

ТЕОРЕТИКО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА СПОСОБА БИОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ

THEORETICAL AND METHODOLOGICAL SUBSTANTIATION OF THE CHOICE OF THE METHOD FOR BIOREMEDIATION OF OIL-CONTAMINATED SOILS

A. Denezhkina

Summary. The ecological problem of biodegradation of oil-contaminated soils is substantiated. The prerequisites for the restoration of soils in natural conditions due to the work of microorganisms are shown. The advantages and limitations of bioremediation and methods for its implementation in natural conditions at the site of pollution and in dumps are revealed. The expediency of the bioreactor technology of soil remediation has been established. The compositions of microbiological preparations for bioremediation and their effectiveness are systematized. A technique for conducting experimental studies of the bioremediation of oil-contaminated soils with various paraffin content is proposed.

Keywords: bioremediation, soil pollution, oil spill, biodestructants, bioreactor, microbiological preparation.

Денежкина Анна Андреевна

Бирский филиал Башкирского Государственного
Университета
ann.den0104@yandex.ru

Аннотация. Обоснована экологическая проблема биодegradации нефтезагрязненных почв. Показаны предпосылки к восстановлению почв в естественных условиях за счет работы микроорганизмов. Выявлены преимущества и ограничения биоремедиации и способов ее проведения в естественных условиях на месте загрязнения и в отвалах. Установлена целесообразность биореакторной технологии ремедиации почв. Систематизированы составы микробиологических препаратов для проведения биоремедиации и их эффективность. Предложена методика проведения экспериментальных исследований биоремедиации загрязненных нефтью почв с различным содержанием парафинов.

Ключевые слова: биоремедиация, загрязнение почв, разлив нефти, биодеструктанты, биореактор, микробиологический препарат.

Введение

Загрязнение почв нефтью в настоящее время считается одной из самых серьезных экологических проблем [1]. Этот тип загрязнения снижает или полностью уничтожает плодородие почвы, изменяет элементный состав почвы и круговорот воды, приводит к потере эстетической ценности экосистем, вызывает вторичное загрязнение подземных вод и воздуха, угнетает или уничтожает почвенные организмы [2]. Небольшие количества нефти на суше выветриваются, подвергаются биологическому разложению или испаряются, в то время при существенных разливах нефть остается на местности в неподвижном состоянии в виде битумов, смолы, восков и асфальтенов. Это приводит к проникновению токсинов в почвенный столб, загрязнению поверхностных и подземных экосистем.

Бионакопление нефтепродуктов в почве приводит к повышению ее токсичности для человека, животных, микроорганизмов и растений. Биоремедиация выступа-

ет альтернативой традиционным методам термической и физико-химической ремедиации нефтезагрязненных почв и дает возможность уничтожения токсичных загрязнителей с помощью естественной биологической активности микроорганизмов. Загрязняющие соединения трансформируются живыми организмами в результате реакций, протекающих в рамках их метаболических процессов.

Основные стратегии биоремедиации нефтезагрязненных почв включают биоремедиацию *in situ* (на месте разлива нефти), применяемую при малых объемах загрязнения и биоремедиацию *ex situ* с выемкой загрязненной почвы в результате земляных работ для последующей ремедиации [3]. Выбор стратегии и способа биоремедиации сопряжен с учетом комплекса факторов: площади загрязнения, состава нефти, объемов ее разлива, параметров окружающей среды, стоимости работ и других параметров, что обуславливает актуальность теоретико-методического обоснования выбора способа биоремедиации нефтезагрязненных почв.

Предпосылки восстановления нефтезагрязненных почв в естественных условиях

Возможности использования биоремедиации на нефтезагрязненных почвах обоснованы исследованиями результатов естественного очищения загрязненных нефтепродуктами территорий под действием микроорганизмов. Традиционно считается, что удаление производных сырой нефти задерживается при отсутствии микроорганизмов, способствующих разложению загрязнений, при недостаточном их снабжении питательными веществами для сбалансированного использования углерода, а также в связи с отсутствием доступа микроорганизмов к нефтяным остаткам [4].

