

Использование биотестирования для оценки сорбционной биоремедиации нефтезагрязненной подзолистой почвы Западной Сибири

Е. Е. Михедова^{1,3}, Г. К. Васильева^{✉,1}, Е. Р. Стрижакова¹,
А. В. Ланкин¹, Л. И. Ахметов², М. И. Узорина³

¹Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
г. Пушкино, Российская Федерация

²Институт физиологии и биохимии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
г. Пушкино, Российская Федерация

³Пушкинский государственный естественно-научный институт, г. Пушкино, Российская Федерация

✉ gkvasilyeva@rambler.ru

Аннотация

Большинство нефтегазодобывающих регионов России расположено на севере Западной Сибири, где распространены песчаные подзолистые почвы. Из-за низкой буферности этих почв и сурового арктического климата применение традиционного метода биоремедиации для их очистки от нефти малоэффективно. В данной работе впервые была установлена возможность использования сорбционно-биологического метода для очистки глеево-подзолистой почвы от нефти, основанного на дополнительном внесении натуральных сорбентов разных классов. При этом доказано, что выбор параметров сорбционно-биологической очистки может быть основан на определении фитотоксичности почв, оцененной экспресс-методом по всхожести клевера белого (*Trifolium repens*). С помощью этого метода было установлено, что добавка 2 % смешанного сорбента на основе гранулированного активированного угля и диатомита (4:1) или Спилсорба позволит за два-три теплых сезона снизить фитотоксичность почвы до минимума, а суммарное содержание углеводородов нефти – до допустимого остаточного содержания нефти (≤ 5 г/кг), установленного на территории ХМАО для рекультивированных почв сельскохозяйственного назначения. Возможно использование и других сорбентов, таких как торф, ГАУ, вермикулит, цеолит и диатомит, которые могут обеспечить снижение фитотоксичности до уровня < 33 %, что позволит в случае необходимости, провести доочистку почвы с помощью фиторемедиации.

Ключевые слова: фитотоксичность почв, углеводород-окисляющие микроорганизмы, углеводороды нефти, супесчаные почвы

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания (НИОКТР № 121041500050-3).

Для цитирования: Михедова Е.Е., Васильева Г.К., Стрижакова Е.Р., Ланкин А.В., Ахметов Л.И., Узорина М.И. Использование биотестирования для оценки сорбционной биоремедиации нефтезагрязненной подзолистой почвы Западной Сибири. *Природные ресурсы Арктики и Субарктики*. 2023;28(4):595–605. <https://doi.org/10.31242/2618-9712-2023-28-4-595-605>

Original article

Biotesting for adsorptive bioremediation of oil-contaminated podzolic soil in Western Siberia

Е. Е. Mikhedova^{1,3}, G. K. Vasilyeva^{✉,1}, E. R. Strijakova¹,
A. V. Lankin¹, L. I. Akhmetov², M. I. Uzorina³

¹Institute of Physical-Chemical and Biological Problems
in Soil Science Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation

²Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of microorganisms,
Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation

³Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, Russian Federation

✉ gkvasilyeva@rambler.ru

Abstract

The majority of Russia's oil and gas-producing regions are situated in the northern part of Western Siberia, where sandy podzolic soils are prevalent. Due to the low buffering capacity of these soils and the severe Arctic climate, the

conventional method of bioremediation for removing oil contamination is not effective. This study, for the first time, explores the potential of adsorptive bioremediation for purifying oil-polluted gley-podzolic soil. This approach involves introducing natural sorbents of various classes before soil treatment through bioremediation. The optimal conditions for soil treatment can be determined using the express phytotests based on white clover (*Trifolium repens*) seed germination. The results indicate that under the best conditions, which involve adding 2 % mixed sorbent based on granulated activated carbon (GAC) and diatomite (4:1) or Spilsorb, it is possible to minimize soil phytotoxicity after 2-3 warm seasons and reduce the content of total petroleum hydrocarbons to the permissible residual oil content (≤ 5 g/kg) established in the territory of the Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug for recultivated agricultural soils. Moreover, other sorbents, such as peat, GAC, vermiculite, zeolite, and diatomite, can be used to reduce phytotoxicity to <33 %, allowing for additional soil decontamination through phytoremediation.

Keywords: soil phytotoxicity, hydrocarbon-oxidizing microorganisms, petroleum hydrocarbons, sandy loam soils
Funding. This study was conducted within the framework of the state assignment (number 121041500050-3).

For citation: Mikhedova E.E., Vasilyeva G.K., Strijakova E.R., Lankin A.V., Akhmetov L.I., Uzorina M.I. Biotesting for adsorptive bioremediation of oil-contaminated podzolic soil in Western Siberia. *Arctic and Subarctic Natural Resources*. 2023;28(4):595–605. (In Russ.); <https://doi.org/10.31242/2618-9712-2023-28-4-595-605>

Введение

В условиях возрастающего антропогенного влияния на окружающую среду ее защита от техногенного загрязнения является одной из важнейших задач современной экологии. Особенно сильное воздействие на качество окружающей среды оказывается в местах добычи, переработки и транспортировки нефти и нефтепродуктов. Большинство нефтегазодобывающих регионов России расположены на севере страны, на территории с суровым, резко-континентальным климатом. Почвы в данных регионах бедные, со скудной растительностью, поэтому сохранение исходных параметров экосистем в этих районах крайне важно.

Наиболее экономически выгодный способ транспортировки нефти – ее перекачка по промышленным и магистральным трубопроводам. Но этот процесс сопровождается многочисленными аварийными разливами нефти и нефтепродуктов в результате порывов, связанных, в основном, с изношенностью оборудования. По данным Федеральной службы государственной статистики за 2020 г., площадь нарушенных земель вследствие утечки при транзите газа, нефти и продуктов ее переработки составила 113 тыс. га [1]. При этом нефтяные углеводороды и сопутствующие элементы оказывают негативное влияние на все компоненты экосистем, на многие свойства почв и ее плодородие, а также являются постоянным источником канцерогенного и мутагенного действия на человека.

