже пришел в норму.

Таблица 4.6

Содержание аммония, нитрита и нитрата в грунтовых водах мазутного хозяйства ТЭЦ

№ скважины	Формы азота	Дата отбора проб								
		29.04.2004	10.09.2004	29.04.2005	26.09.2005	09.03.2006	21.04.2006	31.10.2006	29.03.2007	22.09.2007
		Концентрация, мг/дм ³								
237	Аммоний	0,07	н.о.*	н.о.	н.о.	5,03	0,55	0,21	0,08	0,15
	Нитрит	н.о.	0,008	н.о.	н.о.	55,43	10,95	н.о.	0,21	н.о.
	Нитрат	1,0	0,518	3,70	н.о.	6,90	23,42	9,71	1,11	2,22
	Суммарное количество азота	1,07	0,526	3,7	46,42	67,36	34,92	9,92	1,4	2,37
159	Аммоний	5,14	2,04	н.о.	0,45	53,42	52,29	40,5	52,29	4,42
	Нитрит	0,019	0,13	н.о.	2,44	0,057	0,02	0,029	0,02	0,05
	Нитрат	0,44	2,52	н.о.	81,10	0,57	0,82	1,54	0,88	0,83
	Суммарное количество азота	5,599	4,69	0	83,99	54,047	53,13	42,069	53,19	5,3
239	Аммоний	1,71	н.о.	2,07	1,13	3,55	3,44	0,28	2,14	2,29
	Нитрит	0,009	н.о.	0,017	0,05	0,035	0,02	0,002	н.о.	0,12
	Нитрат	0,25	н.о.	0,44	0,69	1,03	1,12	2,84	0,61	3,29
	Суммарное количество азота	1,969	0	2,527	1,87	4,615	4,58	3,12	2,75	5,7

*Примечания: Н.о. – не обнаружено, «-» – не измеряли.

Анализ содержания химических форм азота в грунтовых водах в период до проведения обработки (2004 г.), показал, что на периферии пятна концентрация аммония составляла 0,07 мг/дм³, либо он не обнаруживался (скв. 237 в табл. 4.6). В то же время, в пятне загрязнения (скв. 159, 239) содержание аммония было выше – 1,7 – 5,1 мг/дм³ (табл. 4.6). Периодически во всех скважинах наблюдалось полное исчерпание аммония. С одной стороны это может свидетельствовать о процессе нитрификации, а с другой об отсутствии разложения нефтепродуктов, содержащих азот. Напротив, нитрат в больших концентрациях наблюдался в скважинах с низким уровнем загрязнения. На

периферии загрязненного участка нитрат колебался в пределах 0,5 – 3,7 мг/дм³, в пятне загрязнения – в пределах 0 – 2,5 мг/дм³. При этом анализ концентрации нитрата в грунтовых водах в период до внесения минеральных элементов питания показал, что периодически фиксировалось увеличение концентрации нитрата в воде на 2-3 порядка. Так, в скважине 238 (10.09.04) концентрация нитрата в скважине составляла 116,15 мг/дм³, в скважине 161 – 57,28 мг/дм³ (29.04.04).

Через 2 – 6 месяцев после внесения минеральных элементов в грунтовых водах значительно увеличилась концентрация аммония (до 50 мг/дм³ и более) (табл. 4.6). Эти изменения произошли спустя достаточно длительное время, поэтому источником повышенных концентраций аммония нельзя считать азотсодержащие удобрения, внесенные в скважины 159 и 237. Таким образом, увеличение концентрации аммония в воде связано с интенсификацией биохимических процессов и биодegradацией нефтепродуктов. Как известно, азот входит в состав углеводов нефти. В высокосмолистых нефтях может содержаться до 10% азотистых соединений, при этом подавляющая часть концентрируется в тяжелых фракциях, которые и содержатся в нефтепродуктах (Гуреев, 1972; Яновская и Сагаченко, 2009). Соответственно, появление аммония в грунтовой воде может свидетельствовать об интенсификации процесса распада азотсодержащих углеводов (Паничева и др., 2012).

При этом также интенсифицировался процесс нитрификации, особенно это было заметно на периферии пятна загрязнения. Через полгода после внесения биогенов в скважине 237 отмечалось повышенное содержания нитритов – 55,4 мг/дм³, а затем нитратов до 23,4 мг/дм³. В пятне загрязнения (скважина 159) через полгода увеличилась концентрация аммония до 53,4 мг/дм³ и сохранялась на таком же уровне в течение года, далее следовало снижение до нормы (табл. 4.6). То есть, скорость нитрификации была ниже скорости процессов, приводящих к накоплению аммония.

В результате обработки увеличилось суммарное количество минерального азота в воде. Так, например, в скважине 159 на начало

исследования этот показатель составлял 4,7 – 5,6 мг/дм³, после внесения элементов 42,1 – 84 мг/дм³ (табл. 4.6).

В общем виде содержание окисленных и восстановленных форм азота в скважинах с разным уровнем загрязнения в период после проведенных биоремедиационных мероприятий показано на рисунке 4.17. Содержание аммонийного азота намного выше в воде загрязненного участка (скважины 159, 239, 589), чем за его пределами (скважины 161, 240).

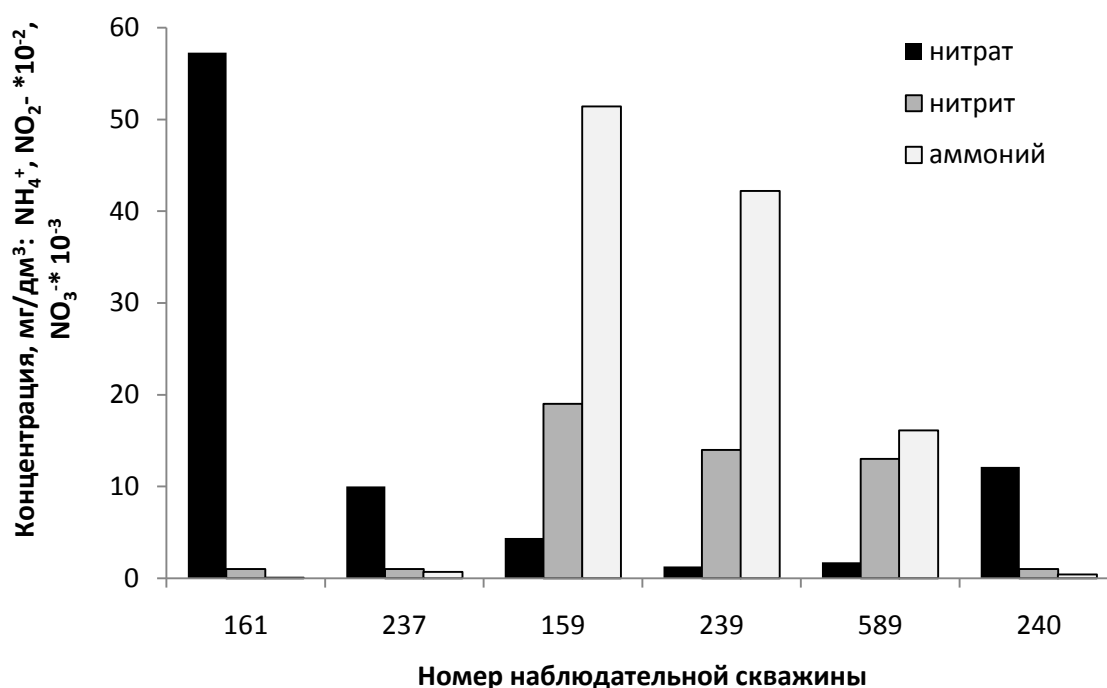


Рисунок 4.17 – Содержание аммонийной, нитритной и нитратной формы азота в грунтовых водах мазутного хозяйства ТЭЦ после внесения биогенных элементов.

Это связано с тем, что в грунтовых водах вне очага загрязнения (скважины 161, 240) концентрация растворенного кислорода достаточна для окисления органических соединений, в том числе углеводородов, при низких концентрациях, и аммония нитрифицирующими бактериями. В этих условиях нитрификация поддерживает низкую концентрацию аммония, окисляя его до нитрата. Поскольку скорость поступления кислорода в подземную среду ограничена, то в загрязненной воде окисление органических соединений аэробами, в том числе углеводородокисляющими, приводит к исчерпанию

растворенного кислорода. Интенсивность нитрификации снижается, при этом происходит накопление нитрита (скважины 159, 239 и 589), который ингибирует вторую фазу нитрификации (окисление его в нитрат).

В некоторых скважинах (239, 589) после внесения минеральных элементов отмечался противофазный характер изменения содержания аммония и нитрата. На рисунке 4.18 показана динамика содержания аммонийного и нитратного ионов в скважине 589. Противофазный характер динамики концентраций в грунтовых водах трех форм азота, дает основание предположить, что в грунтовых водах в районе скважины 589 протекают достаточно интенсивные процессы, биодegradации азотсодержащих углеводов, нитрификации и денитрификац. Таким образом, несмотря на то, что в скважину 589 не вносили биогенные элементы, в воде произошла интенсификация процессов биодegradации углеводов.

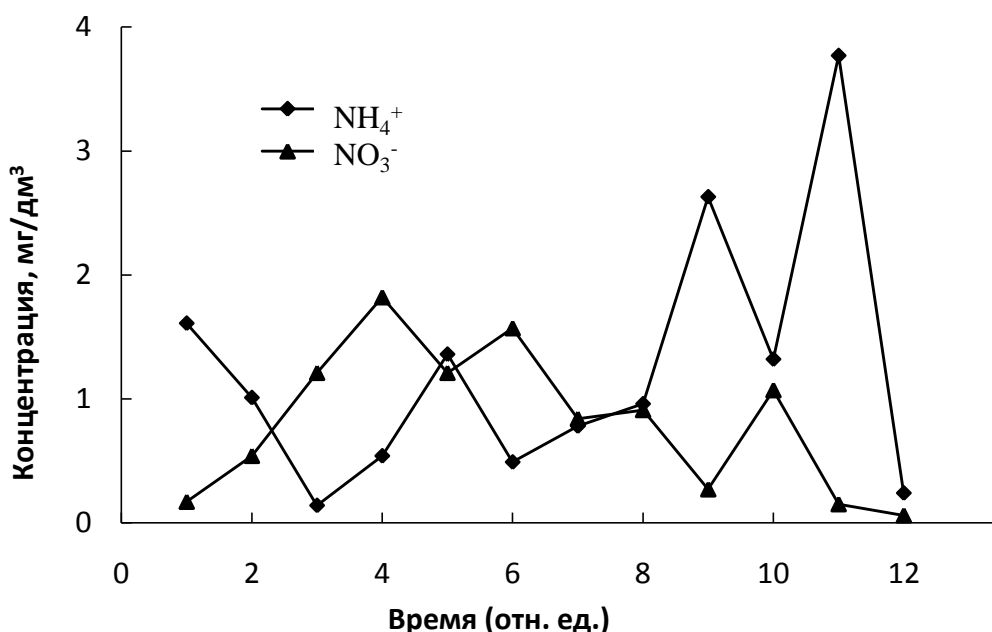


Рисунок 4.18 – Динамика концентраций аммония и нитрата в грунтовых водах наблюдательной скважины 589, расположенной на территории мазутного хозяйства ТЭЦ (период с апреля 2004 по октябрь 2010 гг.).

Для подтверждения этого предположения, часть данных из скважины 589 (с 2004 – 2007 гг.) о содержании аммония, нитрита и нитрата в грунтовых водах

была использована для обучения нейронной сети распознаванию динамики концентраций аммонийной и нитратной форм азота, которая, по нашему мнению, характерна для процессов биodeградации, нитрификации и денитрификации. Способность нейросети обучаться свидетельствует о том, что существует устойчивая зависимость между концентрацией азотсодержащих соединений. Также нейросеть использовали для прогнозирования, на рисунке 4.19 показано, что фактические данные по скважине 589 за 2008-2010 гг. соответствуют графику построенному нейросетью. То есть в грунтовых водах протекают процессы биodeградации азотсодержащих углеводов, нитрификации и денитрификации, роль которых является определяющей для концентрации аммония, нитрита и нитрата в грунтовой воде скважины 589 (Трусей и др., 2017).

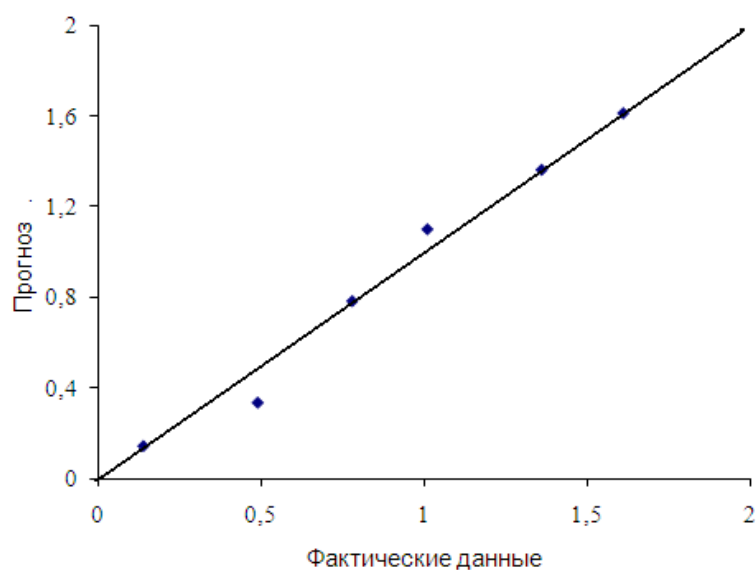


Рисунок 4.19 – Результаты обучения нейросети (по данным для наблюдательной скважины 589, 2004 – 2007 гг.) для прогнозирования концентраций аммония / нитрата в грунтовых водах.

Стоит отметить, что на содержание ионов нитрата в воде помимо нитрификации влияют и анаэробные процессы, а именно денитрификация и диссимиляционная редукция нитрата до аммония (диссимиляционная

аммонификация) (Плакунов и Николаев, 2010; Паничева и др., 2012). При этом последний процесс также способствует накоплению ионов аммония в воде. Таким образом, диссимилиационная аммонификация также может вносить свой вклад в увеличение концентрации аммония. Однако для запуска данного процесса необходим нитрат, которого на начальный момент в грунтовой воде было крайне мало (табл. 4.6). В общем виде предполагаемые микробиологические процессы преобразования химических форм азота, протекающих в грунтовых водах, загрязненных нефтепродуктами, можно представить в виде схемы, представленной на рисунке 4.20.