При самовосстановлении почв трансформационные процессы связаны с биодеградацией нефтяных углеводородов под влиянием почвенных микроорганизмов, которые используют углеводороды в качестве источника энергии. Так, окисление алифатических углеводородов, обычно являющееся начальной стадией процесса их биодегградации, приводит к образованию жирных спиртов, которые в дальнейшем окисляются до жирных кислот, являющихся природными компонентами липидов, необходимыми для прироста энергии почвенных организмов [5].

Биоремедиация стремится использовать встречающиеся в природе биоматериалы и живые организмы, особенно микроорганизмы. Бактерии являются основными микроорганизмами в процессе биодегградации нефти в загрязненных почвах. Некоторые из бактерий, разлагающих углеводороды, включают *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Streptococcus sp.*, *Roseomonas sp.*, *Sphingobacterium sp.*, *Yokenella sp.*, *Bacillus sp.*, *Carpocystis sp.*, *Corynebacterium sp.* [6]. Эти бактерии естественным образом встречаются в местах их обитания и частично ответственны за разложение углеводородов в окружающей среде.

В ходе исследования в работе [7] было изучено бактериальное разнообразие почвы вокруг стареющего нефтяного шлама, а также проанализирована структура сообщества и богатство бактерий. *Proteobacteria*, *Chloroflexi* и *Actinobacteria*, существующие в стареющей почве загрязненных нефтяным шламом угодий, составляли большую часть сообщества, в то время как доля *Firmicute* была относительно меньше. Наоборот, *Firmicute* показали самое высокое содержание 63,8% в контрольных образцах в почве без загрязнений.

Таким образом, ретроспективные исследования бактериального разнообразия на нефтезагрязненных территориях, резистентности и активности бактерий зало-

жили основу для последующей биоремедиации почвы посредством интродукции бактерий на загрязненные территории при условии, что образующиеся бактериальные консорциумы смогут использовать углеводороды в качестве субстрата и адаптироваться к внешним условиям, окружающим их среду обитания.

Выбор способа биоремедиации нефтезагрязненных почв

Биоремедиация *in situ* не требует земляных работ; следовательно, она сопровождается незначительным нарушением структуры почвы, либо вообще не нарушает ее. С одной стороны, данный способ в отличие от биоремедиации *ex situ* не сопряжен с дополнительными затратами на осуществление земляных работ, с другой стороны способ может потребовать сложного оборудования для улучшения микробной активности посредством сочетания способов биовентиляции, биоразбрызгивания и фиторемедиации и т.д.

В случае биоремедиации *in situ* необходим учет состояния почвенной и окружающей среды и ее стабильности: содержания влаги, доступности питательных веществ, pH, температуры и пористости почвы, состояния акцепторов электронов и других факторов, влияющих на успешность биоремедиации [8].

Биоремедиация *ex situ* предполагает удаление земли с загрязненных нефтью участков с последующей их транспортировкой к месту обработки. Целесообразность данного способа биоремедиации оценивается с учетом комплекса параметров: стоимости обработки, глубины и степени загрязнения, географического положения и удаленности от места ремедиации, геологии загрязненного участка и т.д.

Объем загрязненной земляной массы в данном случае размещается на специально создаваемых биопахлах (отвалах) с последующим внесением питательных веществ. Способ может дополняться технологиями аэрации валками для повышения микробной активности и аэробного разложения загрязняющих веществ, а также различными направлениями экологического земледелия (внесение азота, фосфора и калия, орошение) для обеспечения нужного объема питательных веществ в почве и биостимуляции процесса ремедиации [9].

Однако необходимо отметить, что методы биоремедиации *ex situ*, имеют некоторые ограничения: большое рабочее пространство, снижение микробной активности из-за неблагоприятных условий окружающей среды, дополнительные затраты на транспортирование нефтезагрязненного слоя почвы и др.