Существует множество технологий ремедиации нефтезагрязненных почв на территории с холодным температурным режимом, но универсальной методики до сих пор не разработано. В большинстве обзорных работ, посвященных биоремедиации нефтезагрязненных почв, основ-

ной упор делается на получение и использование биопрепаратов на основе микроорганизмов-нефтедеструкторов. Основанный на их внесении метод биоаугментации далеко не всегда дает желаемые результаты, прежде всего из-за конкуренции с аборигенными микроорганизмами, повышенной токсичности и гидрофобности загрязненных почв [2].

Один из путей решения данной проблемы – применение сорбционной биоремедиации. Нами была доказана ее эффективность для ряда почв Русской равнины, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. Установлено, что положительное действие сорбентов связано в основном с обратимой сорбцией токсичных веществ, а также с улучшением физико-химических свойств нефтезагрязненных почв [3–6]. Данный метод подтвердил свою эффективность на техногенно загрязненных почвах в Субарктическом регионе на севере Кольского полуострова [7].

Цель данной работы состояла в том, чтобы с помощью методов биотестирования, в условиях вегетационного эксперимента, на примере глеево-подзолистой супесчаной почвы ЯНАО определить влияние разных доз ряда натуральных (несинтетических) сорбентов трех классов на степень детоксикации минеральных почв Западной Сибири и выбрать наиболее оптимальные формы и дозы сорбентов для проведения их очистки методом сорбционной биоремедиации.

Объекты и методы

Объекты

Свойства почвы. Эксперименты проводили на глеево-подзолистой почве, отобранной из верхнего 20-сантиметрового слоя на незагрязненной территории в 5 км от Уренгойского нефтегазоконденсатного месторождения (УНГКМ). Свежепри-

Таблица 1

**Схема закладки и проведения эксперимента с почвой, загрязненной 7 % нефти,
в сравнении с чистым контролем**

Table 1

**Scheme of the experiments with gley-podzolic soil spiked with 7 % oil,
in comparison with the pure control**

Вариант/Сорбент		Массовая доля сорбента для дозы, %			Шифр образца при дозах сорбента			БП кл./г	АЗФ мг д.в./кг	ДМ г/кг
		№ 1	№ 2	№ 3	№ 1	№ 2	№ 3			
Контроли	Чистая почва	—			ЧК			—	150+0	0,5+0
	Контроль	—			К			10 ⁷ +10 ⁷	275+275	1,0+1,0 +(0,5)
Минеральные	Каолинит	0,5	1	2	Кл-0,5	Кл-1	Кл-2			
	Цеолит	0,5	1	2	Ц-0,5	Ц-1	Ц-2			
	Диатомит	0,5	1	2	Д-0,5	Д-1	Д-2			
	Вермикулит	0,5	1	2	В-0,5	В-1	В-2			
Органические и углеродистые	Торф	1	2	5	Т-1	Т-2	Т-5			
	Спилсорб	1	2	5	СС-1	СС-2	СС-5			
	ГАУ	1	2	5	ГАУ-1	ГАУ-2	ГАУ-5			
	Смешанный, ГАУ+Д, 4:1	1	2	5	АУД-1	АУД-2	АУД-5			

везенную почву просеивали сначала через сетку с размером ячеек 1 см, отделяя крупный растительный опад (детрит), а затем через сито 3 мм. Почва супесчаная (песок крупный 73,6 %; илистая фракция 3,82 %), слабогумусированная ($C_{\text{орг}}$ 0,6 %), слабокислая (pH_v 6,1) и слабо обеспеченная биофильными элементами: суммарное содержание азота – 0,7 %, доступного фосфора – 2,6 мг $P_2O_5/100$ г, обменного калия – 8,8 мг $K_2O/100$ г.

Добавки. В эксперименте использовали нефть УНГКМ, которая классифицируется как легкая (плотность 0,84 г/см³), высоко парафинистая и малосернистая с массовой долей парафина 7,5 % и серы 0,086 %.

Минеральные удобрения вносили в виде азофоски: 17 % действующего вещества (д.в.) в пересчете на $N_{\text{сум}}$, P_2O и K_2O . **Известкование** проводили с помощью доломитовой муки, в состав которой входит по 40 % $CaCO_3$ и $MgCO_3$.

Сорбенты натурального происхождения, трех классов: минеральные (каолинит, цеолит, диатомит, вермикулит вспученный); органические (торф верховой нейтрализованный и Спилсорб) и углеродистые, в том числе гранулированный активированный уголь (ГАУ) и смешанный сорбент АУД на основе ГАУ и диатомита (4:1). Последняя смесь показала наилучшие результаты в эксперименте с серой лесной почвой [4, 5].

Биопрепарат «Микробак», разработанный в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, содержит консорциум бактериальных штаммов родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas* и предназначен для биоремедиации почв с содержанием нефти до 15 % при pH почвы от 6 до 8 и температурах от 4 до 32 °C. В состав биопрепарата входят штаммы псевдомонад, содержащие плазмиды, способные разлагать полициклические ароматические углеводороды [8].

Условия проведения экспериментов

Был заложен модельный вегетационный эксперимент. Образец просеянной почвы весом 30 кг помещали в емкость из эмалированной стали, перемешивали, поверхностно загрязняли нефтью из расчета 7 масс.% и оставляли в комнатных условиях на 2 суток для имитации нефтеразлива на почве. После испарения легких фракций нефти почву тщательно перемешивали и раскладывали по 250 г в пластиковые вегетационные сосуды объемом 350 мл с поддонами. Параллельно закладывали образцы с незагрязненной почвой – чистый контроль – **ЧК**.

Во все образцы, кроме **ЧК** и контрольной почвы (**К**), вносили сорбенты в дозах 0,5, 1, или 5 масс.% в соответствии со схемой, приведенной

в табл. 1. Дозы сорбентов подбирали в соответствии с нашими предыдущими результатами с серой лесой почвой, загрязненной нефтепродуктами [5]. Все варианты опыта приготавливали в трех повторностях.