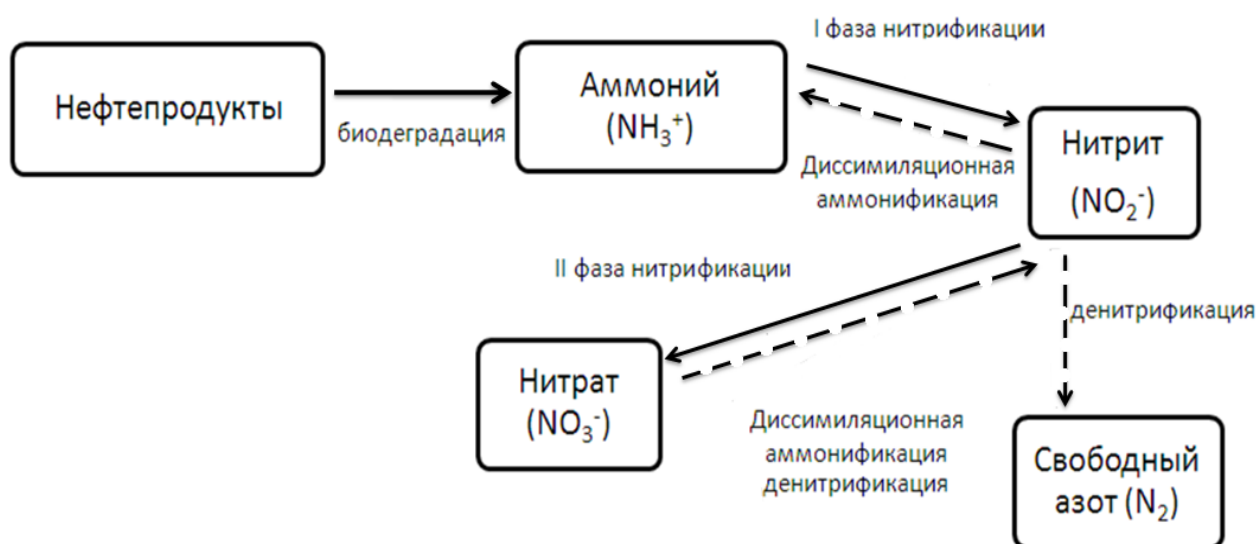


Рисунок 4.20 – Схема микробиологических процессов преобразования химических форм азота в грунтовых водах загрязненных нефтепродуктами.

Таким образом, внесение минеральных солей интенсифицировало процессы деградации нефтепродуктов, что сопровождалось увеличением концентрации аммония в грунтовых водах до 50 мг/дм³ и выше. В очаге загрязнения (скв. 159) высокая концентрация аммония сохранялась на протяжении года. На периферии пятна загрязнения, где более благоприятный кислородный режим (скв. 237), высокая концентрация аммония привела к увеличению интенсивности нитрификации, и как следствие увеличению содержания нитрата. В пятне загрязнения нитрификация также наблюдалась,

при этом скорость деградации азотсодержащих нефтепродуктов была выше, что и приводило к накоплению аммония.

При дальнейшей работе по биостимуляции на территории мазутного хозяйства ТЭЦ, которая проводилась на объекте с 2009 по 2017 гг., неоднократно наблюдалось повышение концентрации аммония в грунтовых водах в очаге загрязнения, в некоторых случаях до 200 мг/дм³. После чего в нескольких скважинах усилилось движение грунтовых вод. Так, в июне 2005 г скорость поглощения воды скважиной 159 составляла 5,53 л/мин (табл. 2.5). После проведенной обработки, когда в скважине была зафиксирована высокая концентрация аммония, скорость поглощения воды скважины увеличилась до 10 л/мин. В наблюдательной скважине № 239, в которой практически отсутствовало движение грунтовых вод из-за сильного загрязнения (табл. 2.5), после повышения концентрации аммония до значений 72,8 мг/дм³ восстановилось движение грунтовых вод.

Сульфатредукция и динамика содержания сульфата. В отличие от азота и фосфора, сера не является лимитирующим биогенным элементов для микроорганизмов данной экосистемы. Тип исследуемых грунтовых вод – сульфатно-гидрокарбонатный, со смещением в сторону гидрокарбонатно-сульфатных. То есть сульфат в воде присутствует постоянно, однако периодически наблюдается исчерпание ионов сульфата, которое в большинстве случаев происходит из-за деятельности сульфатредуцирующих и других бактерий. Восстановление сульфата при невысоких температурах, которые имеются в грунтах, возможно только биохимическим путем (Крайнов и др., 2004). В результате жизнедеятельности сульфатредуцирующих бактерий в грунтовых водах происходит исчерпание сульфата и увеличение концентрации углекислого газа. В воде концентрация углекислого газа находится в равновесном состоянии с гидрокарбонат-ионом, в зависимости от рН воды (Крайнов и др., 2004). Таким образом, снижение концентрации сульфата и

увеличение концентрации гидрокарбонат-иона указывают на протекающую в грунтовых водах сульфатредукцию (Судариков и Нгуен, 2015).

В отличие от денитрифицирующих, численность сульфатредуцирующих бактерий имела один порядок величин (10^2 КОЕ/мл) на протяжении всего периода наблюдений (табл. 4.7).

Таблица 4.7

Численность сульфатредуцирующих бактерий в грунтовых водах мазутного хозяйства ТЭЦ за период 2005 – 2010 год

Дата	Исследуемые показатели	№ наблюдательной скважины				
		159	237	238	239	589
2005 июнь	Численность	$15 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^2$	$0,7 \cdot 10^2$	$1,15 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^2$
	Пределы	$3,2 \cdot 10^2$; $70,2 \cdot 10^2$	$0,43 \cdot 10^2$; $9,36 \cdot 10^2$	$0,32 \cdot 10^2$; $7,02 \cdot 10^2$	$0,15 \cdot 10^2$; $3,28 \cdot 10^2$	$0,8 \cdot 10^2$; $18,3 \cdot 10^2$
2005 октябрь	Численность	$1,5 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^4$	-*	-	-
	Пределы	$0,32 \cdot 10^2$; $7,02 \cdot 10^2$	$0,24 \cdot 10^4$; $5,15 \cdot 10^4$	-	-	-
2006 май	Численность	$0,3 \cdot 10^2$	$0,3 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^2$	-	$0,3 \cdot 10^2$
	Пределы	$0,06 \cdot 10^2$; $1,4 \cdot 10^2$	$0,06 \cdot 10^2$; $1,4 \cdot 10^2$	$0,24 \cdot 10^2$; $5,15 \cdot 10^2$		$0,06 \cdot 10^2$; $1,4 \cdot 10^2$
2006 октябрь	Численность	$4,5 \cdot 10^2$	$0,4 \cdot 10^2$	$3,0 \cdot 10^2$	-	$0,9 \cdot 10^2$
	Пределы	$0,96 \cdot 10^2$; $21,06 \cdot 10^2$	$0,086 \cdot 10^2$; $1,87 \cdot 10^2$	$0,64 \cdot 10^2$; $14,04 \cdot 10^2$		$0,19 \cdot 10^2$; $4,21 \cdot 10^2$
2007 март	Численность	-	$0,6 \cdot 10^2$	$0,6 \cdot 10^2$	$0,7 \cdot 10^2$	$0,9 \cdot 10^2$
	Пределы	-	$0,13 \cdot 10^2$; $2,81 \cdot 10^2$	$0,13 \cdot 10^2$; $2,81 \cdot 10^2$	$0,15 \cdot 10^2$; $3,28 \cdot 10^2$	$0,19 \cdot 10^2$; $4,21 \cdot 10^2$
2007 сентябрь	Численность	-	$0,6 \cdot 10^2$	$0,6 \cdot 10^2$	$0,7 \cdot 10^2$	$0,9 \cdot 10^2$
	Пределы		$0,13 \cdot 10^2$; $2,81 \cdot 10^2$	$0,13 \cdot 10^2$; $2,81 \cdot 10^2$	$0,15 \cdot 10^2$; $3,28 \cdot 10^2$	$0,19 \cdot 10^2$; $4,21 \cdot 10^2$

*Примечание: Н.о. – не обнаружено, “ - ” – не определяли.

Изменение численности сульфатредуцирующих бактерий (на 2 порядка) отмечалось только к скважине 237 (табл. 2.7). Однако анализ химического состава грунтовых вод на участке мазутного хозяйства показывает, что

сульфатредуцирующие бактерии оказывают однозначное и существенное влияние на содержание в воде сульфата и гидрокарбонат-иона.

Динамика содержания сульфата в грунтовой воде скважин представлена в таблице 4.8.

Таблица 4.8

Концентрация сульфата в грунтовых водах из наблюдательных мазутного хозяйства ТЭЦ

Дата	Периоды исследования	Концентрация сульфата в наблюдательных скважинах, мг/дм ³						Среднее по скважинам (уровень надежности 0,95)
		159	160	237	238	239	589	
2004.04	Период до внесения минеральных элементов питания	-	192	192	172,8	192	19,2	153,6±93,9
2004.09		87,75	9,6	28,8	259,2	-	41,86	85,4 ± 45,3
2005.04		-	-	48	355,2	220,8	0	156 ± 81,6
2005.09	Период после первого внесения минеральных элементов питания	345,6	173	1104	336	67,2	105,6	355,2 ± 157,0
2006.03		28,8	0	6,2	374,4	0	38,4	74,6 ± 60,3
2006.04		57,6	48	96	384	76,8	48	118,4 ± 53,7
2006.10	Период после второго внесения минеральных элементов питания	115,2	-	144	144	144	124,8	134,4 ± 6,1
2007.04		-	67	96	163,2	86,4	48	92,1 ± 19,6

После проведения обработки отмечалось увеличение сульфата в воде скважин. Так, в период до обработки средняя концентрация сульфата в скважинах колебалась в пределах 85,4 – 156 мг/дм³, после внесения минеральных элементов (включающих в том числе и сульфат аммония) концентрация сульфата в скважинах возросла до 355,2 мг/дм³ (табл. 4.8). Отмечалось увеличение концентрации сульфата во всех скважинах, за исключением 239. Обращает на себя внимание падение в скважинах 239 и 160 концентрации сульфата до нуля. В отличие от остальных скважин они расположены в грунтах с повышенной плотностью. В области наименьшей

скорости фильтрации воды ее время пребывания больше, и в результате растворенного кислорода становится меньше. Это означает, что здесь больше вероятность проявления процессов восстановления сульфата (область роста сульфатредуцирующих бактерий).

Проанализировав динамику концентрации сульфата, обнаружили, что она имеет противофазный характер с концентрацией гидрокарбоната (рис. 4.21).

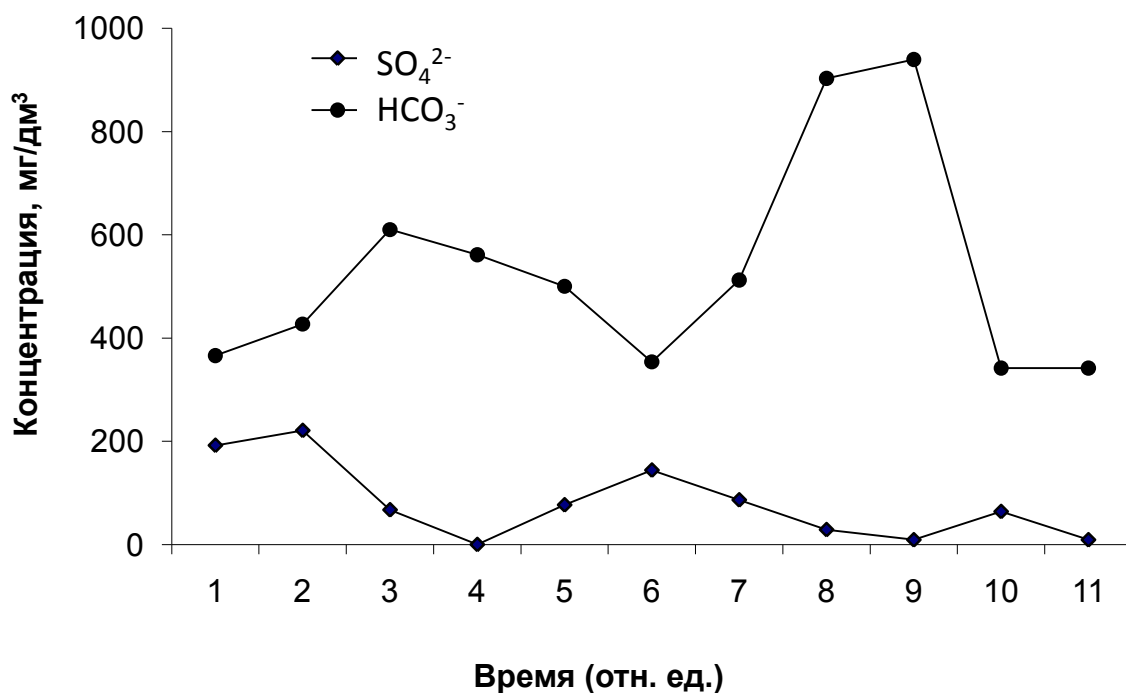


Рисунок 4.21 – Динамика концентраций сульфата и гидрокарбонат-иона в грунтовых водах 239 скважины в период апреля 2004 по октябрь 2010 гг.

Обнаружена высокая “обучаемость” нейронной сети на данных, которые были получены в скважине 239 (рис. 4.22) за период с 2004-2007 гг. Это означает, что в ее околоскважинном пространстве интенсивно протекает сульфатредукция, которая влияет на концентрацию сульфата и гидрокарбоната в воде. Обучение нейросети при анализе пары “сульфат – гидрокарбонат” по всему массиву данных наблюдательных скважин оказалось менее эффективным. То есть, процесс сульфатредукции не характерен для всего участка мазутного хозяйства. Для скважины 239 также при прогнозировании

данных отмечалась соответствие фактических данных за период 2008 – 2010 гг. прогнозу нейросети (рис. 4.22).

