



УДК 504.064:576.8

Статья

Разработка метода сорбционной биоремедиации нефтезагрязненных минеральных почв Северо-Западной Сибири на примере подзола иллювиально-железистого

Васильева Г. К.^{1,*}, Михедова Е. Е.¹, Стрижакова Е. Р.¹, Ахметов Л. И.²

¹ Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН; soil@pbcras.ru

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН им. Г.К. Скрыбина ФИЦ ПНЦБИ РАН; adm@ibpm.ru

* Ответственный за переписку: gkvasilyeva@rambler.ru;

Цитирование:

Васильева Г.К., Михедова Е.Е., Стрижакова Е.Р., Ахметов Л.И. Разработка метода сорбционной биоремедиации нефтезагрязненных минеральных почв Северо-Западной Сибири на примере подзола иллювиально-железистого. *Biologia et Biotechnologia* 2024, 1, 3. <https://doi.org/10.61847/pbcras.bbt.2024.1.3>

Получено: 25.09.2024

Принято: 18.10.2024

Опубликовано: 07.11.2024

Авторские права: © 2024 год от авторов.

Представлено для публикации в открытом доступе на условиях открытой лицензии.

Реферат: Важной задачей современности является разработка экологических методов очистки почв от загрязнения нефтью и нефтепродуктами. Ранее нами была доказана эффективность метода сорбционной биоремедиации для очистки от нефти ряда почв Восточно-Европейской равнины. Целью данной работы было разработать аналогичный метод для рекультивации подзолистых почв, распространенных на территории Северо-Западной Сибири, где добывается основная часть российской нефти. На основании результатов микрополевого и вегетационного экспериментов с подзолом иллювиально-железистым, загрязненным 6 и 12% нефти, сделан вывод о высокой эффективности метода сорбционной биоремедиации этих почв. В случае умеренно загрязненной почвы наилучшим сорбентом оказался смешанный сорбент АУД на основе гранулированного активированного угля и диатомита, а для сильно загрязненной почвы – композитный сорбент на основе АУД и торфа. Проведение сорбционной биоремедиации этих почв с использованием биопрепарата Микробак на фоне внесения оптимальных доз разработанных сорбентов уже к концу 1-го или 2-го сезонов может обеспечить снижение концентрации нефтепродуктов до уровня, допустимого для рекультивированных почв Ханты-Мансийского автономного округа, предназначенных для лесного использования, а через 2-3 сезона – и для почв сельскохозяйственного назначения. Механизм положительного действия этих сорбентов объясняется снижением токсичности загрязненных почв за счет преимущественно обратимой сорбции углеводородов нефти и их метаболитов, поддержания оптимальной влажности и pH почвы, а также повышения устойчивости микроорганизмов и растений к неблагоприятным факторам, что создает условия для ускоренного разложения поллютантов и минимизации показателей интегральной токсичности почв.

Ключевые слова: супесчаные подзолы; загрязнение нефтью; сорбенты; сорбционная биоремедиация; биопрепарат; фитотоксичность; биотоксичность.

Введение

Важной задачей современности является разработка экологических методов защиты окружающей природной среды от техногенного загрязнения. Одними из основных источников техногенного загрязнения являются места добычи, переработки и транспортировки нефти и нефтепродуктов. По данным Статистического бюллетеня РФ, в период с 2020 по 2022 гг. вследствие утечек при транзите нефти, газа и продуктов переработки нефти ежегодно образовывалось от 124 до 132 тыс. га нарушенных земель [1].

Основная часть углеводородов России добывается на территории Западной Сибири, где по добыче нефти лидирует Ханты-Мансийский автономный округ – Югра (ХМАО), площадь которого достигает 534,8 тыс. км². По его территории проходит около 116 тыс. км трубопроводов нефтегазодобывающей отрасли. Отсюда, самыми распространенными экологическими проблемами являются прорывы на магистральных нефтепроводах (рис. 1) В 2021 г., например, на территории Югры зарегистрировано 942 аварии, из которых более 68% инцидентов – на нефтепроводах [2].



Рисунок 1. Фото нефтеразливов на территории ХМАО вблизи Самотлорского месторождения (авторское фото Михедовой Е.Е.).