Во все загрязненные почвенные образцы вносили комплексные минеральные удобрения и доломитовую муку. Для этого через 1 сут. и повторно через 3 мес. в почву вносили азофоску (275 мг д.в./кг) и доломитовую муку (1 г/кг). Через 9 мес. в варианты с максимальной дозой органических сорбентов дополнительно вносили половинную дозу доломитовой муки. Показателем необходимости известкования служило значительное подкисление почвы в этих вариантах до $\text{pH}=5,1-5,4$. В итоге, с учетом исходного уровня углерода и элементов, в почве достигнуто окончательное соотношение $\text{C:N:P:K} = 60:1:0,4:0,8$. В образцы **ЧК** в самом начале эксперимента однократно вносили азофоску в дозе 150 мг д.в./кг и доломитовую муку – 0,5 г/кг.

Через 2 сут. после внесения удобрений и повторно через 1,3 мес. во все загрязненные почвенные образцы вносили биопрепарат «Микробак» (БП) в виде суспензии свежевыращенных микроорганизмов в пересчете на 10^7 кл./г.

В дальнейшем все образцы выдерживали в условиях оранжереи при температуре воздуха от 20 до 25 °С. Почву еженедельно увлажняли дистиллированной водой по весу сосудов, поддерживая влажность в пределах 60–80 % предельной полевой влагоемкости, не допуская пролива воды в поддоны. Почву в сосудах (за исключением **ЧК**) ежемесячно (и перед отбором образцов) перемешивали. Контрольная почва **К** (без сорбентов) обрабатывалась так же, как и опытная. Каждый вариант закладывали в трех повторностях.

Образцы почвы периодически отбирали на анализ. В почве регулярно определяли суммарное содержание углеводов нефти и их окисленных производных, численность углеводород-окисляющих микроорганизмов (УОМ), водный pH и фитотоксичность почвы.

Методы анализов

Фитотоксичность почвы определяли разработанным нами экспресс-методом – по всхожести клевера белого/ползучего (*Trifolium repens*) [9]. Дополнительно в конце инкубирования определяли фитотоксичность почвы сертифицированным методом по задержке роста корня 2-недель-

ных проростков пшеницы [10]. Для этого почву в сосудах засевали семенами пшеницы (по 5 семян на сосуд), а через 14 сут. растения вынимали и измеряли длину корней. Все анализы по определению фитотоксичности почвы проводили в трех повторностях.

Численность углеводород-окисляющих микроорганизмов определяли методом посева почвенной суспензии соответствующего разведения на минимальную агаризованную среду, где источником углерода и энергии служили пары дизельного топлива, как описано в [11].

Суммарную концентрацию углеводов нефти (УВН) в почве определяли сертифицированным методом ИК-спектроскопии после экстракции углеводов из почвы четыреххлористым углеродом и отделения полярных соединений на колонке с окисью алюминия [12]. Дополнительно оценивали содержание **окисленных производных углеводов нефти (ОУВН)** методом ИК-спектроскопии – по разнице между суммой всех полярных С–Н-содержащих соединений и УВН, как описано в [3]. **Водный pH почвы** определяли в водной вытяжке (1:2,5) с помощью pH-метра.

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы Ms Excel. Средние данные, полученные в каждом опытном варианте с сорбентами, сравнивали с контрольным уровнем в варианте **К** с помощью теста Стьюдента и программы STATISTICA 10. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

1.1. Влияние сорбентов на биологические свойства и pH почвы

Результаты изучения влияния одной или двух максимальных доз сорбентов (2 и 5 %) на динамику изменения биологических свойств и pH нефтезагрязненной глеево-подзолистой почвы в ходе обработки методом сорбционной биоремедиации показаны на рис. 1. Динамики этих параметров с меньшими дозами (0,5 и 1 %) сорбентов мало отличались от контроля, поэтому на графиках не представлены.

1.1 Влияние сорбентов на pH нефтезагрязненной почвы

В течение всего эксперимента водный pH чистой **ЧК** и контрольной почвы **К** колебался в интервале 6,0–6,7. Этому способствовало своевременное внесение в контроль **К** (как и в другие

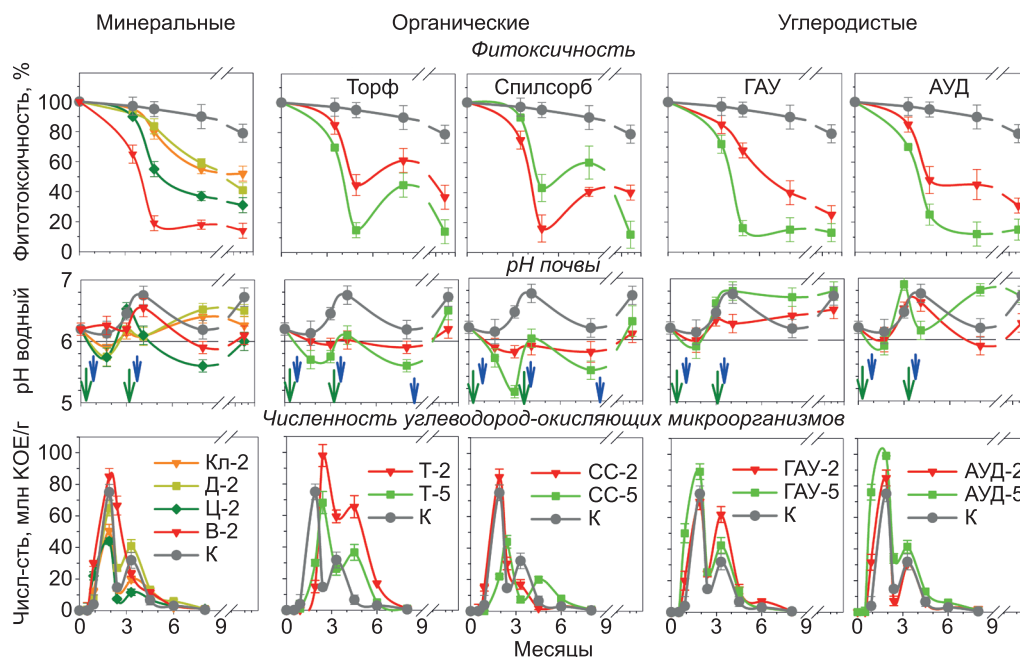


Рис. 1. Влияние максимальной дозы (2 %) минеральных сорбентов (Кл-2, Д-2, Ц-2 и В-2), а также двух доз (2 и 5 %) органических (торф и Спилсорб) и углеродистых (ГАУ и АУД) сорбентов на динамику численности УОМ в почве, pH почвы и фитотоксичности, оцененной по всхожести клевера белого