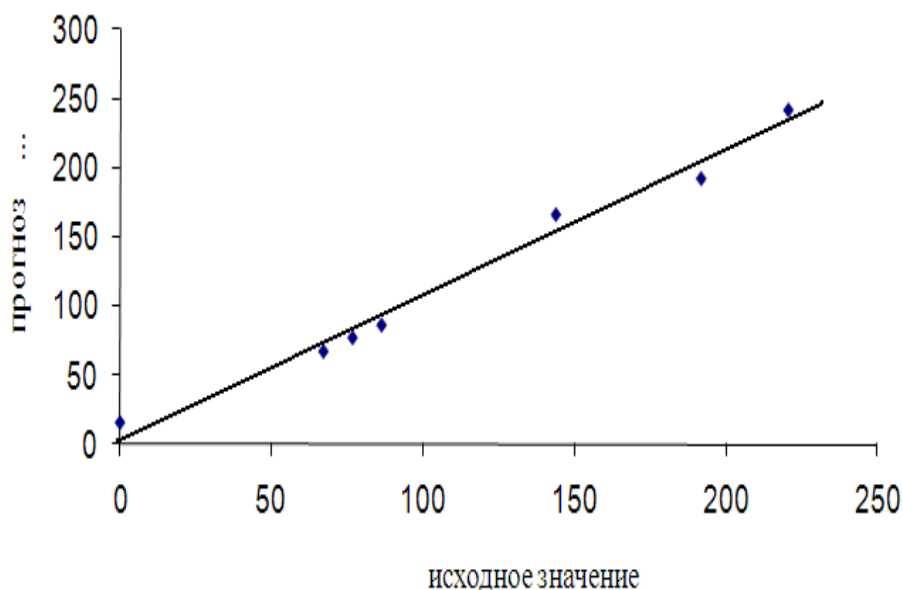


Рисунок 4.22 – Результаты обучения нейросети (по данным для наблюдательной скважины 239, 2004 – 2007 гг.) для прогнозирования концентраций сульфата и гидрокарбонат-иона в грунтовых водах.

Наличие сульфатредукции в скважине 239 согласуется с полученными ранее данными об ее поглотительной способности. Эта скважина имеет наименьшую поглотительную способность, истинная скорость движения грунтовых вод здесь минимальна (табл. 2.5). Это может быть вызвано уплотнением грунта (скважина расположена около разгрузочной эстакады), а также высокой замазученностью тяжелыми нефтепродуктами. Очевидно, что в этих условиях в околоскважинном пространстве формируется восстановительная среда, которая необходима для сульфатредуцирующих бактерий. Стоит отметить, что высоким уровнем загрязнения отличается также скважина 589. Однако здесь наибольшая поглотительная способность и скорость движения воды. Вероятно, большая скорость движения воды приносит в среду больше кислорода, чем в районе скважины 239. Соответственно, окислительно-восстановительный потенциал здесь выше и условия для роста сульфатредукторов менее благоприятны. Они сдвигаются в

сторону денитрификации, что и показывают результаты анализа с помощью нейросети (рис. 4.19).

Содержание нефтепродуктов в грунтовых водах. Стимуляция аэробных и анаэробных бактерий посредством внесения биогенных элементов питания способствовала усилению биодegradации нефтепродуктов. В результате, в течение 3-х лет наблюдалось устойчивое снижение концентрации нефтепродуктов в грунтовых водах на всем проблемном участке (рис. 4.23). На начало исследования содержание нефтепродуктов в очаге загрязнения (скважина № 159) составляло более 500 мг/дм³, в некоторых скважинах уровень загрязнения был несколько ниже – 400 – 120 мг/дм³. На поверхности грунтовых вод была линза нефтепродуктов мощностью 0,5-0,2 м.

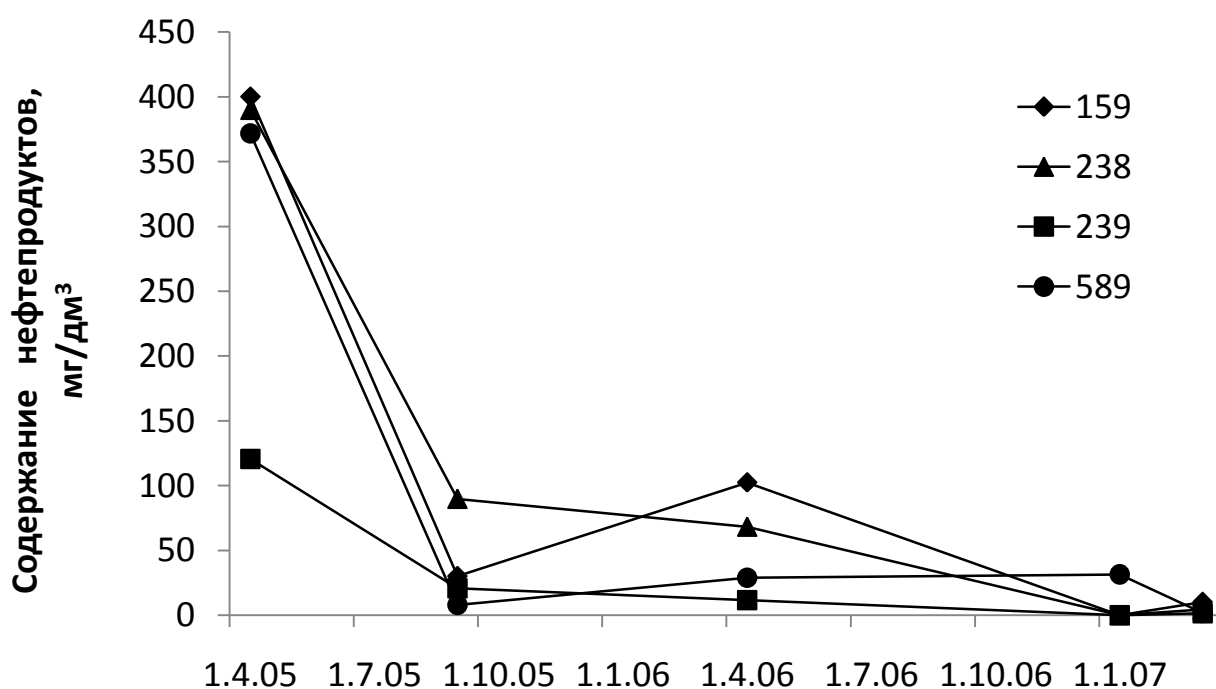


Рисунок 4.23 – Динамика снижения содержания нефтепродуктов в грунтовых водах наблюдательных скважин мазутного хозяйства ТЭЦ.

После проведения биостимулирующих мероприятий содержание нефтепродуктов снизилось до 10 – 1,5 мг/дм³ (рис. 4.23). В настоящем только в отдельных скважинах в очаге загрязнения наблюдается слой нефтепродуктах

мощностью 0,07 м. В скважинах, расположенных на периферии загрязненной зоны содержание углеводородов соответствует фоновому уровню. В наблюдательных скважинах с высоким уровнем загрязнения (№№ 159 и 239), где изначально наблюдалось отсутствие тока воды, улучшилась пропускная способность, то есть фильтрация грунтовых вод в этих зонах восстановилась. Таким образом, проведенные мероприятия по биостимуляции геологической среды, загрязненной углеводородами, показали свою эффективность. Положительное заключение ООО «Минусинская гидрогеологическая партия» об эффективности применения методики стимуляции автохтонных микроорганизмов на грунтах мазутного хозяйства Абаканской ТЭЦ прилагаются (Приложение 7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стимуляция микроорганизмов для восстановления экосистем, нарушенных в результате углеводородного загрязнения, в большинстве случаев представляется простым и экономически выгодным, по отношению к биоаугментации. Однако данная технология относительно редко применяется в практике биоремедиации в чистом виде, особенно в условиях *in situ* (Sorvari et al., 2009; Simpanen et al., 2016). В почвах и грунтах имеется автохтонное микробное сообщество, обладающее потенциалом для биоремедиации. Так, в настоящем исследовании проанализировали почву с недавним углеводородным загрязнением (менее 1 месяца) и выявили, что численность углеводородокисляющих бактерий достаточно высока и составляет порядка 10^6 – 10^7 КОЕ/г почвы. При проведении биоаугментации, такие численности микроорганизмов считаются «рабочими» (Wolicka and Borkowski, 2012; Филонов, 2016). Предварительные лабораторные и натурные исследования на почве, загрязненной нефтью, показали, что стимуляция сообщества микроорганизмов посредством коррекции условий среды при внесении биогенных элементов и карбамидоформальдегидного полимера, в качестве удобрения и структурообразователя, позволяет увеличить численность автохтонных бактерий на 2-4 порядка.

Основной целью настоящего исследования было оценить эффект стимуляции автохтонной микрофлоры грунтов, загрязненных нефтепродуктами, посредством внесения биогенных элементов питания. При этом подбор биогенных элементов проводился с учетом особенностей ключевых эколого-трофических групп микроорганизмов, осуществляющих биodeградацию углеводов в системе (в данном случае – углеводородокисляющие, аммонифицирующие, денитрифицирующие бактерии) и гидрохимических показателей за предыдущий период мониторинга. Раствор биогенных элементов в грунты зоны аэрации вносили через верхний горизонт, в грунтовые воды через систему наблюдательных скважин. На первом этапе, в грунты зоны аэрации вносили в основном аммонийный азот и

фосфор для стимуляции аэробных бактерий, в грунтовые воды восили нитратную форму азота для стимуляции денитрифицирующих. На втором этапе, при внесении биогенных элементов питания, акцент также делали на нитратную форму азота, поскольку в грунтовых водах наблюдалось увеличение концентрации аммония, и фосфор. Для оценки эффективности биостимуляции, определяли динамику численности основных эколого-трофических групп микроорганизмов, включая психрофильные и мезофильные формы и изменение их соотношения, изменение гидрохимических показателей и содержание нефтепродуктов.

Исследуемые экосистемы относятся к территории Средней Сибири для которой характерны низкие температуры, поэтому оценивали численность не только мезофильных, но и психрофильных бактерий. Анализ нефтезагрязненной почвы показал, что численность мезофильных бактерий исследуемых эколого-трофических групп выше, чем психрофильных на порядок. Среди психрофильных микроорганизмов почвы зоны умеренного климата 93,7% являлись факультативными психрофилами и только 6,3% – облигатными. С увеличением глубины наблюдается увеличение численности и доли психрофильных микроорганизмов по отношению к мезофильным. Анализ грунтов в том же регионе показал, что на глубинах 1-5 м численности психрофильных и мезофильных бактерий сопоставимы, на глубинах 12-15 м численность психрофильных (10^7 КОЕ/г) на порядок выше, чем мезофильных (10^6 КОЕ/г). Доля психрофильных бактерий в геологической среде колеблется от 20 до 60%, с глубиной увеличивается. Для сравнения, в пещерах Средней Сибири 51% микроорганизмов относятся к психротрофам, 49% – к облигатным психрофилам, в целом доля психрофилов составляет 68% (Хижняк и др., 2003; Хижняк, 2009). При этом также оценивали численность анаэробных психрофильных и мезофильных бактерий (денитрификаторы, железоредуцирующие, сульфатредуцирующие). Показано, что с глубиной численность психрофильных бактерий увеличивается по отношению к мезофильным, в некоторых случаях на порядок.

Таким образом, в исследуемой грунтовой системе, загрязненной нефтепродуктами присутствует автохтонное психрофильное сообщество аэробных и анаэробных микроорганизмов, стимуляция которого может играть одну из доминирующих ролей в процессе биоремедиации.

Предложенная методика стимуляции автохтонных микроорганизмов в грунтах загрязненных нефтепродуктами показала свою эффективность. Численность углеводородокисляющих и аммонифицирующих бактерий в грунтах зоны аэрации увеличилась на порядок, в грунтовой воде – на 1-3 порядка, численность денитрифицирующих в некоторых случаях – на 4 порядка. За исключением анаэробных групп микроорганизмов в грунтах зоны аэрации, их численность снизилась и особенно, психрофильных (денитрификаторов и железоредукторов). В целом, показано, что в грунтах при стимуляции психрофильные бактерии медленнее увеличивают численность, однако достигают больших значений, чем мезофильные. Такие особенности в динамике численности характерны для аэробных и анаэробных групп.

В геологической среде пространственное распределение аэробных и анаэробных эколого-трофических групп микроорганизмов происходит в соответствии с окислительно-восстановительным потенциалом среды (Крайнов и др. 2004; Rivett et. al., 2008; Водяницкий, 2011). В настоящей работе показано, что на распределение бактерий также оказывают влияние гидродинамические свойства породы (проницаемость, коэффициент фильтрации и др.). Данные свойства определяют распределение воды в грунтах, которая является основной средой развития микроорганизмов, а также на окислительно-восстановительный потенциал. В целом, аэробные углеводородокисляющие бактерии обнаруживались на всем загрязненном участке, с глубиной отмечалось увеличение численности анаэробных. В грунтах зоны насыщения на глубине 15 м численность железоредуцирующих бактерий сопоставима с численностью аммонифицирующих и составляет 10^7 КОЕ/г. В тоже время, активные анаэробные процессы окисления углеводов – денитрификация и сульфатредукция наблюдались локально. Так процесс сульфатредукции

наблюдался в скважинах с высоким уровнем загрязнения и низкой поглотительной способностью, т.е. где восстановительные условия в околоскважинном пространстве были подходящими. Таким образом, при планировании биостимуляции необходимо учитывать неоднородность среды и воздействовать на ключевые эколого-трофические группы, активные в данной зоне.