Попадая в почву из-за случайной утечки, нефть оказывает сильное негативное воздействие на свойства почвы и почвенную биоту. Наиболее распространенные воздействия нефти включают нагревание, гипоксию, окислительный и осмотический стресс, что приводит к изменению состава почвенных микроорганизмов, угнетает рост растений, а также губительно действует на почвенных беспозвоночных. Сумма этих экологических дисбалансов прямо или косвенно несёт ущерб здоровью человека, поскольку нефтяное загрязнение обладает высокой токсичностью, канцерогенным, мутагенным и тератогенным потенциалом [3]. В Федеральном законе №7 «Об охране окружающей среды» указано, что после ликвидации разлива нефти и нефтепродуктов необходимо провести рекультивационные и иные восстановительные работы в порядке, установленном законодательством РФ [4].

В связи со столь богатыми запасами углеводородов в Северо-Западной Сибири техногенная нагрузка на природные компоненты довольно высока. Нефтяное загрязнение почв приводит к выведению обширных территорий из народнохозяйственного использования. Эти проблемы необходимо решать качественно и быстро, поэтому часто возникает задача выбора наилучшего способа ликвидации последствий загрязнения.

Наиболее перспективным методом очистки почв от нефти является биоремедиация, основанная на способности почвенных микроорганизмов разлагать и утилизировать углеводороды нефти. До сих пор большинство работ, посвященных биоремедиации нефтезагрязненных почв, было направлено на получение новых биопрепаратов на основе выделенных штаммов микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти [5–7]. Однако, применение этого метода обычно рекомендуется только для почв с уровнем содержания углеводородов не выше 5%, а, следовательно, биоремедиация оказывается малоэффективной при решении проблем ликвидации аварийных ситуаций в нефтедобывающих

регионах, где концентрации углеводородов нефти в почве значительно превышают указанный уровень [8].

В ряде аналитических обзоров, рассматривающих расширение возможностей метода биоремедиации, предлагается использование биопрепаратов на основе микроорганизмов-деструкторов, иммобилизованных на сорбентах [9–11]. В последние годы стали появляться работы, в которых показано положительное влияние как самих сорбентов [12–15], так и растительных остатков [16] на скорость биоремедиации почвенных экосистем, загрязненных нефтью и нефтепродуктами.

В наших и других недавних исследованиях было показано, что наиболее приемлемым подходом является применение метода сорбционной биоремедиации почв, который основан на использовании сорбентов в комбинации с приемами классической биоремедиации [3, 17–21]. Данная технология может применяться *in situ* и не требует изъятия и вывоза загрязненных почв. Очищение почвы до необходимого уровня происходит в течение относительно небольшого срока. При этом остается ненарушенным ландшафт, сохраняется аборигенная почва, ценная для чувствительных экосистем северных территорий, а за счет проведения комплекса мелиоративных мер улучшается исходное состояние почвенного покрова, стимулируется развитие аборигенной флоры и фауны. Доказано, что данный способ является наиболее экономически привлекательным, а дополнительные затраты на закупку сорбционных материалов и оплату труда рабочих с лихвой окупаются за счет экономии средств, необходимых для извлечения загрязненного грунта и его доставки к месту утилизации, иногда за сотни и тысячи километров [22].

Ранее нами была продемонстрирована высокая эффективность метода сорбционной биоремедиации для очистки основных типов нефтезагрязненных почв, распространенных в центре Европейской части России. Кроме того, было доказано, что в присутствии сорбентов резко снижается миграция подвижных и токсичных продуктов окисления углеводородов в грунтовые воды в период обработки почв. Установлено, что положительное действие сорбентов связано в основном с обратимой сорбцией токсичных веществ, а также с улучшением физических и физико-химических свойств нефтезагрязненных почв [17–23].

Однако территория основного нефтедобывающего региона страны на Севере Западной Сибири простирается в пределах тундрово-таежных ландшафтов, где одними из основных являются минеральные почвы, а именно подзолы легкого гранулометрического состава [24]. Песчаные подзолы мало обеспечены гумусом, плохо структурированы, растительность не разнообразна. Поэтому, разработка эффективных методов их очистки от нефти весьма актуальна. К настоящему времени разработан ряд технологий для восстановления нефтезагрязненных территорий в условиях холодного климата [25–27], однако, из-за низкой буферности этих почв использование классического метода биоремедиации малоэффективно.