Fig. 1. Impact of the highest dose (2%) of mineral sorbents (КЛ-2, Д-2, Ц-2, and В-2), as well as two doses (2 and 5 %) of organic (peat and Spilsorb) and carbonaceous (ГАУ and АУД) sorbents on the dynamics of the number of petroleum-degrading microorganisms in the soil, its pH, and phytotoxicity, estimated by white clover

образцы) достаточного количества доломитовой муки после подкисления почвы до $\text{pH} < 6$. Подкисление происходило во всех почвах через 2–3 мес. после начала эксперимента, а с сорбентами органической природы еще и через 8 мес. обработки. Как правило, через 1–2 недели после известкования pH почвы нормализовался.

В присутствии минеральных сорбентов pH почвы колебался почти в тех же пределах, что и в контроле, за исключением небольшого подкисления (до pH 5,7–5,9) в первые 2 мес. обработки в вариантах с максимальной дозой каолинита, диатомита и цеолита. Органические сорбенты, особенно добавки максимальной дозы торфа и еще более Спилсорба, значительно подкисляли почву, снижая pH до 5,6 и 5,0 соответственно. Этот эффект объясняется накоплением органических кислот в результате биodeградации самих органических сорбентов в присутствии повышенных доз минеральных удобрений. Углеродистые сорбенты, наоборот, несколько подщелачивали почву до pH 6,8–6,9 за счет присутствия в их составе зольных элементов, в основном Са и Mg [4].

1.2. Влияние сорбентов на фитотоксичность нефтезагрязненной почвы

Использование экспресс-метода фитотестирования показало, что в исходном контроле К семена клевера полностью погибали. В ходе последующей обработки фитотоксичность контрольной почвы снижалась очень медленно (см. рис. 1). При этом все сорбенты способствовали более быстрому снижению фитотоксичности почвы. Внесение большинства минеральных сорбентов в максимальной дозе (2 %) обеспечило снижение фитотоксичности до 33–55 % через 5 мес., и далее до конца наблюдений их фитотоксичность оставалась почти на том же уровне. Лишь добавки 2 % вспученного вермикулита обеспечили снижение этого показателя до 15 %, что объясняется его более высокой поглощательной способностью по отношению к нефти по сравнению с другими минеральными сорбентами.

Наиболее существенное снижение фитотоксичности почв наблюдалось в образцах с добавками 5 % органических и углеродистых сорбентов, в которых уже через 4–5 мес. после начала

эксперимента эта величина снизилась до минимума – <10–20 %. Вместе с тем, в присутствии органических сорбентов наблюдался повторный скачок фитотоксичности почв до 40–60 % через 8 мес. обработки, что совпадает с подкислением почв до $pH < 6$, однако дополнительное известкование обеспечило их нейтрализацию и последующее снижение фитотоксичности.

Полученные результаты подтверждаются данными определения **фитотоксичности сертифицированным** методом (табл. 2). В контроле **К** рост растений в почве сильно ингибировался и к концу эксперимента оставался на уровне 64 %. Добавки 2 % большинства минеральных сорбентов снизили фитотоксичность до 32–43 %. Лишь в присутствии вермикулита этот показатель снизился до 15 %, а проростки существенно отличались от контроля более развитой корневой системой и надземной массой.

Еще более положительное влияние на рост растений оказало внесение органических и углеродистых сорбентов в дозах 2 и, особенно, 5 %, в присутствии которых фитотоксичность почвы снизилась до 5–33 и 5–10 % соответственно. При этом почва большинства образцов оставалась гидрофобной, так как на корнях растений, вынутых из нефтезагрязненной почвы, не отмечено налипания почвенных частиц, характерного для чистой почвы. В почве с добавками 5 % АУД корни имели наиболее естественный вид, близкий к чистому контролю.

1.3. Влияние сорбентов на численность углеводород-окисляющих микроорганизмов в почве

В первые месяцы после начала обработки во всех образцах с загрязненной почвой наблюдалось резкое повышение численности УОМ по сравнению с **ЧК** (см. рис. 1), где численность УОМ оставалась на уровне 0,01–0,32 млн КОЕ/г. При этом динамика численности нефтедеструкторов в загрязненных почвах имела два основных максимума: через 2–2,5 и 3–5 месяцев обработки. В контроле **К** во время первого максимума их численность достигала $75,4 \pm 3,8$, а второго – $33,2 \pm 4,1$ млн КОЕ/г. В период с 6 до 8 мес. после начала эксперимента численность УОМ оставалась выше, чем в чистой почве, но не превышала 0,5–3 млн КОЕ/г.

В большинстве образцов с сорбентами динамика численности УОМ мало отличалась от контроля **К**. Исключение составили варианты с

2 % вермикулита и торфа (В-2 и Т-2, соответственно), а также с 5 % ГАУ и АУД (ГАУ-5 и АУД-5 соответственно), в которых численность нефтедеструкторов в период первого максимума была достоверно ($p < 0,05$) выше, чем в контроле, и варьировала в интервале 85,3–98,9 млн КОЕ/г. При этом, однако, численность УОМ в варианте с 5 % Спилсорба (СС-5) в период первого максимума была вдвое ниже, чем с 2 % Спилсорба (СС-2), что могло быть связано с сильным подкислением почвы в этот период.