Для оценки эффективности биостимуляции анализировали изменение химического состава грунтовых вод. Значительные изменения наблюдались в содержании ионов аммония, в очаге загрязнения его концентрация в исследуемый период увеличилась до 50 мг/дм³ и сохранялась в течение года. В последующий период (2009 – 2013 гг.), при проведении биостимуляции наблюдалось увеличение аммония в очаге до 200 мг/ дм³, после чего восстановилось движение грунтовых вод в наблюдательных скважинах с высоким уровнем загрязнения (№ 239). Напротив, на периферии пятна загрязнения концентрация аммония была низкой, но наблюдалась более высокая концентрация нитрита. Такое соотношение разных форм азота свидетельствует об активном процессе биodeградации азотсодержащих углеводов, с выделением аммония. На периферии загрязненной зоны аммоний в процессах нитрификации преобразовывался в нитрат, поэтому его концентрация была выше. То есть, при проведении биоремедиационных мероприятий на нефтезагрязненных объектах может наблюдаться временное увеличение концентрации аммония выше значений ПДК.

Помимо этого, аэробная и анаэробная биodeградация приводила к увеличению концентрации углекислого газа и гидрокарбонат-иона в грунтовой воде. Также увеличилась перманганатная окисляемость с 0,11 – 6 мг O₂/л, до 1,6 – 11,68 мг O₂/л, что свидетельствовало о появлении в среде легкоокисляемых органических соединений, промежуточных продуктов метаболизма углеводов. Таким образом, изменение гидрохимических показателей адекватно отражает процесс биodeградации углеводов в среде. Появление аммония, и вслед за этим нитрата, а также увеличение перманганатной

окисляемости – показатели, которые можно использовать в качестве индикаторов процесса распада нефтепродуктов.

После прекращения внесения биогенных элементов численность автохтонных мезофильных и психрофильных бактерий в течение 1-2 лет вернулась к исходным значениям. Однако этого было достаточно, чтобы содержание нефтепродуктов в грунтовых водах на всем проблемном участке снизилось с 500 – 120 мг/дм³ до 10 – 1,5 мг/дм³. В последующий период с 2009 по 2017 работа по восстановлению геологической среды на территории мазутного хозяйства ТЭЦ продолжалась.

ВЫВОДЫ

1. В условиях Средней Сибири в сообществе микроорганизмов верхнего горизонта исследуемой нефтезагрязненной почвы 93,7% психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов, учитываемых на используемых питательных средах, относятся к факультативным психрофилам, а 6,3% – облигатным. У исследуемых изолятов бактерий при культивировании на минерально-солевой среде с нефтью температурный оптимум роста смещается более высокую зону, а диапазон роста сужается по отношению к росту на пептонном агаре; показатель силы влияния температуры на рост бактерий на средах составляет 84,7% и 38,2%, соответственно.

2. В поверхностном горизонте исследуемой нефтезагрязненной почвы численность психрофильных микроорганизмов по отношению к мезофильным ниже для соответствующих эколого-трофических групп, как правило, на порядок; она возрастает в 2-5 раз при низких температурах. В грунтах соотношение численностей психрофильных и мезофильных микроорганизмов различается по глубине: в верхних горизонтах преобладают мезофильные, на глубинах 12-15 м – психрофильные.

3. В лабораторных и натуральных экспериментах показано, что коррекция условий среды посредством внесения карбамидоформальдегидного полимера, биогенных элементов питания, увеличивает численность психрофильных и мезофильных микроорганизмов на 2-4 порядка, в натурном эксперименте эффект от обработки сохранялся в течение года.

4. Внесение биогенных элементов питания (азота, фосфора) с учетом особенностей ключевых эколого-трофических групп микроорганизмов и динамики гидрохимических показателей грунтовых вод приводит к увеличению численности исследуемых аэробных групп микроорганизмов в грунтах зоны аэрации на порядок, в грунтовой воде на 1-3 порядка; численность денитрификаторов в грунтовой воде увеличилась на 3-4 порядка. При этом наблюдается увеличение доли психрофильных микроорганизмов.

5. Стимуляция биодegradации нефтепродуктов сопровождается изменением гидрохимического состава грунтовых вод: увеличивается концентрация аммония, нитрата, нитрита, углекислого газа, перманганатная окисляемость воды, которые служат индикаторами восстановления геологической среды. В результате стимуляции содержание нефтепродуктов в грунтовых водах снизилось с 500 – 120 мг/дм³ до 10 – 1,5 мг/дм³.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева, Т. П. Перспективы использования торфа для очистки нефтезагрязненных почв / Т. П. Алексеева, Т. И. Бурмистрова, Н. Н. Терещенко, Л. Д. Стахина, И. И. Панова // Биотехнология. – 2000. – №1. – С. 58-64.
2. Аристовская, Т. В. Микробиология процессов почвообразования / Т. В. Аристовская. – Ленинград: Наука, 1980. – 187с.
3. Бабушкин, В. Д. Научно-методические основы защиты от загрязнения водозаборов хозяйственно-питьевого назначения / В. Д. Бабушкин, А. Я. Гаев, В.Г. Гацков, С.В. Миронов, В.О. Штерн. – Пермь, 2003. – 263 с.
4. Бабьева, И. П. Новый вид психрофильных базидиодрожжей *Leucosporidium* / И. П. Бабьева, Г. А. Лисичкина // Микробиология. – 2000. – Т. 69. – №6. – С. 801-809.
5. Барановская, А. В. Сезонная динамика почвенных процессов на полярном Севере / А. В. Барановская, В. И. Левина, В. Н. Переверзев. – Ленинград: Наука, 1969. – 118 с.
6. Баронин, И. Е. Ликвидация нефтезагрязнений с использованием сорбентов / И. Е. Баронин, А. И. Кислов, В. М. Мелкозеров // Трубопроводный транспорт нефти. – 2002. – №9. – С. 20-23.
7. Белоусова, Н. И.,. Отбор микроорганизмов, способных к деструкции нефти и нефтепродуктов при пониженных температурах / Н. И. Белоусова, Барышникова Л. М., Шкидченко А. Н. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т.38. – №5. – С. 513-517.
8. Белякова, С. В. Исследование влияния температуры среды на доступность углеводородного субстрата для мезофильных и психрофильных микроорганизмов нефтезагрязненной почвы /С. В. Белякова, И. В. Трусей, Гуревич Ю. Л. // Сб. тез. ВНКСФ-10. – Екатеринбург – Москва. – 2004. – С. 793-794.
9. Бешенцев, В.А. Охрана подземных вод от загрязнения : учеб. пособие / В. А. Бешенцев, Н. С. Трофимова. – Тюмень: ТюмГНГУ, 2013. – 48 с

10. Бочкарева, Ю. В. Интенсификация процессов биологического окисления углеводов, загрязняющих почвы в регионе Западной Сибири / Ю. В. Бочкарева, С. О. Галанова, Р. Р. Ахмеджанов, Л. И. Сваровская // Вестник науки Сибири. – 2014. – №1. – С. 6-10.
11. Бракоренко, Н. Н. Критерии экологической оценки геологической среды в связи с воздействием нефтепродуктов / Н. Н. Бракоренко, Т. Я. Емельянова // Вестник Томского государственного университета. – 2015. – № 393. – С. 213–217.
12. Браун, В. Генетика бактерий / В. Браун. – Москва: Наука, 1968. – 446 с.
13. Брода, П. Плазмиды. / П. Брода. – Москва: Мир. 1982.
14. Ветрова, А. А. Биодegradация углеводов нефти плазмидосодержащими микроорганизмами – деструкторами: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06 / Ветрова Анна Андрияновна. – М., 2010. – 26 с.
15. Ветрова, А. А. Биодеструкция нефти отдельными штаммами и принципы составления микробных консорциумов для очистки окружающей среды от углеводов нефти / А. А. Ветрова, А. А. Иванова, А. Е. Филонов, В. А. Забелин, А. Б. Гафаров, С. Л. Соколов, И. А. Нечаева, И. Ф. Пунтус, А. М. Боронин // Известия Тульского государственного университета Естественные науки. – 2013. – Вып.2. – Ч.1. – С. 241–257.
16. Водяницкий, Ю.Н. Влияние Fe(III) на биодegradацию нефти в переувлажненных почвах и осадках / Ю.Н. Водяницкий, С.Я. Трофимов, С.А. Шоба // Почвоведение. – 2015. – № 7. – С. 877.
17. Водяницкий, Ю. Н. Соединения железа и биодegradация нефти в переувлажненных загрязненных почвах (обзор литературы) / Ю.Н. Водяницкий // Почвоведение. – 2011. – № 11. – С. 1364-1374.
18. Глунцов, Н. М. Об использовании различных форм труднорастворимых удобрений под тепличные томаты / Н. М. Глунцов, С. Н. Байкова, Н. К. Скворцова // Агрoхимия. – 1985. – № 4. – С. 71-78.
19. Головченко, А. В. Водно-физические свойства почв и структура микробных комплексов / А. В. Головченко, Т. Г. Добровольская, Л. К. Алехина,

- Т. Н. Початкова // Почвы – национальное достояние России: Матер. IV съезда Докучаевского общества почвоведов. – Новосибирск: Наука-Центр, 2004. – С. 33-35.
20. Гольдберг, В. М. Методические рекомендации по выявлению и оценке загрязнения подземных вод / В. М. Гольдберг, С. Г. Мелькановицкая, В. М. Лукьянчиков. – Москва: ВСЕГИНГЕО, 1988.
21. Гольдберг, В. М. Техногенное загрязнение природных вод углеводородами и его экологические последствия / В.М. Гольдберг, В.П. Зверев, А. И. Арбузов, С. М. Казеннов, Ю. В. Ковалевски, В. С. Путилина. – Москва: Наука, 2001. – 123 с.
22. Готтшалк Г. Метаболизм бактерий / Г. Готтшалк. – М.: Мир, 1982. – 310 с.
23. Гриценко, А. И. Экология, нефть и газ / А. И. Гриценко, Г. С. Акопов, В. М. Максимов. – Москва: Наука, 1997. – 598 с.
24. Грищенков, В. Г. Рост бактерий-деструкторов нафталина и салицилата при пониженных температурах / В. Г. Грищенков, Д. А. Шишмаков, И. А. Кошелева, А. М. Воронин // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т.39. – №3. – С. 322-328.
25. Громов, Б. В. Экология бактерий / Б. В. Громов, Г. В. Павленко. – Ленинград: Изд-во ленинградского университета, 1989. – 248 с.
26. Гуревич, Ю. Л. Биоремедиация загрязненных нефтью земель: теория и практика / Ю. Л. Гуревич, В. С. Ковалев, В. П. Ладыгина, И. В. Таушева // Теоретические и практические вопросы мониторинга, предупреждения, ликвидации и рекультивации последствий нефтяного загрязнения: тез. докл. науч.-практ. конф. – Тюмень. – 2003. – С. 8-10.
27. Гуревич, Ю. Л. Дegradaция техногенных потоков вещества сообществом микроорганизмов и простейших / Ю. Л. Гуревич, В. П. Ладыгина, М. И. Теримова // Известия РАН. Серия биологическая. – 1995. – №2. – С. 226-230.
28. Гуреев, А. А. Применение автомобильных бензинов /А. А. Гуреев. – М.: Химия, 1972. – 368 с.

29. Гусев, М. В. Микробиология: учебник / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. – 4-е изд., стер. – Москва: Академия. 2003. – 464 с.
30. Гэрэлмаа, Т. Исследование процессов биодegradации вязких нефтей Монголии для создания методов увеличения нефтеотдачи и рекультивации нефтезагрязненных почв: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 02.00.13 / Гэрэлмаа, Тумэндэмбэрэл. – Томск, 2010. – 26 с.
31. Досбергенов, С. Н. Нефтехимическое загрязнение грунтовых вод и воды из нагона Каспия на месторождениях прибрежной полосы Восточного Прикаспия / С. Н. Досбергенов // Гидрометеорология и экология. – 2014. – №1. – С. 144-153.
32. Другов, Ю. С. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов. Практическое руководство: 2-е изд., перераб. и доп. / Ю. С. Другов, А. А. Родин. – Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. – 207 с.
33. Жизнь микробов в экстремальных условиях / Под ред. Кашнера Д. – Москва: Наука, 1981. – 521 с.
34. Жизнь растений. Т. 1. Введение. Бактерии и актиномицеты. / Под ред. Н. А. Красильникова, А. А. Уранова, А. А. Федоров. – Москва: Просвещение, 1974. – 487 с.
35. Заварзин, Г. А. Введение в природоведческую микробиологию: учебное пособие / Г. А. Заварзин, Н. Н. Колотилова. – Москва: Книжный дом «Университет», 2001. – 256 с.
36. Звягинцев, Д. Г. Биология почв: учебник / Д. Г. Звягинцев, И. П. Бабьева, Г. М. Зенова. – 3-е изд., испр. и доп. – Москва: Изд-во МГУ, 2005. – 445 с.
37. Звягинцев, Д. Г. Микроорганизмы в вечной мерзлоте // Успехи микробиологии. Вып. 25. Москва: Наука, 1992. С. 3-27.
38. Звягинцев, Д. Г. Некоторые концепции строения и функционирования комплекса почвенных микроорганизмов. – Вестн. МГУ, Сер. 17, Почвоведение, 1978, № 4, с. 48-56.
39. Звягинцев, Д. Г. Почва и микроорганизмы / Д.Г. Звягинцев. – Москва: МГУ, 1987. – 256 с.