Таблица 1. Состав некоторых микробиологических препаратов [12]

Название препарата	Компоненты препарата
Первое поколение — масса сухих клеток, суспензии	
Деворойл	Ассоциация дрожжей и бактерий <i>p.Candida</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Pseudomonas</i>
Деградойл	Консорциум включающий <i>Az. Vinelandii</i>
Путидойл	<i>Pseudomonasputida</i>
Серия биодеструктор	<i>Acinetobacter</i> <i>valentis</i> , <i>Ac.oleovorun</i>
Второе поколение — использование сорбентов, минеральных компонентов, иммобилизованных клеток	
Бациспецин	Бактерии <i>p.Bacillus</i> , иммобилизованные на носителе с поролоном
Лигносорбент	Комплекс штаммов на носителе — гидролизном лигнине
Родотрин	Комплекс грибов и бактерий на сорбентах (капрон, полистирол)
Сойлекс	Комплекс штаммов адсорбированных на носителях (торф, вермикулит и др.)
Экойл	<i>Pseudomonas</i> sp. на модифицированном торфе
Эконадин	<i>Pseudomonasfluorescens</i> на сфагновом торфе

Для минимизации сложностей обеспечения условий эффективного функционирования микроорганизмов в естественных среде при способе *in situ* и сокращения затрат на транспортировку почв и организацию территорий для биоремедиации методом *ex situ* целесообразным представляется использование способа *on site*. Данный способ предполагает обработку нефтезагрязненных почв на месте разлива нефти с применением биореактора, где вследствие превращений под действием микробиологического препарата происходит биоремедиация почвы до достижения заданного качества. Биореакторная технология биоремедиации представляет собой инженерно-технический комплекс, обычно состоящий из четырех компонентов: установок для обработки и кондиционирования загрязненных почв, самой батареи биореакторов, установок для обработки и утилизации обработанных почв и вспомогательного оборудования для очистки стоков [10].

Способ *on site* с применением биореактора позволяет создать естественную среду для жизнедеятельности микроорганизмов и оптимальные условия для их роста. В ходе периодической или непрерывной работы реактора обеспечивается контроль и регулирование параметров биопроцесса (температуры, pH, скорости перемешивания и аэрации, концентрации субстрата и инокулята) для ускорения биологических реакций и сокращения времени биоремедиации. Одновременно возможна организация биоаугментации микроорганизмов за счет добавления в реактор питательных веществ, что является важным преимуществом данного способа [8]. Возможность отбора проб на месте работы реактора через определенные промежутки времени позволяет отслеживать изменения в динамике микробной популя-

ции и характеризовать основные бактериальные сообщества, участвующие в процессах биоремедиации.

Микроорганизмы-деструкторы нефтяных загрязнений и препараты для биоремедиации

Углеводородные микроорганизмы-деструкторы представлены бактериями, грибами, дрожжами, водорослями, простейшими. Среди наиболее изученных бактерий-деструкторов нефтяных загрязнений можно отметить *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus* и *Mycobacterium*, которые разлагают алифатические и ароматические углеводороды, используя их в качестве источника углерода и энергии. Сначала микроорганизмы окисляют молекулу углерода посредством сложного мультиферментативного механизма (ферменты оксигеназного типа), который включает молекулу кислорода. Другие ферменты окисляют спиртовую группу до альдегидной группы и, наконец, до угольной кислоты.

Интерес представляют агломерации микроорганизмов или микробные консорциумы, совместная работа которых обеспечивает синергетический эффект и приводит к более эффективному удалению загрязняющих веществ из почв. Например, консорциум из *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Ralstonia* sp. и *Microbacterium* sp, способствует разложению ароматических углеводородов. Процесс деструкции углеводородов под действием микроорганизмов различного типа подробно охарактеризован [11]. Известны разнообразные коммерческие биопрепараты, разработанные для очистки почв от нефтяных загрязнений (Таблица).