2. Влияние сорбентов на скорость разложения углеводородов нефти в почве

Динамика суммарной концентрации УВН и их промежуточных продуктов окисления (ОУВН) в почвах представлена на рис. 2.

Разложение УВН протекало в два этапа: 1-й этап заканчивался через 3 мес. обработки, что связано, очевидно, с недостатком биофильных элементов. После дополнительного внесения азотосодержащих и доломитовой муки процесс возобновился. При этом разложение УВН сопровождалось накоплением ОУВН, которое также подвергалось колебаниям.

Сорбенты разных классов по-разному повлияли на скорость разложения УВН, однако, были выявлены общие тенденции. Внесение всех сорбентов, особенно органических и углеродистых, на первом этапе существенно ускоряло разложение УВН, но к концу наблюдений разница между вариантами сильно уменьшилась. В вариантах с сорбентами концентрация УВН снизилась на 1-м этапе на 17–41 %, а на 2-м – на 80–91 % по сравнению с контролем **К**: на 12 ± 3 и 84 ± 5 % соответственно. Причем, во многих вариантах разница между остаточным содержанием УВН в опытных и контрольных образцах была недостоверной.

В то же время, во всех почвенных образцах с сорбентами накапливалось в 2–3 раза меньшее количество токсичных метаболитов ОУВН, чем в контроле. В результате суммарное содержание остаточных нефтяных загрязнителей (УВН+ОУВН) во всех вариантах с сорбентами (кроме каолинита) снизилось на 75,0–82,5 % по сравнению с $66,1 \pm 5,7$ % в контроле. При этом снижение суммарного содержания поллютантов (УВН+ОУВН) в опытных вариантах было достоверно ($p < 0,05$) выше, чем в контроле. Еще более существенная разница отмечалась между показателями фитотоксичности почв. К концу инкубирования в тех же образцах с сорбентами

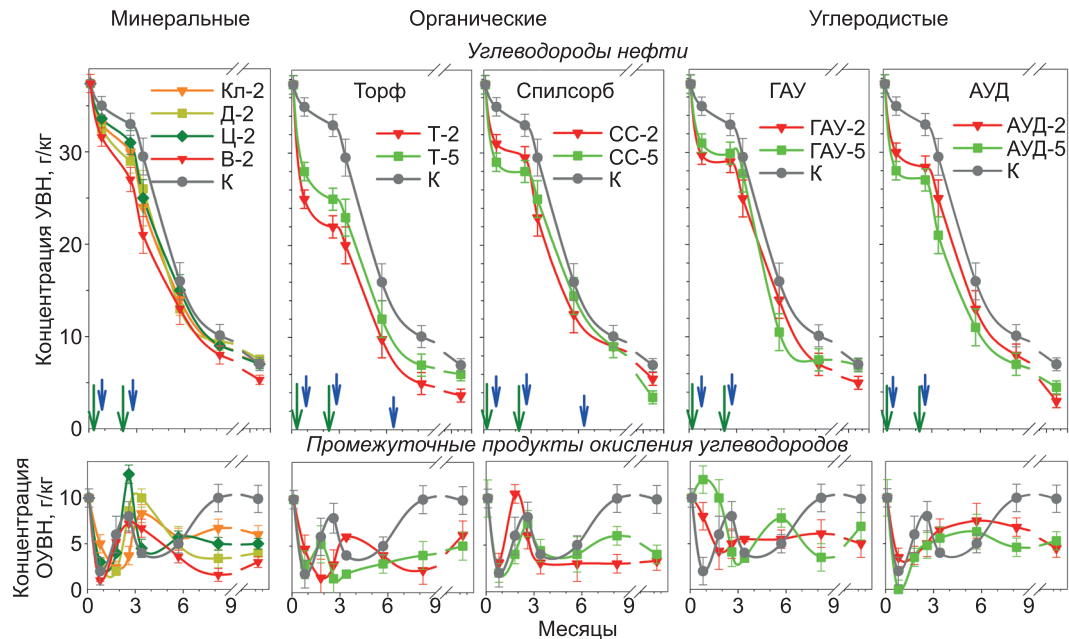


Рис. 2. Влияние максимальной дозы (2 %) минеральных сорбентов (Кл-2, Д-2, Ц-2 и В-2), а также двух доз (2 и 5 %) органических (торф и Спилсорб) и углеродистых (ГАУ и АУД) сорбентов на динамику концентраций УВН и ОУВН в почве

Fig.2. Impact of the highest concentration (2 %) of mineral sorbents (Кл-2, Д-2, Ц-2, and В-2) as well as two concentrations (2 % and 5 %) of organic (peat and Spilsorb) and carbonaceous (ГАУ and АУД) sorbents on the fluctuations of the total petroleum hydrocarbon levels and their derivatives in soil is illustrated in this graph

Таблица 2
Сравнительная эффективность воздействия сорбентов

Table 2

Comparative effectiveness of sorbents

Шифр	Сорбент	Доза, %	Фитотоксичность, %	Остаточное содержание в почве, г/кг		
				УВН	ОУВН	Сумма
К	—	—	64,2 (10,5)	5,94 (0,50)	10,20 (1,11)	16,14 (1,61)
Кл-2	Каолинит	2	43,2 (12,2)*	7,10 (0,65)*	6,02 (0,56)	13,12 (1,21)
Д-2	Диатомит	2	32,0 (10,9)	7,54 (0,58)*	4,04 (0,34)	11,58 (0,92)
Ц-2	Цеолит	2	33,1 (8,9)	7,01 (0,69)*	4,82 (0,44)	11,83 (1,13)
В-2	Вермикулит	2	14,8 (6,7)	5,34 (0,41)*	3,01 (0,31)	8,35 (0,72)
Т-2	Торф	2	32,5 (6,2)	3,72 (0,23)	6,16 (0,47)	9,88 (0,70)
Т-5		5	9,8 (4,3)	5,90 (0,50)*	5,02 (0,43)	10,92 (0,93)
СС-2	Спилсорб	2	5,0 (4,5)	5,52 (0,35)*	3,29 (0,34)	8,81 (0,69)
СС-5		5	9,7 (4,6)	3,48 (0,33)	3,99 (0,43)	7,47 (0,76)
ГАУ-2	ГАУ	2	30,9 (4,5)	5,02 (0,46)*	5,01 (0,49)	10,03 (0,95)
ГАУ-5		5	10,1 (4,3)	6,88 (0,81)*	5,00 (0,71)	11,88 (0,98)
АУД-2	АУД	2	22,2 (5,1)	4,52 (0,31)	4,54 (0,45)	9,06 (0,76)
АУД-5		5	4,9 (4,4)	5,02 (0,31)	5,32 (0,32)	10,34 (0,46)

Примечание. В скобках – стандартные отклонения от среднего. Звездочкой отмечены варианты, в которых отсутствует достоверная разница между опытными и контрольными величинами.