40. Звягинцев, Д.Г., Зенова Г.М. Влияние влажности на развитие почвенных актиномицетов. // Почвы – национальное достояние России: Матер. IV съезда Докучаевского общества почвоведов. Новосибирск.: Наука-Центр, 2004. С. 33-35.
41. Зубайдуллин, А. А. К вопросу рекультивации нефтезагрязненных земель на верховых болотах / А. А. Зубайдуллин // Биологические ресурсы и природопользование: сб. науч. трудов. – Нижневартовск: Изд-во Нижневарт. пед. ин-та. – 1998. – Вып.2. – С. 106-116.
42. Зубайдуллин, А. А. Рекультивация нефтезагрязненных земель в Среднем Приобье: недостатки и основные причины низкой эффективности / А. А. Зубайдуллин // Биологические ресурсы и природопользование: сб. науч. трудов. – Сургут: Дефис. – 2003. – С. 129-139.
43. Илиенц, И. Р. Сообщества микромицетов пещер как источник штаммов для сельскохозяйственной и экологической биотехнологии: автореферат диссертации на соискание ученой степени канд. биол. наук: 03.02.08 / Илиенц Ильмира Робертовна. – Красноярск, 2011. – 19 с.
44. Исмаилов, Н. М. Влияние нефтяного загрязнения на круговорот азота в почве / Н. М. Исмаилов // Микробиология. – 1983. – Т.52. – Вып.6. – С. 1003-1007.
45. Капотина, Л. Н. Биологическая деструкция нефти и нефтепродуктов, загрязняющих почву и воду / Л. Н. Капотина, Г. Н. Морщакова // Биотехнология. – 1998. – №1. – С. 85-92.
46. Квасникова, Е. И. Микроорганизмы-деструкторы нефти в водных бассейнах / Е. И. Квасникова, Т. М. Ключникова. – Киев: Наукова Думка, 1981. – 131с.
47. Климат Красноярска / под ред. Ц.А. Швера, А.С. Герасимовой. – Ленинград: Гидрометеиздат, 1982. – 229 с.
48. Климентова, Е. Г. Рекультивация почв, загрязненных нефтепродуктами / Е. Г. Климентова, Т. А. Зудова, А. А. Мещерякова // Экология промышленного производства. – 2007. – №3. – С. 38-40.

49. Кожевин, П. А. Микробные популяции в природе / П. А. Кожевин. – Москва: МГУ, 1989. – 175 с.
50. Колесников, С.И. Изменение комплекса почвенных микроорганизмов при загрязнении чернозема обыкновенного нефтью и нефтепродуктами / С.И. Колесников, К.Ш. Казеев, Н.В. Велигонова [и др.] // Агрохимия. – 2007. – № 12. – С. 44–48.
51. Коронелли, Т. В. Внеклеточные метаболиты углеводородокисляющих бактерий как субстрат для развития сульфатредукции / Т. В. Коронелли, Т. И. Комарова, О. В. Поршнева, Л. Ф. Ткебучава // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т.37. – №5. – С. 549-553.
52. Коронелли, Т. В. Интродукция бактерий рода *Rhodococcus* в тундровую почву, загрязненную нефтью / Т. В. Коронелли, Т. И. Комарова, В. В. Ильинский, Ю. И. Кузьмин, Н. Б. Кирсанов, А. С. Яненко // Прикладная биохимия и микробиология. – 1997. – Т.33. – №2. – С. 198-201.
53. 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.
54. Костина Л. В. Аккумуляция солей тяжелых металлов клетками актинобактерий и использование *Rhodococcus*-биосурфактантов для мобилизации и извлечения тяжелых металлов из нефтезагрязненной почвы. Автореф. дис. канд. биол. наук. – Пермь, 2010.- 29 с.
55. Крайнов, С. Р., Рыженко, Б. Н., Швец, В. М. Геохимия подземных вод. Теоретические, прикладные и экологические аспекты / Отв. ред. Н. П. Лаверов. – Москва: Наука, 2004. – 677 с.
56. Красильников, Н. А. Микроорганизмы почвы и высшие растения / Н. А. Красильников. – Москва: Из-во Академии наук СССР, 1958. – 463 с.
57. Краткий определитель бактерий Берги / Под ред. Дж. Хоулта. – Москва: Мир, 1980. – 496 с.

58. Кривоносова, Г. М. Превращение азота медленнодействующих азотных удобрений в черноземе оподзоленном Лесостепи УССР / Г. М. Кривоносова, Е. И. Вервейко, Т. В. Басевич // *Агрохимия*. – 1985. – № 4. – С. 12-16.
59. Кузьмич, М. А. Эффективность форм азотных удобрений на дерново-подзолистой среднесуглинистой почве в условиях севооборота при орошении / М. А. Кузьмич, В. В. Переправо // *Агрохимия*. – 1985. – №4. – С. 6-11.
60. Кульман, А. Искусственные структурообразователи почвы / А. Кульман. – Москва: Колос, 1982. – 157 с.
61. Лакин, Г.Ф. Биометрия: учебник для вузов / Г. Ф. Лакин. – 4-е издание. – Москва: Высшая школа, 1990. – 352 с.
62. Ленгелер, Й. Современная микробиология: прокариоты: в 2 т.; пер. с англ. / Й. Ленгелер, Г. Дреус, Г.Шлегель. – Москва: Мир, 2005. – 695 с.
63. Логинова, О. О. Биодegradация нефтепродуктов в почве штаммами микроорганизмов р. *Acinetibacter* / О. О. Логинова, Е. В. Гриднева, С. С. Шалимова, М. Ю. Шевченко, Т. Т. Данг, М. Ю. Грабович // *Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. Межрегиональный сборник научных работ. Воронежский государственный университет, кафедра физиологии и биохимии клетки*. – Воронеж. – 2010. – С. 129-136.
64. Лозина-Лозинский, Л. К. Анабиоз как явление жизни. Анабиоз и преданабиоз микроорганизмов / Л. К. Лозина-Лозинский. – Рига.: Зинатне, 1973. – С. 5-12.
65. Лях, С. П. Адаптация микроорганизмов к низким температурам / С. П. Лях. – Москва: Наука, 1976. – 160 с.
66. Магистральный нефтепровод АНЖЕРО-СУДЖЕНСК-РАСНОЯРСК, ДУ 1000 ММ, 275,566-590,515 КМ, резервная нитка река Енисей. Участок ВОЗНЕСЕНКА-РЫБИНСКАЯ. 560,82КМ-571,2КМ. КРАСНОЯРСКОЕ РНУ. Реконструкция.: Проектная документация. – Раздел 7 Мероприятия по охране окружающей среды. – ЧАСТЬ 2 РЕКУЛЬТИВАЦИЯ. – Г.4.0000. 17057-ТНЗС /ГТП-500.000-Р ТОМ 7.2, 2016.

67. Медведков, А. А. Среднетаежные геосистемы бассейна р. Енисей в условиях меняющегося климата: автореф. дис. ... канд. геогр. наук: 25.00.36/ Медведков Алексей Анатольевич. – Москва, 2013. – 26 с.
68. Мелкозеров, В. М. Очистка нефтезагрязненных земель и водоемов Сибири с применением адсорбентов / В. М. Мелкозеров, С. И. Васильев, А. Я. Вельп, Л. Н. Горбунова, Ю. Л. Гуревич, В. П. Ладыгина, И. В. Трусей // Нефтепромышленное дело. – 2010. – №11. – С. 58-62.
69. Меньшикова, С. А. Особенности агротехники выращивания рукколы с применением вспененного карбамидоформальдегидного удобрения на мелиорируемых землях: автореф. дис. ... канд. сельхоз. наук: 06.01.02 / Меньшикова Снежана Александровна. – Москва, 2017. – 23 с.
70. Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в почвах и донных отложениях методом ИК-спектроскопии. ПНД Ф 16.1:2.2.22-98, Москва, 1998.
71. Методические рекомендации по выявлению, обследованию, паспортизации и оценке экологической опасности очагов загрязнения геологической среды нефтепродуктами. Москва: ГИДЭК, 2002 г.
72. Методы общей бактериологии / Ред. Ф. Герхардта и др. Москва: Мир, 1983. – 536 с.
73. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Ред. Д. Г. Звягинцева. – Москва: МГУ, 1991.
74. Назаров, А. В. Микробно-растительное взаимодействие при нефтяном загрязнении дерново-подзолистых почв южной тайги Предуралья: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Красноярск, 2013.- 19 с.
75. Намсараев, Б. Б. Экология микроорганизмов экстремальных водных экосистем / Б.Б. Намсараев, Е.Ю. Абидуева, Е.В. Лаврентьева и др. – Улан-Уде: Изд-во БГУ, 2008. – 94 с.
76. Нестеренко, Е. В. Микромицеты карстовых полостей Средней Сибири: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16 / Нестеренко Елена Владимировна. – Красноярск, 2007. – 19 с.

77. Нечаева, И. А. Биодegradация углеводов нефти психотрофными микроорганизмами-деструкторами: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Нечаева, Ирина Александровна. – Пущино, 2009. – 175 с.
78. Овсянкина, С. В. Эколого-биологические характеристики бактерий низкотемпературных пещер Сибири, Дальнего Востока и Западного Кавказа: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16 / Овсянкина Софья Владимировна. – Красноярск, 2013. – 19 с.
79. Определитель бактерий Берджи. – М.: Мир, 1997. – 780 с.
80. Основы гидрогеологии. Общая гидрогеология / Ред. Е.В. Пиннекер и др. – Новосибирск.: Наука, 1980. – 225 с.
81. Паников, Н. С. Меристический анализ природных микробных сообществ и его приложение в биотехнологии / Н. С. Паников // Биоценоз в природе и промышленных условиях: сб. науч. трудов. – Пущино, 1987. – С. 11-20.
82. Паничева, Л. П. Биохимическая трансформация нефтяных углеводов в водах Западной Сибири / Л. П. Паничева, Т.И. Моисеенко, Т.И. Кремлева, С.С. Волкова // Вестник Тюменского государственного университета. – 2012. – №12. – С. 38-48.
83. Перетрухина, И. В. Определение скоростей биодegradации нефтяных углеводов в воде литорали Кольского залива / И. В. Перетрухина, В. В. Ильинский, М. Ю. Литвинова // Вестник Мурманского государственного технического университета. – 2006. – Т.9. – №5. – С. 828-832.
84. Перт, С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. / С. Дж. Перт. – Москва: Мир, 1978. – 332 с.
85. Пикунов, С. В. Рациональное природопользование при территориальном совмещении нефтяных и торфяных месторождений / С. В. Пикунов, К. И. Лопатин, И. А. Юсупов, В. И. Толстограй // Биологические ресурсы и природопользование: сб. науч. трудов. – Сургут: Дефис, 2003. – С. 120-128.
86. Плакунов, В. К. Основы динамической биохимии: учебник / В. К. Плакунов, Ю. А. Николаев. – Москва: Логос, 2010. – 216 с.

87. Плешакова, Е. В. Деградация минерального масла штаммом *Acinetobacter calcoaceticus* / Е. В. Плешакова, А. Ю. Муратова, О. В. Турковская // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т. 37. – №4. – С. 398-404.
88. Пономарева, Л. В. Биоремедиация нефтезагрязненной почвы с использованием биопрепарата «БИОСЭТ» и пероксида кальция / Л. В. Пономарева, В. Г. Крунчак, В. А. Торгованова, Н. П. Цветкова, А. И. Осипов // Биотехнология. – 1998. – № 1. – С. 79-84.
89. Радкевич, В. А. Экология \ В. А. Радкевич. – Минск: Высшая школа, 1998. – 159 с.
90. Радов, А. С. Практикум по агрохимии /А. С. Радов, И. В. Пустовой, А. В. Корольков. – Москва: Колос, 1971. – 335 с.
91. Репина, М. А. Нефтеуглеводородокисляющие микроорганизмы прибрежных вод юга острова Сахалин: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Владивосток, 2009. – 19 с.
92. Ринькис, Г. Я. Методы анализа почв и растений / Г. Я. Ринькис, Х. К. Рамане, Т. А. Куницкая. – Рига: Зинатне, 1987. – 174 с.
93. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Ред. Н.С. Егорова. – Москва: МГУ, 1983. – 224 с.
94. Салангинас, Л. А. Изменение свойств почв под воздействием нефти и разработка системы мер по их реабилитации / Л. А. Салангинас. – Екатеринбург, 2003. – 411 с.
95. Салманов, М. А. Биодеградация хлорсодержащих ароматических соединений бактериями, выделенными из Азербайджанского побережья Каспийского моря / М. А. Салманов, М. Г. Велиев, А. А. Бабашлы, Н. Р. Бекташи // Вестник Московского Государственного Областного университета. – 2010. – №2. – С. 45-50.
96. Свирежев, Ю. М. Устойчивость биологических сообществ / Ю. М. Свирежев, Д. О. Логофет. – Москва: Наука, 1978. – 352 с.
97. Сидоров, Д. Г. Микробиологическая деструкция мазута в почве при использовании биопрепарата Деворойл / Д. Г. Сидоров, И. А. Борзенко, Е. И.

Милехина, С. С. Беляев, М. В. Иванов // Прикладная биохимия и микробиология. – 1998. – Т.34. – №3. – С. 281-286.

98. Судариков, С.М. Роль подземных вод в образовании метана на угольном месторождении Маохе (Северный Вьетнам) / С.М. Судариков, Нгуен Тат Тханг // Записки Горного института. – 2015. – Т. 212. – С. 79-83.

99. Скрыбин, Г. К. Использование микроорганизмов в органическом синтезе / Г. Н. Скрыбин, Л. А. Головлева. – Москва: Наука, 1976. – 336 с.

100. Таушева, И. В. Анализ численности углеводородокисляющих микроорганизмов в загрязненной нефтью почве / И. В. Таушева, Н. В. Андрушко // Экология Южной Сибири и сопредельных территорий: тез. конф. – Абакан. – 2002. – С. 38.

101. Таушева, И. В. Микрофлора почвы и грунта, загрязненных углеводородами нефти // И. В. Таушева. – Матер. конф. – Красноярск. – 2003. – С. 43-44.

102. Таушева, И. В. Оценка возможности деструкции углеводородов нефти в загрязненном грунте / И. В. Таушева, Ю. Л. Гуревич, В. П. Ладыгина, А. Ю. Озерский // Социальные проблемы инженерной экологии, природопользования и ресурсосбережения: матер. конф. – Красноярск. – 2003. – С. 194-200.

103. Таушева, И. В. Психрофильная микрофлора загрязненных углеводородами нефти почвы и грунта / И. В. Таушева // Экология Южной Сибири и сопредельных территорий: тез. конф. – Абакан. – 2003. – С. 38.

104. Тен Хак Мун. Закономерности и формирования и стабилизации микробоценозов в почве / Тен Хак Мун. – Москва: Наука, 1983. – 187 с.

105. Терещенко, Н. Н. Биологическая азотфиксация как фактор ускорения микробиологической деструкции нефтяных углеводородов в почве и способы ее стимулирования / Н. Н. Терещенко, С. В. Лушников, Е. В. Пышьева // Биотехнология. – 2004. – №5 – С. 69-79.