В наших исследованиях была также доказана возможность использования сорбционно-биологического метода для очистки подбуря оподзоленного на хронически загрязненной нефтепродуктами территории, находящейся в Субарктическом регионе на Севере Кольского полуострова [12, 13]. Кроме того, в условиях вегетационных экспериментов на примере глеево-подзолистой почвы, отобранной вблизи г. Уренгоя (ЯНАО), впервые было подтверждено положительное влияние ряда натуральных сорбентов на скорость биоремедиации минеральных почв подзолистого типа, загрязненных умеренными дозами нефти [28].

В настоящее время в РФ отсутствуют общепринятые критерии максимально допустимого уровня нефтепродуктов в почвах. Однако, согласно постановлению правительства ХМАО от 2004 г. [29] в подзоне среднетаежных и северотаежных почв установлены локальные нормативы допустимого остаточного содержания нефти и нефтепродуктов в почвах (ДОСН) после проведения рекультивации и иных восстановительных работ. Для подзолов, относящихся к органо-минеральным почвам легкого гранулометрического состава (легкие суглинки, супеси), установлены следующие максимально допустимые уровни: для верхних аккумулятивных горизонтов дерново-подзолистых почв и подзолов легкого гранулометрического состава, предназначенных для **лесохозяйственного использования** установлены ДОСНлес 15 г/кг, для аналогичных почв, предназначенных для **сельскохозяйственного использования** – ДОСНсх 5 г/кг.

Ряд авторов указывают на 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 [30, 31]. В соответствии с санитарными правилами [32] по определению класса опасности токсичных отходов производства и потребления, при оценке эффективности рекультивации химически загрязненных почв наряду с требованием снижения остаточных концентраций поллютантов в почве до допустимых уровней, необходимо учитывать **интегральную токсичность почвы**, оцениваемую с использованием двух стандартных методов: 1) фитотестирование по длине корней недельных проростков пшеницы/ячменя или по биомассе травянистых растений и 2) биотестирование на гидробионтах: ветвистоусых рачках *Daphnia magna* либо инфузории *Paramecium caudatum*.

Целью данного исследования было изучить влияние сорбентов разных классов на скорость биоремедиации подзола иллювиально-железистого, загрязненного умеренными и высокими дозами нефти, а также подобрать оптимальные условия для проведения сорбционной биоремедиации подзолистых почв Северо-Западной Сибири в широком интервале нефтяного загрязнения и установить возможные сроки достижения допустимых уровней нефтепродуктов в почве и время снижения показателей интегральной токсичности почв до минимального уровня.

Материалы и методы

1. Материалы

Эксперименты проводили на почве **подзол иллювиально-железистый** (АоА1-А2-Вf-Сf). Образец почвы весом около 500 кг был отобран из верхнего 30-сантиметрового слоя на фоновой территории в районе Самотлорского месторождения нефти вблизи г. Нижневартовск. На рисунке 2 показано место отбора образца подзола иллювиально-железистого. Образец почвы был доставлен в Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН (ИФХиБПП РАН) (г. Пушкино Московской обл.) и использован в наших исследованиях на экспериментальной площадке института. Почву после удаления лесной подстилки просеивали через сито 1 см. Лабораторные анализы показали, что почва супесчаная (содержание физ. песка 87.5%; физ. глины 12.5%, илстой фракции 3.8%), слабогумусированная ($C_{орг}$ 0.86%), слабокислая (pH_v 5.7, $pH_{КС1}$ 4.3) и слабообеспеченная биофильными элементами: суммарное содержание азота – 0.7%, доступного фосфора – 1.2 мг $P_2O_5/100$ г, обменного калия – 9.5 мг $K_2O/100$ г.

В экспериментах использовали нефть, полученную от московского нефтеперерабатывающего завода (МНПЗ) «Капотня». Нефть средней плотности (0.87 г/см³), сернистая (массовая доля серы 0.99%), высоко парафинистая (массовая доля парафина 7.5%). Биоремедиацию нефтезагрязненных почв проводили с помощью **биопрепарата «Микробак»**, разработанного в ИБФМ РАН им. Г.К. Скрыбина РАН. Биопрепарат содержит консорциум бактериальных штаммов родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas*. Он 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, содержащих плазмиды, способные разлагать полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) [33].