Note. In parentheses are standard deviations from the mean. Options in which there was no significant difference between the experimental and control values are marked with an asterisk.

фитотоксичность почв колебалась в пределах 5,0–33,1 % тогда как в контроле она оставалась высокой – $64,2 \pm 10,5$ %.

Для *оценки эффективности влияния сорбентов* на скорость биоремедиации нефтезагрязненной глеево-подзолистой почвы в табл. 2 даны остаточные концентрации УВН, ОУВН и суммы поллютантов, а также уровни фитотоксичности почв в разных вариантах через 13 мес. после обработки.

Наилучшие результаты получены в вариантах с добавками 5 % Спилсорба или 2 и 5 % АУД. В них достигнуты наиболее низкие значения остаточного содержания суммы УВН (3,5–5,0 г/кг), что достоверно ($p < 0,05$) ниже, чем в контроле ($5,94 \pm 0,50$ г/кг), и не превышает допустимый уровень содержания нефтепродуктов (≤ 5 г/кг), установленный в ХМАО для рекультивированных почв сельскохозяйственного назначения [13]. Фитотоксичность этих почв снизилась до минимального уровня – < 20 %. В вариантах с 2% торфа или ГАУ, несмотря на низкое остаточное содержание УВН (ниже уровня ДОСН), их фитотоксичность оставалась немного повышенной – в пределах 31–33 %.

С другой стороны, такой, сравнительно невысокий, уровень фитотоксичности почти всех почв с добавками 2 и 5 % сорбентов в конце обработки может обеспечить устойчивый рост растений, что позволит в случае необходимости провести доочистку почвы с помощью фиторемедиации.

Таким образом, для успешного применения метода сорбционной биоремедиации для очистки от нефти глеево-подзолистой почвы необходимо внесение натуральных сорбентов в дозе, соответствующей их отношению к исходному суммарному содержанию нефтяных поллютантов в пределах от 0,5:1 до 1:1.

В наших предыдущих экспериментах по сорбционной биоремедиации суглинистой серой лесной почвы, загрязненной нефтью или нефтепродуктами (исходное содержание УВН 47–52 г/кг), были получены аналогичные результаты по скорости снижения концентрации углеводородов [3–5]. При этом наилучший эффект обеспечило внесение более низких доз сорбентов (0,5–2 %), чем в глеево-подзолистой почве, т. е. для суглинистой серой лесной почвы оптимальное весовое соотношение дозы сорбента к суммарному уровню нефтяного загрязнения колебалось в пределах от 0,1:1 до 0,4:1.

Применение для сорбционной биоремедиации нефтезагрязненной глеево-подзолистой почвы более высоких доз сорбентов, чем для серой лесной почвы, объясняется более низкой буферностью этих почв. Полученные результаты также подтверждают необходимость экосистемного подхода при оценке безопасного уровня остаточных количеств углеводородов нефти в почве, когда учитываются не только количественные показатели загрязнения почв углеводородами, но и интегральные показатели их токсичности, в частности, величина фитотоксичности почв [14, 15].

3. Механизмы действия сорбентов на скорость биоремедиации почвы

Полученные результаты свидетельствуют о том, что основной механизм положительного действия сорбентов заключается в *снижении токсичности нефтезагрязненной почвы* за счет сорбции поллютантов и меньшего накопления токсичных метаболитов, что в свою очередь обеспечивает оптимальные условия для активации микроорганизмов-деструкторов нефти.

Этот вывод подтверждается динамикой численности нефтедеструкторов. Первый этап ускоренного разложения УВН совпадает с резким повышением численности УОМ через 2,5 мес., а на втором этапе – через 3,5 мес. после начала эксперимента наблюдается повторное повышение численности УОМ. Более низкий уровень второго максимума численности нефтедеструкторов объясняется меньшей биодоступностью остаточных УВН с большей молекулярной массой по сравнению с легкодоступными первыми фракциями углеводородов с меньшей молекулярной массой.

При этом повышенная численность микроорганизмов в присутствии ряда сорбентов по сравнению с контролем свидетельствует в пользу *преимущественно обратимой сорбции углеводородов*. То есть сорбированные углеводороды остаются доступными для последующей утилизации микроорганизмами. Более того, процесс разложения сорбированных углеводородов сопровождается *меньшим накоплением токсичных метаболитов*, что, в свою очередь, обеспечивает повышенный рост численности микроорганизмов.

Подтверждение микробной доступности сорбированных углеводородов было получено и в других исследованиях с внесением ГАУ [13] и биоугля [16, 17], а также с внесением биопрепаратов на основе микроорганизмов, иммобилизо-

ванных на перлите, вермикулите, цеолите и кремнеземе [18]. Во всех этих работах ускоренное разложение углеводов в присутствии сорбентов сопровождалось снижением фитотоксичности почв и повышением численности нефтеструктуров или дегидрогеназной активности.

Другим фактором влияния сорбентов на численность УОМ является **снижение гидрофобности нефтезагрязненных почв**, что обеспечивает **повышение влагоемкости и пористости почв**. Эти механизмы действия сорбентов были установлены в наших предыдущих работах по изучению сорбционной биоремедиации серой лесной почвы, загрязненной нефтью [4, 5]. При этом наибольший эффект оказывали вермикулит, торф, Спилсорб и ГАУ, которые обладают более высокой пористостью и нефтеемкостью по сравнению с каолинитом, диатомитом и цеолитом [4].