106. Трусей, И. В. Динамика численности углеводородокисляющих микроорганизмов в загрязненной нефтью почве зоны умеренного климата / И. В. Трусей, В. П. Ладыгина, Ю. Л. Гуревич // Почвы – национальное достояние

России: Матер. IV съезда Докучаевского общества почвоведов. – Новосибирск: Наука-Центр. – 2004. – С. 688.

107. Трусей, И. В. Распределение микроорганизмов в загрязненном нефтепродуктами грунте / И. В. Трусей, А. Ю. Озерский, В. П. Ладыгина, Ю. Л. Гуревич // Сибирский экологический журнал. – 2009. – №1. – Т. 16. – С. 29-35.

108. Трусей, И.В. Анализ содержания ионов нитрата и аммония при биоремедиации грунтовой воды, загрязненной нефтепродуктами / И.В. Трусей, Ю.Л. Гуревич, В.П. Ладыгина, Ю.П. Ланкин, С.В. Фадеев // Химия в интересах устойчивого развития. – 2017. – Т. 25. – №2. – С. 205-211.

109. Трусей, И.В. Влияние агрохимической обработки нефтезагрязненной почвы на динамику численности мезофильных и психрофильных микроорганизмов / И. В. Трусей, Ю.Л. Гуревич, В.П. Ладыгина // Поволжский экологический журнал. – 2016. – № 4. – С. – 467-475.

110. Фахрутдинов А. И., Алехин В. Г., Ямпольская Т. Д., Малышкина Л. А., Кортишко Т. И., Ситников А. В., Жирнова Т. А. Динамика микробиологических процессов при испытании биопрепаратов деструкции нефти в почвах // Биологические ресурсы и природопользование. Сб. науч. трудов. Сургут.: Дефис, 2003. С. 140-147.

111. Федоров, В. Д. Экология: учебник / В. Д. Федоров, Т. Г. Гильманов. – Москва: МГУ, 1980. – 463 с.

112. Филонов, А. Е. Микробные препараты для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений в условиях умеренного и холодного климат: дис. ... д-ра биол. наук: 03.01.06 / Филонов Андрей Евгеньевич. – Пушкино, 2016. – 407 с.

113. Хабибуллина, Ф. М. Исследование способности нефтеокисляющих бактерий утилизировать углеводороды нефти / Ф. М. Хабибуллина, А. А. Шубаков, И. Б. Арчегова, Г. Г. Романов // Микробиология. – 2002. – №6. – С. 57-62.

114. Хаустов, А. П. Загрязнение геологической среды нефтепродуктами при их хранении / А. П. Хаустов, М. М. Редина // Энергия: экономика, техника, экология. – 2012. – №6. – С. 19 – 28.

115. Хижняк, С. В. Методы статистической обработки в экологических и биологических исследованиях: учебное пособие / С. В. Хижняк, Е. Я. Мучкина. – Красноярск: Изд-во КрасГАУ, 2001. – 45 с.
116. Хижняк, С. В. Микробные сообщества карстовых пещер Средней Сибири: автореф. дисс. ... докт. биол. наук: 03.00.16 / Хижняк Сергей Витальевич. – Красноярск, 2009. – 32 с.
117. Хижняк, С. В. Некоторые итоги изучения микробных сообществ карстовых пещер Средней Сибири / С. В. Хижняк, Е. В. Нестеренко, А. А. Кимм, И. В. Трусей // Пещеры: охрана, история исследований, культура, туризм, современное состояние и перспективы научных исследований в пещерах на территории бывшего СССР: Материалы научно-практической конференции. Сб. науч. тр. – Красноярск. – 2009. – С. 226-227.
118. Хижняк, С. В. Психрофильные и психротолерантные гетеротрофные микроорганизмы карстовых полостей Средней Сибири / С. В. Хижняк, И. В. Таушева, А. А. Березикова, Е. В. Нестеренко, Д. Ю. Рогозин // Экология, 2003, № 4, С. 261-266.
119. Чижов, Б. Е. Рекультивация нефтезагрязненных земель Ханты-мансийского автономного округа / Б. Е. Чижов. – Тюмень: Из-во Тюменского Государственного университета, 2000. – 52 с.
120. Чугунов, В. А., Создание и применение жидкого препарата на основе ассоциации нефтеокисляющих бактерий / В. А. Чугунов, З. М. Ермоленко, С. К. Жиглецова, И. И. Мартовецкая, Р. И. Миронова, Н. А. Жиркова, В. П. Холоденко, Н. Н. Ураков // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000, – Т.36. – №6. – С. – 666-671.
121. Шамаева, А. А., Исследование процессов биоремедиации почв и объектов, загрязненных нефтяными углеводородами: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16, 03.00.23 / Шамаева Алия Азатовна. – Уфа, 2007. – 23 с.
122. Шараф, М. А. Хемометрика / М. А. Шараф, Д. Л. Иллмэн, Б. Р. Ковальски. – Ленинград: Химия, 1989. – 269 с.

123. Шкидченко, А. Н. Изучение нефтеструктурной активности микрофлоры прибрежной зоны Каспийского моря / Шкидченко А. Н., Аринбасаров М. У. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т.38. – №5. – С. – 509-512.
124. Шлегель, Г. Общая микробиология: учебник \ Г. Шлегель. – Москва: Мир, 1987. – 566 с.
125. Экология микроорганизмов: Учеб. для студ. вузов / А. И. Нетрусов, Е.А. Бонч-Осмоловская, В. М. Горленко и др.; Под ред. А. И. Нетрусова. – Москва: Издательский центр «Академия», 2004. – 272 с.
126. Эмер, Н. Р. Структурно-функциональные особенности групп микроорганизмов цикла азота в почвах с длительным применением минеральных удобрений: дис. ... к-та биол. наук: 03.02.03. / Эмер Наталья Рудольфовна. – Москва, 2016. – 136 с.
127. Ягодин, Б. А. Агрехимия. / Б.А. Ягодина. – М.: Агропромиздат, 1989. – 655 с.
128. Яновская, С. С. Слабоосновные соединения азота в нефтях и органическом веществе верхнеюрских отложений Западной Сибири / С. С. Яновская, Т. А. Сагаченко // Известия томского политехнического университета. – 2009. – № 3. – С 132-136.
129. Adams, G. O. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review / G. O. Adams, P. T. Fufeyin, S. E. Okoro, I. Ehinomen // International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation. – 2015. – V.3. – №1. – P. 28-39.
130. Al-Awadi, E. A preliminary investigation of the hydrocarbon content of groundwater of Kuwait / E. Al-Awadi, A. Mukhopadhyay, M. Quinn, T. Saeed, A. Hauser // Environmental Geology. – 2001. – №41. – P. 330-340.
131. Atlas, R. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation / R. Atlas // Marine Pollution Bulletin. – 1995. – №31. – P. 178-182.
132. Chun, C.L. Solubilisation of PAH mixtures by three different anionic surfactants / C.L. Chun, J.-J. Lee, J.-W. Park // Environmental Pollution. – 2002. – V. 118. – P. 307-313.

133. Coates, J.D. Emerging techniques for anaerobic bioremediation of contaminated environments / J.D. Coates, R.T. Anderson // *Tibtech*. – 2000. – V.18. – P. 408-412.
134. Edwards, E.A. Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions / E.A. Edwards, L.E. Wells, M. Reinhard, D. Grbic-Galic // *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992. V. 58. P. 794-800.
135. Eriksson, S. Indicators of Petroleum Hydrocarbon Biodegradation in Anaerobic Granitic Groundwater / S. Eriksson, T. Ankner, K. Abrahamsson, Åsa Sjöling // *Geomicrobiology Journal*. – 2006. – V.23. – P. 45–58.
136. Evans, F. F. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms / F. F. Evans, A. S. Rosado, G. V. Sebastian, R. Casella, P. L. O. A. Machado, C. Holmstrom, S. Kjelleberg, J. D. van Elsas, L. Seldin // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2004. – V.49. – P. 295–305.
137. Fjordbøge, A.S. Source zone remediation by zero valent iron technologies [Электронный ресурс] / A.S. Fjordbøge // PhD Thesis. – 2011. – www.env.dtu.dk.
138. Franzmann, P. The role of microbial populations in the containment of aromatic hydrocarbons in the subsurface / P. Franzmann, W. Robertson, L. Zappia, G. Davis // *Biodegradation*. – 2002. – V.13. – P. 65-78.
139. Harrison, A.B. Effect of protein hydrolysate on the degradation of diesel fuel in soil / A.B. Harrison // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2000. – V.26. – P. 388-393.
140. Holm, P.E. Importance of unattached bacteria and bacteria attached to sediment in determining potentials for degradation of xenobiotic organic contaminants in an aerobic aquifer / P.E. Holm, P.H. Nielsen, H.-J. Albrechtsen, T.H. Christensen // *Appl. Environ Microbiol.* – 1992. – V.58. – №.9. – P. 3020 – 3026.
141. Illmer, P. Solubilization of inorganic calcium phosphates – solubilization mechanisms / P. Illmer, F. Schinner // *Soil Biol. Biochem.* – 1995. – V.27. – №. 3. – P. 257-263.

142. Inoue, K. Quantitative ecology of microorganisms of Syowa station in Antarctica and isolation of psychrophiles / K. Inoue // J. Gen. Appl. Microbiol. – 1976. – V.22. – P.143-150.
143. In-situ Air Sparging (Engineer Manual) [Электронный ресурс] // Environment Quality. – 2013. –
http://www.publications.usace.army.mil/Portals/76/Publications/EngineerManuals/EM_200-1-19.pdf?ver=2014-01-06-104233-540 (дата обращения: 21.01.2018).
144. Ivshina, I.B. Oil spill problems and sustainable response strategies through new technologies / I.B. Ivshina, M.S. Kuyukina, A.V. Krivoruchko, A.A. Elkin, S.O. Makarov, C.J. Cunningham, T.A. Peshkur, R.M. Atlas, J.C. Philp // Environmental Sciences: Processes and Impacts. – 2015. – V.17. – № 7. – P. 1201-1219.
145. Johnson, C.R. Effect of nitrogen and phosphorus addition on phenanthrene biodegradation in four soils / C.R. Johnson, K.M. Scow // Biodegradation. – 1999. – V.10. – P. 43-50.
146. Kato, T. Isolation and characterization of psychrotrophic bacteria from oil-reservoir water and oil sands / T. Kato, M. Haruki, T. Imanaka, M. Morikawa, S. Kanaya // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – V.55. – P. 794-800.
147. Kleikempe J. Activity and Diversity of Sulfate-Reducing Bacteria in a Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Aquifer / J. Kleikempe, M. H. Schroth, W. V. Sigler, M. Schmucki, S. M. Bernasconi, J. Zeyer // Appl Environ Microbiol. – 2002. – V.68(4). – P. 1516–1523.
148. Ladygina, V. P. Bioremediation of the fuel oil contaminated subsurface [Электронный ресурс] / V. P. Ladygina, I. V. Trusey, Y. L. Gurevich // The 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, Vol. V: Environmental Pollution and Public Health. – Shanghai. – 2008. –
<http://ieeexplore.ieee.org/servlet/opac?punumber=4534879> (дата обращения: 21.01.2018).
149. Lankin, Yu. P. Yu. Assessment of the Human Impact on the Aquatic Ecosystem of Lake Shira using Neural Network Methods / Yu. P. Lankin, T. I.

Lobova, L. Yu. Popova // *Optical Memory and Neural Networks*. – Vol.15, No. 2, 2006. – P. 65-73.

150. Lovley, D.R. Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction / D.R. Lovley, M.J. Baedeker, D.J. Lonergan, I.M. Cozarelli, E.J.P. Philips // *Nature*. – 1989. – V.339. P. 297-299.

151. Mandelbaum, R. In situ microcosms in aquifer bioremediation studies / R. Mandelbaum, M. Shati, D. Ronen // *FEMS Microbiology Reviews*. – 1997. – V.20. – P. 489-502.

152. Männistö, M. In situ polychlorophenol bioremediation potential of the indigenous bacterial community of boreal groundwater / M. Männistö, M. Salkinoja-Salonen, J. Puhakka // *Water Research*. – 2001. – V.35 – P. 2496-2504.

153. Margesin, R. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments / R. Margesin, F. Schinner // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – V. 56. – P. 650-663.

154. Margesin, R. Biodegradation of diesel fuel by cold-adapted microorganisms in presence of sodium dodecyl sulfate / R. Margesin, F. Schinner // *Chemosphere*. – 1999. – V.38. – №15. – P. 3463-3472.

155. Margesin, R. Biological decontamination of oil spills in cold environments / R. Margesin, F. Schinner // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* – 1999. – V.74. – P. 381–389.

156. Margesin, R. Cold-loving microbes, plants, and animals-fundamental and applied aspects / R. Margesin, G. Neuner, K. B. Storey // *Naturwissenschaften*. – 2007. – №94 – P. 77–99.

157. Margesin, R. Monitoring of bioremediation by soil biological activities / R. Margesin, A. Zimmerbauer, F. Schinner, // *Chemosphaera*. – 2000. – V.40. – P. 339-346.

158. Margesin, R. Potential of cold-adapted microorganisms for bioremediation of oil-polluted Alpine soils / R. Margesin // *International Bioremediation and Biodegradation*. – 2000. – V.46. – P. 3-10.

159. Margesin, R. Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology / R. Margesin, F. Schinner, J.-C. Marx, C. Gerday (Eds.): Springer, 2008. – 455 p.