Наиболее известным и давно применяющимся на практике является биопрепарат Путидойл, представляющий собой смесь культуральной жидкости (КЖ), содержащую штаммы *Pseudomonas putida* 36 в высушенном состоянии. Данный препарат снижает содержание нефтепродуктов при сочетании биоремедиации с механической обработкой грунта, однако его эффективность применения составляет всего лишь 29,3%. [13].

Дальнейшие исследования по созданию микробиологических препаратов направлены на реализацию следующих их преимуществ:

- ◆ штаммы являются аэробными микроорганизмами;
- ◆ легко адаптируются к новым условиям окружающей среды/культуры (это аборигенная флора);
- ◆ происходит использование натуральных, нетоксичных микроорганизмов;
- ◆ отказ от использования генной инженерии для увеличения разложения нефти, благодаря высокой гибкости метаболизма.

Например, разработанный в Башкирском государственном университете биодеструктор «Ремедойл» (ТУ 9291–001–86142353–2012) не содержит в своем составе патогенных и условно патогенных микроорганизмов и эффективен в биоремедиации нефтезагрязненных почв. Так, в подвергнутых ремедиации образцах за 30 суток наблюдается снижение до 63,8% нефтепродуктов от исходного уровня, спустя 8 месяцев содержание загрязнителя падает до 96% [14].

При этом следует отметить, что в ретроспективных исследованиях недостаточное внимание уделяется сравнительному анализу результатов ремедиации загрязненных почв с различным содержанием парафинов в нефти, что делает необходимым проведение экспериментальных исследований в этой области и разработке методики исследования, предваряющей эксперимент.

Методика проведения экспериментальных исследований ремедиации загрязненных нефтью почв с различным содержанием парафинов.

1. Подготовить образцы нефти с различным содержанием парафинов. Произвести отбор образцов нефти производился по ГОСТ 2517–2012 «Нефть и нефтепродукты. Методы отбора проб».
2. Определить содержание парафина по ГОСТ 11851–85 «Нефть. Метод определения парафина» по методу А, заключающемуся в предварительном удалении асфальтово-смолистых веществ из нефти, их экстракции и адсорбции и последующем выделении парафина смесью ацетона и толуола при температуре минус 20 °С.
3. Выбрать 3 образца нефти с различным содержанием парафинов, произвести экспериментальное загрязнение почв.

4. Отобрать почвы для определения массовой доли нефтепродукта. Пробы отобрать в соответствии с ГОСТ 17.4.4.02–2017, ГОСТ 17.1.5.01–80.
5. Произвести экстракцию нефтепродуктов из проб почвы и очистку экстракта.
6. Произвести хроматографическое выделение элюата и ИК-спектроскопический анализ состава нефти с различным содержанием парафинов.
7. Произвести биоремедиацию почвы микробиологическим препаратом, повторить п. 4–6 через равные интервалы времени для определения доли оставшихся после ремедиации нефтепродуктов с различным содержанием парафинов.
8. Сделать вывод об эффективности биоремедиации нефтезагрязненных почв и влиянии на скорость ремедиации содержания парафинов в нефти.

Разработанная методика служит основой для дальнейших экспериментальных исследований.

Заключение

В связи с возрастающим загрязнением почв нефтяными углеводородами необходимой остается разработка экологически чистых и высокоэффективных методов их ремедиации. В данном исследовании охарактеризовано негативное воздействие нефтесодержащих отходов на почву; приведены возможности естественного восстановления почв при разливах нефти и вблизи нефтешламов за счет микробиоты почвы; систематизированы преимущества и ограничения применения способов биоремедиации *in situ* и *ex situ*.

Показаны достоинства способа биоремедиации *on site*, реализуемого с применением биореактора на территории нефтезагрязненных земель, позволяющего контролировать, регулировать, интенсифицировать и измерять параметры процесса биодеструкции нефти, оценивать эффективность различных микроорганизмов и препаратов, участвующих в биоремедиации.