В случае смешанного сорбента АУД дополнительное влияние могут оказывать также добавки диатомита за счет **выделения моно- и/или поликремниевых кислот**, которые, как известно, снижают гидрофобность почв [3, 4]. Это обеспечивает более высокую эффективность смешанного сорбента АУД по сравнению с самим ГАУ.

Дополнительные механизмы могут быть задействованы при ускорении биodeградации нефти в почвах, обогащенных такими сорбентами, как биочар, торф и Спилсорб. Эти сорбенты являются **источником растворенных органических молекул**, подобных нефтяным углеводам, которые могут стимулировать рост аборигенных микроорганизмов, утилизирующих углеводороды нефти [19].

Заключение

Таким образом, из результатов проведенного вегетационного эксперимента следует, что при выборе параметров сорбционно-биологической очистки важнейшим показателем является фитотоксичность почв, которую можно в короткие сроки оценить с помощью экспресс-метода по всхожести клевера белого, а на заключительном этапе необходимо подтвердить отсутствие фитотоксичности сертифицированным методом по показателям роста проростков пшеницы. С помощью такого подхода доказано, что для очистки глеево-подзолистой почвы Западной Сибири, загрязненной 7 % сырой нефти, наиболее эффективно использование метода сорбционной биоремедиации, основанного на внесении смешан-

ного сорбента АУД или Спилсорба в дозах от 2 до 5 %. При этом вполне допустимо использование и других исследованных сорбентов, таких как торф, ГАУ, вермикулит, цеолит и диатомит. Наиболее оптимальной является доза сорбента, соответствующая весовому отношению к исходному уровню содержания углеводов нефти в пределах от 0,5:1 до 1:1. При этих условиях применение сорбционной биоремедиации нефтезагрязненной глеево-подзолистой и других минеральных почв Западной Сибири на фоне внесения биопрепарата Микробак, а также необходимого количества минеральных удобрений и доломитовой муки может в течение двух-трех сезонов обеспечить снижение концентрации углеводов нефти до допустимого уровня (≤ 5 г/кг), установленного на территории ХМАО для рекультивированных почв сельхозугодий. При этом фитотоксичность почв будет достаточно низкой, что позволит в случае необходимости провести доочистку почвы с помощью фиторемедиации.

Основные механизмы снижения фитотоксичности почв обусловлены преимущественно обратимой сорбцией углеводов и их метаболитов, а также снижением гидрофобности почв и поддержанием оптимального уровня их полевой влажности.

Список литературы / References

1. Статистический бюллетень «Основные показатели охраны окружающей среды». М.: РОССТАТ; 2021. 110 с. https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/oxr_bul_2021.pdf. (26.01.2023)
Statistical Bulletin "The main indicators of environmental protection". Moscow: Federal State Statistics Service (ROSSTAT); 2021. 110 p. (In Russ.)
2. Alvarez P.J.J., Illman W.A. *Bioremediation and natural attenuation: process fundamentals and mathematical models*. New Jersey: Willey-InterScience; 2006. 609 p.
3. Vasilyeva G., Kondrashina V., Strijakova E., Ortega-Calvo J.-J. Adsorptive bioremediation of soil highly contaminated with crude oil. *Science of the Total Environment*. 2020;706:135739. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135739>
4. Vasilyeva G.K., Mikhedova E.E., Zinnatshina L.V., et al. Use of natural sorbents for accelerated bioremediation of grey forest soil contaminated with crude oil. *Science of the Total Environment*. 2022;850:157952. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157952>
5. Зиннатшина Л.В., Стрижакова Е.Р., Даньшина А.В., Васильева Г.К. Влияние сорбентов на скорость биоремедиации и свойства почвы, загрязненной смесью нефтепродуктов. *Естественные и технические науки*. 2018;9(123):24–30.