160. Mohammed, D. An Assessment of the Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Contaminated Soil Using Non-indigenous, Commercial Microbes / D. Mohammed, A. Ramsubhag, D.M. Beckles // *Water, Air, & Soil Pollution*. – 2007. – V.182(1-4). – P. 349 – 356.
161. Moran, B. Trichloroethylene biodegradation by mesophilic and psychrophilic ammonia oxidizers and methanotrophs in groundwater microcosms / B. Moran, W. Hickey, *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – V.63. – P. 3866-3871.
162. Moyer, C. L. Effect of growth rate and starvation-survival on the viability and stability of psychrophilic marine bacterium / C. L. Moyer, R. Y. Morita // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1989. – V.55. – №5. – P. 1122-1127.
163. Okhonin, V. Neural network based approach to the Evaluation of Degradation Lifetime / V. Okhonin, S. Okhonin, A. Ils, M. Ilegemres // *Neural Network World*. – 2001. – V.11. – №2. – P. 145-151.
164. Parry, G. D. The meanings of r- and k-selection / G. D. Parry // *Oecologia*. – 1981. – V.48. – P. 260-264.
165. Rivett, M. O. Nitrate attenuation in groundwater: A review of biogeochemical controlling processes / M. O. Rivett, S. R. Buss, Ph. Morgan, J. W. N. Smith, C. D. Bemment // *Water research*. – 2008. – V.42. – P. 4215-4232.
166. Robertson, B. K. Influence of calcium, iron, and pH on phosphate availability for microbial mineralization of organic chemicals / B. K. Robertson, M. Alexander // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1992. – V. 58. – P. 38-41.
167. Romantschuk, M. Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches / M. Romantschuk, I. Sarand, T. Petänen, R. Peltola, M. Jonsson-Vihanne, T. Koivula, K. Yrjälä, K. Haahtela // *Environ. Pollution*. – 2000. – V.107. – P. 179-185.
168. Rosenberg, E. High- and low-molecular-mass microbial surfactants / E. Rosenberg, E.Z. Ron // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1999. – V. 52. – P. 154-162.
169. Sanders, E.R. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods [Электронный ресурс] / E.R. Sanders // *Journal of Visualized Experiments*. – 2012. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/225056141> (дата обращения: 12.01.2018).

170. Schinner, F. *Bodenbiologische Arbeitsmethoden* / F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler, R. Margesin (Hrsg.). 2 Aufl. – Berlin: Springer, 1993. – 389 p.
171. Schmidt, L. Biodegradation of low aqueous concentration pentachlorophenol (PCP) contaminated groundwater / L. Schmidt, J. Delfino, J. Preston, G. Laurent // *Chemosphera*. – 1999. – V.38. – P. 2897-2912.
172. Simpanen, S. Biostimulation proved to be the most efficient method in the comparison of in situ soil remediation treatments after a simulated oil spill accident / S. Simpanen, M. Dahl, M. Gerlach, V. Malk, J. Mikola, M. Romantschuk, A. Mikkonen // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2016. – V.23. – №24. – P. 25024-25038.
173. Singer, A. W. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation (Review) / A. W. Singer, D. T. Crowley, I. P. Thompson // *Trends in Biotechnology*. – 2003. – V.31. – №3. – P. 123-130.
174. Sorvari, J. Eco-efficiency in contaminated land management in Finland — barriers and development needs / J. Sorvari, R. Antikainen, M-L. Kosola, P. Hokkanen, T. Haavisto // *J. Environ. Manag.* – 2009. – V.90. – P. 1715–1727.
175. Swindoll, C. M. Influence of inorganic nutrients on aerobic biodegradation and on the adaptation response of subsurface microbial communities / C. M. Swindoll, C. M. Aelion, F. K. Pfaender // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1988. – V.54. – №1. – P. 212-217.
176. Thouand, G. Laboratory evaluation of crude oil biodegradation with commercial or natural microbial inocula / G. Thouand, P. Bauda, J. Oudot, G. Kirsch, C. Sutton, J. Vidalie // *Can. J. Microbiol.* – 1999. – №45. – P. 106 – 115.
177. Thurmann, U. Correlation between microbial ex situ activities of two neighbouring uncontaminated and fuel oil contaminated subsurface sites / U. Thurmann, C. Zanto, C. Schmitz, A. Vomberg, W. Püttmann, U. Klinner // *Biotechnology Techniques*. – 1999. – V.13. – P. 271-275.
178. Trusei, I. V. Distribution of microorganisms in the oil-polluted ground of vadose and saturation zones / I. V. Trusei, V. P. Ladygina, Yu. L. Gurevich, A. Yu. Ozerskii // *Contemporary Problems of Ecology*. – 2009. – T. 2. – № 1. – C. 22-26.

179. Venosa, A. D. Efficacy of commercial products in enhancing oil biodegradation in closed laboratory reactors / A. D. Venosa, J. R. Haines, W. Nisamanepong, R. Goving, S. Pradhan, B. Siddique // *J. Ind. Microbiol.* – 1992. – №10. – P. 13 – 23.
180. Vogt, C. Bioremediation via in situ microbial degradation of organic pollutants / C. Vogt, H. H. Richnow // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* – 2014. – V.142. – P. 123-146.
181. Wang, Q. Potential Approaches to Improving Biodegradation of Hydrocarbons for Bioremediation of Crude Oil Pollution / Q. Wang, S. Li Y., Zhang, W. Klassen // *Journal of Environmental Protection.* – 2011. – №2. – P. 47-55.
182. Wang, S.-J. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils by cold-adapted microorganisms: research advance / S.-J. Wang, X. Wang, Q.-H. Wang, G.-L. Lu, F.-S. Li, G.-L. Guo // *Chinese Journal of Applied Ecology.* – 2011. – V.22. № 4. – P. 1082-1088.
183. Werner, F. T. Bioventing pilot test results at the low point drain area / F. T. Werner, J. E. Walters, G. B. Keefer // *Offut AFB, Bioremediation of Surface and Subsurface Contamination.*: Bajpai R. K., Zappi M. E. (Eds.). – Nebraska.: New York, 1997. – P. 313-325.
184. Whyte, L. Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by psychrotrophic *Rhodococcus* sp. / L. Whyte, J. Hawari, E. Zhou, L. Bourbonniere, W. Inniss, C. Greer // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – V.64. – P. 2578-2584.
185. Williams, R. Intrinsic bioremediation in a solvent-contaminated alluvial groundwater / R. Williams, K. Shuttle, E. Kunkler, E. Madsen, S. Hooper // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 1997. – V.18. – P. 177-188.
186. Wilson, L. Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review / L. Wilson, E. Bouwer // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 1997. – V.18 – P. 116-130.
187. Wolicka, D. Microorganisms and Crude Oil [Электронный ресурс] / D. Wolicka and A. Borkowski // *Introduction to Enhanced Oil Recovery (EOR) Processes and Bioremediation of Oil-Contaminated Sites*, Dr. Laura Romero-Zerón

(Ed.): InTech. – 2012. – URL: <https://www.intechopen.com/books/introduction-to-enhanced-oil-recovery-eor-processes-and-bioremediation-of-oil-contaminated-sites/microorganisms-and-crude-oil> (дата обращения: 18.01.2018).

188. Xu, R. Effect of nutrient amendments on indigenous hydrocarbon biodegradation in oil contaminated beach sediments / R. Xu, J. P. Obbard // J. Environ. Qual. – 2003. – V.32. – P. 1234–1243.

189. Zhang, Z.Z. Improvement of natural microbial remediation of petroleum-polluted soil using graminaceous plants / Z.Z. Zhang, S.M. Su, Y.J. Luo, M. Lu // Wat. Sci. Technol. – 2009. – V.59. – №5. – P. 1025 – 1035.

Приложения

Приложение 1

Рост изолятов микроорганизмов, выделенных на ММС с разными типами углеводов

№	Шифр изолята	Дизельное топливо	M ₁₀ G ₂	бензол	октан
1	1-1	+++	+	++	++
2	1-2	++	++	++	++
3	1-3	++	++	+	+
4	1-4	+	++	+/-	++
5	1-5	++	+	+	+
6	1-6	++	+	+	+
7	1-7	++	+	+	+
8	1-8	+	+	+	++
9	2-2	++	++	+	+++
10	3-1	+	+	+	+
11	3-2	++	++	+	+
12	3-3	+	+	+	+/-
13	3-4	++	+	++	+
14	3-5	++	-	++	+
15	3-6	++	++	+	++
16	4-1	+++	++	+/-	+++
17	4-2	+++	+	+++	+/-
18	4-3	++	+	+/-	++
19	4-4	++	+	+/-	+++
20	4-5	+++	+++	+/-	+++
21	6-3	+/-	-	+/-	+
22	6-4	+	+/-	+	+/-

Приложение 2

Таблица 1

Интенсивность роста (в баллах) изолятов психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов при разных температурах

Среда	№ изолята	Температура культивирования				
		+5	+10	+18	+28	+35
Пептонный агар	1-1	3	3	4	4	2
	1-2	2	3	4	4	2
	1-3	3	3	4	3	2
	1-4	3	3	4	3	0
	1-5	3	3	3	4	3
	1-6	3	3	2	4	3
	1-7	2	2	4	3	3
	1-8	2	2	3	2	0
Минерально- солевая среда с нефтью	1-1	0	1	3	4	2
	1-2	0	1	3	4	2
	1-3	0	1	4	4	2
	1-4	0	2	3	3	0
	1-5	0	1	4	4	2
	1-6	0	1	2	4	3
	1-7	0	1	4	3	0
	1-8	0	1	4	3	0

*Примечание: отсутствие роста – 0 баллов, слабый рост – 1 балл, умеренный рост – 2 балла, сильный рост – 3 балла, интенсивный рост – 4 балла.

Приложение 3

Численность аммонифицирующих и углеводородокисляющих микроорганизмов в почвенном покрове на опытных площадках, с нефтяным загрязнением

Дата	Номер опытной площадки, с разными способами внесения реагентов и ассоциаций микроорганизмов				
	№1	№2	№3	№4	№5
Численность психрофильных аммонифицирующих, КОЕ/г * 10 ⁷					
30.5.02	0,51±0,05	0,51±0,05	0,51±0,05	0,51±0,05	0,51±0,05
1.7.02	12,40±1,30	27,30±1,30	13,00±1,30	13,40±0,90	13,80±0,80
23.7.02	5,80±0,60	3,40±0,50	16,00±0,10	18,00±0,90	5,20±0,60
30.8.02	13,00±1,00	61,00±2,00	33,00±0,14	39,00±1,30	6,20±0,60
9.10.02	23,00±1,10	3,50±0,40	17,00±2,50	6,40±0,60	0,87±0,22
5.3.03	39,10±1,40	82,90±2,30	91,00±2,50	67,20±2,00	3,48±1,40
3.6.03	20,10±1,10	32,00±1,50	13,70±1,00	35,30±0,70	9,84±0,80
8.7.03	3,86±0,48	7,76±0,68	20,40±1,20	11,70±0,80	3,94±0,50
12.8.03	5,52±0,58	9,53±0,78	2,85±0,40	9,89±0,66	3,66±0,46
30.9.03	2,32±0,04	0,78±0,23	2,55±0,04	9,25±0,75	5,33±0,59
Численность мезофильных аммонифицирующих, КОЕ/г * 10 ⁷					
30.5.02	3,86±0,35	0,73±0,08	3,70±0,40	43,00±5,00	3,60±0,40
1.7.02	4,60±0,45	31,00±3,50	15,10±1,50	7,50±0,90	7,67±0,80
23.7.02	720,00±50,00	39,00±3,50	66,00±7,00	22,00±2,10	16,00±1,50
30.8.02	47,00±5,00	32,00±3,00	87,00±9,00	33,00±3,30	31,00±3,00
9.10.02	86,00±0,90	31,00±3,00	85,00±10,00	110,00±15,0	2,20±0,20
5.3.03	42,10±1,50	149,20±19,00	389,50±40,00	81,50±8,20	5,20±0,50
3.6.03	742,10±55,00	356,00±36,00	351,50±35,00	51,90±5,50	24,10±2,50
8.7.03	80,50±0,80	77,00±8,00	89,60±9,00	71,00±7,00	15,00±1,50
12.8.03	136,6±14,00	35,90±3,60	19,97±2,00	95,89±10,00	7,16±0,90
30.9.03	28,3±3,0	33,50±3,40	46,90±5,00	125,00±13,00	30,50±5,0
Численность психрофильных углеводородокисляющих, КОЕ/г * 10 ⁷					
31.5.02	0,20±0,02	0,20±0,02	0,20±0,02	0,20±0,02	0,20±0,02
1.7.02	6,40±0,60	21,00±1,30	7,40±0,70	6,60±0,90	3,10±0,50
23.7.02	0,37±0,46	0,85±0,08	3,70±0,17	1,60±0,90	0,42±0,03
30.8.02	14,00±0,30	2,60±0,15	8,70±0,24	7,60±0,07	1,70±0,10
9.10.02	6,10±0,18	3,50±0,13	3,50±0,50	2,90±0,12	2,30±0,11
5.3.03	1,56±0,17	0,74±0,12	2,00±0,20	1,12±0,15	0,58±0,05
3.6.03	5,28±0,56	6,97±0,71	10,80±0,90	12,30±0,90	2,77±0,42
8.7.03	1,41±0,10	1,56±0,10	3,37±0,15	2,33±0,10	1,60±0,11
12.8.03	1,46±0,09	1,32±0,09	0,87±0,03	1,51±0,08	0,53±0,05
30.9.03	1,81±0,10	1,2±0,09	2,02±0,12	1,16±0,09	0,92±0,08
Численность мезофильных углеводородокисляющих, КОЕ/г * 10 ⁷					
31.5.02	0,0014±0,001	0,04±0,01	0,054±0,01	0,043±0,01	0,0015±0,001
1.7.02	0,77±0,08	3,62±0,50	15,10±1,80	2,92±0,50	2,92±0,50
23.7.02	13,00±1,50	6,10±0,70	50±5,50	9,00±1,00	3,50±0,50
30.8.02	5,70±0,90	8,30±0,90	33,00±3,50	9,80±1,20	0,48±0,05
9.10.02	57,00±9,00	31,00±5,00	68,00±9,00	2,4±0,5	0,20±0,05
5.3.03	7,02±0,90	49,75±5,00	389,6±50,00	81,50±9,00	3,28±0,400
3.6.03	135,6±15,00	74,96±9,00	35,20±3,50	38,00±5,00	24,10±2,50
8.7.03	9,70±1,00	6,16±0,90	5,37±0,90	8,52±0,900	0,37±0,05
12.8.03	7,59±0,90	8,16±0,90	12,84±1,50	95,89±10,00	1,15±0,50
30.9.03	5,95±0,60	3,35±0,40	25,1±2,50	7,82±0,90	0,8±0,09

Приложение 4

Таблица 1

Численность анаэробных микроорганизмов в образцах грунта инженерно-геологической скважины мазутного хозяйства ТЭЦ до проведения биоремедиационных мероприятий (Дата отбора 16.06.2004)