Систематизированы представления о микроорганизмах-деструктантах нефти и обобщены данные по видам и составу препаратов, используемых для ремедиации почв. Отмечена результативность препарата Ремедойл. Выявлена недостаточная исследованность вопросов биоремедиации почв с учетом различного содержания парафинов в нефти. Предложена методика экспериментального исследования, необходимая для последующей оценки влияния содержания парафинов в нефти на скорость биоремедиации. Проведенное теоретико-методологическое обоснование служит основой для последующей выработки технологии ремедиации по способу *on site*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Захматов В.Д., Онов В.А., Щербак Н.В. Анализ экологического ущерба от нефтяных разливов // Проблемы управления рисками в техносфере. — 2019. — № 1. — С. 73–80.
2. Коваль А.В. Анализ особенностей разлива нефти на стационарных объектах хранения нефти и нефтепродуктов // Наука и молодёжь: новые идеи и решения: материалы XV межд. науч.-практ. конф. — Волгоград: ВГАУ, 2021. — С. 77–78.
3. Шигапов А.М. Биоремедиация нефтезагрязнённых почв органическими компонентами отходов лесозаготовительной промышленности: дисс. канд. биол. наук, Екатеринбург, 2016. — 253 с.
4. Сафиулова В.Р. Углекислотфиксирующие микроорганизмы при нефтепереработке // Безопасность городской среды: материалы VIII межд. науч.-практ. конф. — Омск, 2021. — С. 421–427.
5. Ławniczak Ł., Woźniak-Karczewska M., Loibner A. Microbial degradation of hydrocarbons — basic principles for bioremediation: a review // Molecules. — 2020. — Т. 25. — № 4. — С. 856.
6. Пархоменко А.Н. Скрининг микроорганизмов-деструкторов нефтяных углеводородов // Экобиотех. — 2019. — Т. 2. — № 3. — С. 330–338.
7. Kuang S., H. Su, Y. Wang et al. Soil microbial community structure and diversity around the aging oil sludge in yellow river delta as determined by high-throughput sequencing // Archaea. — 2018. — Т. 2018. — С. 7861805.
8. Azubuike C., Chikere C., Okpokwasili G. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects // World Journal of Microbiology and Biotechnology. — 2016. — Т. 32. — № 1. — С. 1–18.
9. Whelan M.J., Coulon F., Hince G. et al. Fate and transport of petroleum hydrocarbons in engineered biopiles in polar regions // Chemosphere. — 2015. — Т. 131. — С. 232–240.
10. Robles-González I., Fava F., Poggi-Valardo H. A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments // Microbial Cell Factories. — 2008. — Т. 7. — № 1. — С. 1–16.
11. Xenia M.E., Refugio R.V. Microorganisms' metabolism during bioremediation of oil contaminated soils // J. Bioremed. Biodeg. — 2016. — Т. 7. — № 2. DOI:10.4172/2155-6199.1000340
12. Нуртдинова Л.А. Исследование процессов ремедиации нефтезагрязнённых природных объектов с использованием биопрепарата «Ленойл»: дисс. канд. биол. наук. — Уфа, 2005. — 103 с.
13. Волков М.Ю. (RU), Ильин А.А. (RU), Калилец А.А. (RU) Заявка: 2013128882/10, 25.06.2013. Препарат для биодegradации нефтепродуктов «биоионит» и способ его получения: пат. RU (11) 2 571 219(13). — 2013.
14. Minina N.N. The results of research of the biological product “remedoil” for the purification of oil-contaminated soils // Journal of Agriculture and Environment. — 2021. — Vol. 4 (20). — No. 6. DOI: <https://doi.org/10.23649/jae.2021.4.20.6>.

© Денежкина Анна Андреевна (ann.den0104@yandex.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»