- Zinnatshina L.V., Strijakova E.R., Danshina A.V., Vasilyeva G.K. Influence of sorbents on bioremediation rate and properties of soil contaminated with a mixture of petroleum products. *Natural and Technical Sciences*. 2018; 9(123):24–30. (In Russ.)
6. Semenyuk N.N., Yatsenko V.S., Strijakova E.R., et al. Effect of activated charcoal on bioremediation of diesel fuel contaminated soil. *Microbiology*. 2014;83(5):589–598. <https://doi.org/10.1134/S0026261714050221>
7. Myazin V., Korneykova M., Chaporgina A., et al. The effectiveness of biostimulation, bioaugmentation and sorption-biological treatment of soil contaminated with petroleum products in the Russian Subarctic. *Microorganisms*. 2021;9(8):1722. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081722>
8. Филонов А.Е., Петриков К.В., Якшина Т.В. и др. Режимы раздельного и совместного культивирования микроорганизмов-деструкторов нефти родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*. *Биотехнология*. 2008;(6):80–85.
- Filonov A.E., Petrikov J.V., Yakshina T.V., et al. Regimes of separated and combined cultivation of oil-degrading microorganisms of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* genera. *Biotechnology in Russia*. 2008;(6):110–117. (In Russ.)
9. Vasilyeva G.K., Kondrashina V.S., Strijakova E.R., Pinsky D.L. Express-phytotest for choosing conditions and following process of soil remediation. *Environmental Geochemistry and Health*. 2022;44(2):433–445. <https://doi.org/10.1007/s10653-020-00727-8>
10. ГОСТ Р ИСО 18763-2019. Национальный стандарт Российской Федерации. Качество почвы. Определение токсического воздействия загрязняющих веществ на всхожесть и рост на ранних стадиях высших растений. От 01.01.2011. Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов [процитировано 26 января 2023]. Доступно: <https://docs.cntd.ru/document/1200077669>
- GOST R ISO 18763-2019. *National standard of the Russian Federation. Soil quality. Determination of the toxic effect of pollutants on germination and early growth of higher plants. Dated: 01.01.2011*. Electronic fund of legal and regulatory technical documents; [accessed: 26 January 2023]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200077669> (In Russ.)
11. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. *Практикум по микробиологии: Учебное пособие для вузов*. М.: Дрофа; 2004. 256 с.
- Tepper E.Z., Shil'nikova V.K., Pereverzeva G.I. *Laboratory course on microbiology: textbook for universities*. Moscow: Drofa; 2004. 256 p. (In Russ.)
12. ПНД Ф 16.1:2.2.22-98. Количественный химический анализ почв. Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в минеральных, органогенных, органоминеральных почвах и донных отложениях методом ИК-спектроскопии. Охрана труда в России [процитировано 26 января 2023] Доступно: <https://ohranatruda.ru/upload/iblock/17f/4293831615.pdf>
- PND F 16.1:2.2.22-98. *Quantitative analysis of soils. Method for determination of mass share of petroleum products in organogenic and organomineral soils and bottom sediments of using IR spectrometry*. Oхрана Труда в России [accessed: 26 January 2023] URL: <https://ohranatruda.ru/upload/iblock/17f/4293831615.pdf> (In Russ.)
13. Постановление правительства Ханты-Мансийского Автономного Округа – Югры от 10 декабря 2004 года N 466-п «Об утверждении регионального норматива “Допустимое остаточное содержание нефти и нефтепродуктов в почвах после проведения рекультивационных и иных восстановительных работ на территории Ханты-Мансийского Автономного Округа - Югры”». Доступно: https://prirodnadzor.admhmao.ru/upload/iblock/5cb/466_p.pdf
- Decree of the Government of the Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug – Yugra dt. December 10, 2004, No. 466-p “On Approval of the Regional Standard “Permissible Residual Content of Oil and Oil Products in Soils after Reclamation and Other Restoration Works in the Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug – Yugra”. URL: https://prirodnadzor.admhmao.ru/upload/iblock/5cb/466_p.pdf
14. Капелькина Л.П., Бардина Т.В., Чугунова М.В. и др. Экоотоксикологическая оценка буровых шламов нефтяных месторождений биологическими методами. *Приборы*. 2014;165(3):50–55.
- Kapelkina L.P., Bardina T.V., Chugunova M.V., et al. Ecotoxicological assessment of drill cuttings from oil fields by biological methods. *Instruments*. 2014;165(3): 50–55. (In Russ.)
15. Терехова В.А., Воронина Л.П., Николаева О.В. и др. Применение фитотестирования для решения задач экологического почвоведения. *Использование и охрана природных ресурсов в России*. 2016;3(147):37–41.
- Terekhova V.A., Voronina L.P., Nikolaeva O.V., et al. Application of phytotesting to solve problems of ecological soil science. *Use and Protection of Natural Resources in Russia*. 2016;3(147):37–41. (In Russ.)
16. Agarry S.E., Aremu M.O., Aworanti O.A. Kinetic modelling and half-life study on enhanced soil bioremediation of bonny light crude oil amended with crop and animal derived organic wastes. *Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology*. 2013;4(2):1000137. <https://doi.org/10.4172/2157-7463.1000137>.
17. Aziz S., Ali M.I., Farooq U., et al. Enhanced bioremediation of diesel range hydrocarbons in soil using biochar made from organic wastes. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2020;192(9):569. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08540-7>.
18. Junusmin K.I., Manurung B.S., Darmayati Y. Bioremediation of oil-contaminated sediments by hydrocarbonoclastic bacterial types immobilized in different types of carrier. In: *Proceedings of the 5th International Symposium on Applied Chemistry*. 2019;2175(1):020056 <https://doi.org/10.1063/1.5134620>

19. Bao H.Y., Wang J.F., Zhang H., et al. Effects of biochar and organic substrates on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and microbial community structure in PAHs-contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*. 2020;385:121595. URL://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121595

Об авторах

МИХЕДОВА Елизавета Евгеньевна, младший научный сотрудник, <https://orcid.org/0000-0002-7643-9883>, e-mail: lizamihedova@gmail.com

ВАСИЛЬЕВА Галина Кирилловна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, <https://orcid.org/0000-0002-9766-6452>, ResearcherID: J-3799-2018, Scopus Author ID: 6701534363, e-mail: gkvasilyeva@rambler.ru

СТРИЖАКОВА Елена Робертовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, <https://orcid.org/0000-0001-5303-8190>, e-mail: selenar@rambler.ru

ЛАНКИН Антон Вадимович, кандидат биологических наук, научный сотрудник, e-mail: lankin_a@mail.ru

УЗОРИНА Мария Игоревна, магистрант, e-mail: uzorina.maria@mail.ru

АХМЕТОВ Ленар Имамметдинович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, <https://orcid.org/0000-0002-7916-9284>, ResearcherID: AAB-9579-2020, Scopus Author ID: 12139692500, e-mail: lenarakhmetov@yandex.ru

About the authors

MIKHEDOVA, Elizaveta Evgen'evna, Junior Researcher, <https://orcid.org/0000-0002-7643-9883>, e-mail: lizamihedova@gmail.com

VASILYEVA, Galina Kirillovna, Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, <https://orcid.org/0000-0002-9766-6452>, ResearcherID: J-3799-2018, Scopus Author ID: 6701534363, e-mail: gkvasilyeva@rambler.ru

STRIJAKOVA, Elena Robertovna, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, <https://orcid.org/0000-0001-5303-8190>, e-mail: selenar@rambler.ru

LANKIN, Anton Vadimovich, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, e-mail: lankin_a@mail.ru,

UZORINA, Mariya Igorevna, Master's Student, e-mail: uzorina.maria@mail.ru

AKHMETOV, Lenar Imametdinovich, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, ResearcherID: AAB-9579-2020, Scopus Author ID: 12139692500, <https://orcid.org/0000-0002-7916-9284>, e-mail: lenarakhmetov@yandex.ru

Поступила в редакцию / Submitted 07.02.2023

Поступила после рецензирования / Revised 04.11.2023

Принята к публикации / Accepted 15.11.2023