Температурная группа микроорганизмов	Численность микроорганизмов, КОЕ/г						
	Физиологическая группа / Пределы	Глубина, м					
		0.05-0.2	1.0-1.2	1.9-2.3	2.9-3.2	3.9-4.2	4.9-5.1
Мезофильные	Денитрификаторы	1.62*10 ⁴	4.8*10 ⁴	4.73*10 ⁴	4.1*10 ⁴	2.55*10 ⁴	1.57*10 ⁴
	Верхний	0.36*10 ⁴	1.03*10 ⁴	1.01*10 ⁴	0.88*10 ⁴	0.12*10 ⁴	0.33*10 ⁴
	Нижний	7.58*10 ⁴	22.48*10 ⁴	22.13*10 ⁴	19.20*10 ⁴	11.93*10 ⁴	7.35*10 ⁵
	Железоредукторы	4.32*10 ²	3.74*10 ²	2.10*10 ³	2.56*10 ³	2.55*10 ²	2.61*10 ²
	Верхний	0.92*10 ²	0.80*10 ²	0.45*10 ³	0.55*10 ³	0.54*10 ²	0.56*10 ²
	Нижний	20.22*10 ²	17.50*10 ²	9.83*10 ³	11.99*10 ³	11.93*10 ²	12.22*10 ²
	Сульфатредукторы	0.43*10 ²	0.43*10 ²	4.73*10 ²	9.74*10 ²	4.08*10 ³	7.84*10 ³
	Верхний	0.092*10 ²	0.09*10 ²	1.01*10 ²	2.08*10 ²	0.87*10 ³	1.68*10 ³
	Нижний	2.02*10 ²	1.99*10 ²	22.14*10 ²	45.58*10 ²	19.09*10 ³	36.69*10 ³
	Психрофильные	Денитрификаторы	1.03*10 ⁴	2.13*10 ³	9.98*10 ⁴	9.74*10 ⁴	4.59*10 ⁴
Верхний		0.22*10 ⁴	0.46*10 ³	2.13*10 ⁴	2.08*10 ⁴	0.98*10 ⁴	0.78*10 ³
Нижний		4.80*10 ⁴	9.99*10 ³	46.73*10 ⁴	45.59*10 ⁴	21.50*10 ⁴	17.11*10 ³
Железоредукторы		0.43*10 ²	1.60*10 ²	9.99*10 ²	9.74*10 ²	9.70*10 ²	3.13*10 ²
Верхний		0.092*10 ²	0.34*10 ²	2.13*10 ²	2.08*10 ²	2.07*10 ²	0.67*10 ²
Нижний		2.02*10 ²	7.49*10 ²	46.73*10 ²	45.59*10 ²	45.56*10 ²	14.67*10 ²
Сульфатредукторы		Н.о.*	0.43*10 ²	4.73*10 ²	2.05*10 ²	3.06*10 ²	4.7*10 ³
Верхний		-	0.091*10 ²	1.01*10 ²	0.44*10 ²	0.65*10 ²	1.00*10 ³
Нижний	-	1.99*10 ²	22.14*10 ²	9.59*10 ²	14.32*10 ²	22.00*10 ³	

*Примечание: Н.о. – не обнаружено, « - » – не определяли.

Численность анаэробных микроорганизмов в образцах грунта инженерно-геологической скважины мазутного хозяйства ТЭЦ после проведения биоремедиационных мероприятий (Дата отбора 04.11.2005)

Температурная группа микроорганизмов	Численность микроорганизмов, КОЕ/г					
	Физиологическая группа / Пределы	Глубины, м				
		0-1	1-2	2-3	3-4	4-5.2
Мезофильные	Денитрификаторы	$1.04 \cdot 10^3$	$2.64 \cdot 10^2$	$3.04 \cdot 10^2$	$4.63 \cdot 10^2$	$1.15 \cdot 10^4$
	Верхний	$0.22 \cdot 10^3$	$0.56 \cdot 10^2$	$0.65 \cdot 10^2$	$0.99 \cdot 10^2$	$0.25 \cdot 10^4$
	Нижний	$4.86 \cdot 10^3$	$12.37 \cdot 10^2$	$14.2 \cdot 10^2$	$21.66 \cdot 10^2$	$5.40 \cdot 10^4$
	Железоредукторы	$1.64 \cdot 10^3$	$0.95 \cdot 10^2$	$0.91 \cdot 10^2$	$0.72 \cdot 10^2$	Н.о.*
	Верхний	$0.35 \cdot 10^3$	$0.20 \cdot 10^2$	$0.19 \cdot 10^2$	$0.154 \cdot 10^2$	-
	Нижний	$7.67 \cdot 10^3$	$4.45 \cdot 10^2$	$4.27 \cdot 10^2$	$3.37 \cdot 10^2$	
	Сульфатредукторы	$0.76 \cdot 10^2$	$0.32 \cdot 10^2$	$0.41 \cdot 10^2$	$0.93 \cdot 10^2$	$0.94 \cdot 10^2$
	Верхний Нижний	$0.16 \cdot 10^2$ $3.58 \cdot 10^2$	$0.068 \cdot 10^2$ $1.48 \cdot 10^2$	$0.086 \cdot 10^2$ $1.83 \cdot 10^2$	$0.20 \cdot 10^2$ $4.33 \cdot 10^2$	$0.20 \cdot 10^2$ $4.41 \cdot 10^2$
Психрофильные	Денитрификаторы	$1.04 \cdot 10^3$	$2.64 \cdot 10^2$	Н.о.	Н.о.	$1.57 \cdot 10^2$
	Верхний	$0.22 \cdot 10^3$	$0.56 \cdot 10^2$	-	-	$0.34 \cdot 10^2$
	Нижний	$4.86 \cdot 10^3$	$12.37 \cdot 10^2$			$7.36 \cdot 10^2$
	Железоредукторы	+	+	+	+	+
	Верхний	-	-	-	-	-
	Нижний					
	Сульфатредукторы	$0.98 \cdot 10^2$	$2.12 \cdot 10^2$	$0.61 \cdot 10^2$	$1.13 \cdot 10^2$	$4.2 \cdot 10^2$
Верхний, нижний пределы	$0.21 \cdot 10^2$ $4.6 \cdot 10^2$	$0.46 \cdot 10^2$ $9.90 \cdot 10^2$	$0.13 \cdot 10^2$ $3.85 \cdot 10^2$	$0.24 \cdot 10^2$ $5.30 \cdot 10^2$	$0.89 \cdot 10^2$ $19.6 \cdot 10^2$	

*Примечание: Н.о. – не обнаружено, « + » – наличие роста, « - » – не определяли.

Приложение 5

Таблица 1

Динамика численности мезофильных и психрофильных микроорганизмов в грунтовых водах скважины 159 на территории мазутного хозяйства ТЭЦ.

Дата	Численность микроорганизмов разных эколого-трофических групп, КОЕ/мл *10 ⁵			
	Аммонифицирующие		Углеводородоокисляющие	
	Мезофильные	Психрофильные	Мезофильные	Психрофильные
23.6.05	1,45±0,05	0,74±0,046	1,26±0,21	0,6±0,32
30.8.05	13,9±0,4	13,00±1,6	9,66±4,55	1,07±0,86
23.9.05	380±22	6,68±5,7	31,6±18,0	3,18±2,9
1.10.05	20,5±6,5	8,08±2,73	6,2±2,6	0,78±0,55
23.5.06	1790±1040	886±443	231±140	71,6±44
31.10.06	208±133	2670±940	141±90	398±283

Приложение 6

Таблица 1

Парные корреляции показателей химического состава грунтовых вод в скважинах
(октябрь 2005 г.)

	NH ₄	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	HCO ₃ ⁻	Fe общ.	SO ₄ ²⁻	pH	CO ₂	KMnO ₄
NH ₄	1								
NO ₃ ⁻	-0,14368	1							
NO ₂ ⁻	0,258807	0,804988	1						
HCO ₃ ⁻	-0,20826	-0,33099	-0,54356	1					
Fe общ.	-0,20891	-0,07279	-0,24075	0,399121	1				
SO ₄ ²⁻	0,949018	0,068159	0,412363	-0,11128	-0,22438	1			
pH	-0,60393	-0,22573	-0,68476	0,808562	0,358602	-0,53904	1		
CO ₂	0,896404	0,275246	0,566236	-0,3445	-0,09981	0,913451	-0,676	1	
KMnO ₄	0,896622	-0,21557	0,190659	-0,08115	0,167544	0,80555	-0,5321	0,82779	1

Уровень значимости <0,05

Скважина: 237, 159, 239, 238, 160, 589, 588, 586, 240

Таблица 2

Парные корреляции показателей химического состава грунтовых вод в скважинах
(март 2006 г.)

	NH ₄	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	HCO ₃ ⁻	Fe общ.	SO ₄ ²⁻	pH	CO ₂	KMnO ₄
NH ₄	1								
NO ₃ ⁻	0,2437	1							
NO ₂ ⁻	0,912		1						
HCO ₃ ⁻	-0,30826	-0,833	-0,64356	1					
Fe общ.	-0,211	-0,08279	-0,24075	-0,44356	1				
SO ₄ ²⁻	-0,678	0,08159	0,412363	-0,25075	-0,22438	1			
pH	-0,50393	-0,23573	-0,58476	0,717	0,358602	0,417984	1		
CO ₂	0,6640	0,27525	0,466236	-0,2445	-0,09981	-0,1846	-0,576	1	
KMnO ₄	0,686	-0,31557	0,290659	-0,09115	0,167544	-0,1034	-0,6321	0,399121	1

Уровень значимости <0,05

Скважина: 237, 159, 239, 238, 160, 589, 588, 586, 240

Таблица 3

Парные корреляции показателей химического состава грунтовых вод в скважинах
(октябрь 2006 г.)

	NH ₄	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	HCO ₃ ⁻	Fe общ.	SO ₄ ²⁻	pH	CO ₂	KMnO ₄
NH ₄	1								
NO ₃ ⁻	-0,19982	1							
NO ₂ ⁻	0,404236	-0,18406	1						
HCO ₃ ⁻	0,920652	-0,07631	0,324666	1					
Fe общ.	0,317294	-0,16182	0,995066	0,235248	1				
SO ₄ ²⁻	-0,11125	0,766206	0,088246	0,040442	0,105164	1			
pH	-0,51957	0,688445	-0,12018	-0,38598	-0,0678	0,377984	1		
CO ₂	0,974656	-0,15723	0,228585	0,946698	0,134343	-0,0846	-0,51338	1	
KMnO ₄	0,863861	-0,22818	0,280578	0,938974	0,189099	-0,09034	-0,4621	0,906012	1

Уровень значимости <0,05

Скважина: 237, 159, 239, 238, 160, 589, 588, 586, 240, а также 157 и 161

Таблица 4

Парные корреляции показателей химического состава грунтовых вод в скважинах
(апрель 2007 г.)

	NH ₄	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	HCO ₃ ⁻	Fe общ.	SO ₄ ²⁻	pH	CO ₂	KMnO ₄
NH ₄	1								
NO ₃ ⁻	-0,31163	1							
NO ₂ ⁻	-0,09434	-0,31471	1						
HCO ₃ ⁻	0,931657	-0,30463	-0,06478	1					
Fe общ.	0,862854	-0,40918	0,069254	0,797881	1				
SO ₄ ²⁻	0,268077	0,671911	-0,16699	0,27342	0,072143	1			
pH	0,33979	0,06014	0,305487	0,488819	0,104707	0,258402	1		
CO ₂	0,497435	-0,4421	-0,23469	0,637348	0,611466	-0,0876	-0,14376	1	
KMnO ₄	0,01119	-0,34033	-0,29866	0,219355	0,026577	-0,36425	-0,08682	0,695295	1

Уровень значимости <0,05

Скважина: 237, 239, 238, 160, 589, 588, 586, 240, 157, 161

**«Общество с Ограниченной Ответственностью
Минусинская гидрогеологическая партия»**

ИНН 2455029293 КПП 245501001

Юридический (почтовый) адрес: ООО «МГПП»

662621, Россия, Красноярский край, Минусинский район,
с. Селиваниха, ул. Заречная, 3 г, тел./факс: (39132) 75-6-02

E-mail: gidropartiya2009@yandex.ru

Банковские реквизиты: БИК 049514745 Расчетный счет 40702810300010151076
Корр. счет 30101810900000000745 ООО «Хакасский муниципальный банк» г.Абакан

Заключение

**Об эффективности методики стимуляции автохтонных микроорганизмов для
биоремедиации грунтов, загрязненных нефтепродуктами**

Для биоремедиации грунтов, загрязненных нефтепродуктами, была предложена разработанная в ФИЦ КНЦ СО РАН сотрудниками Ю.Л. Гуревичем, И.В. Трусей, В.П. Ладыгиной, М.И. Теремовой методика стимуляции автохтонных микроорганизмов. Испытания проведены ООО «Минусинской гидрогеологической партией» на нефтезагрязненных грунтах мазутного хозяйства Абаканской ТЭЦ с 2005 по 2010 гг. Методика используется до настоящего времени при проведении природоохранных мероприятий на территории Абаканской ТЭЦ.

На начало исследования уровень углеводородного загрязнения в грунтовых водах в очаге загрязнения составляла 500-120 мг/дм³, на поверхности грунтовых вод наблюдалась линза нефтепродуктов мощностью 0,2 – 0,5 м. Через три года после начала стимуляции содержание углеводородов в очаге загрязнения снизилось до 10 – 1,5 мг/дм³. В настоящий момент только в отдельных скважинах на поверхности грунтовых вод наблюдается слой нефтепродуктов мощностью не более 0,07м, а в остальных – содержание нефтепродуктов соответствует фону.

Таким образом, на промышленном объекте показана эффективность предложенной ФИЦ КНЦ СО РАН методики стимуляции автохтонных микроорганизмов, основанная на использовании естественного потенциала микробного сообщества загрязненных грунтов и грунтовых вод, и отличающаяся относительно низкими затратами на проведение восстановительных мероприятий.

Директор
ООО «МГПП»



А.А.Верещагин