В ходе экспериментов использовали **сорбенты** натурального происхождения трех классов: минеральные (диатомит и вермикулит вспученный); органические (торф верховой, торф низинный и Спилсорб) и углеродистый – гранулированный активированный уголь (ГАУ). Состав и свойства всех сорбентов приведены в Таблице 1. Помимо индивидуальных сорбентов, использовали смешанный сорбент АУД (смесь ГАУ и диатомита в массовом соотношении 4:1), который показал наилучшие результаты в предыдущих экспериментах [23, 28]. Также использовали смешанные сорбенты на основе торфа верхового и ГАУ, в том числе как с добавками диатомита (АУДТ), так и без него (АУТ).

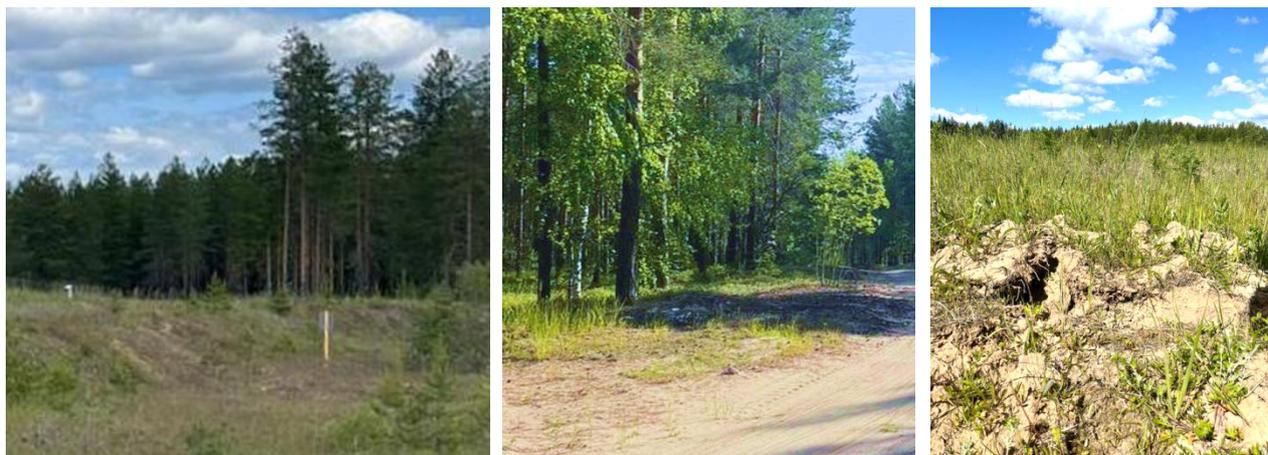


Рисунок 2. Место отбора образца подзола иллювиально-железистого на фоновой территории в районе Самотлорского нефтяного месторождения вблизи г. Нижневартовск (ХМАО) (авторское фото Михедовой Е.Е.).

Таблица 1. Характеристика сорбентов, использованных в экспериментах.

Сорбенты		Шифр	Фракция	Описание, производство
Минеральные	Вермикулит	В	Гранулы 1–3 мм	Вермикулит вспученный, ГОСТ 12865-67, ООО Полимер, Иркутск
	Диатомит	Д	Частицы <0,5 мм	Диатомит (кизельгур), производство ООО «Диатомовый комбинат», г. Ульяновск
Углеродистые	Гранулированный активированный уголь	ГАУ	Гранулы 2–3 мм	Гранулированный активированный уголь, Марка ГАУ ВСК, г. Дзержинск
Органические	Спилсорб	СС	Частицы до 10 мм	Пиролизированный торфяной сфагновый мох, влажность 9%, ООО «Терра-Экология», г. Москва
	Торф низинный	Тн	Частицы до 10 мм	Торф низинный нейтрализованный, пр-во ООО «Здоровая планета», нейтральный, рН 5.5–6.5
	Торф верховой	Тв	Частицы до 15 мм	Торф верховой (ГОСТ Р 51213–98), пр-во ООО «ФАСКО», Московская область, рНв 3.1–4.0
Смешанные	Сорбент АУД	АУД	Разные	Смесь ГАУ и Д (4:1)
	Сорбент АУТ	АУТ	Разные	Смесь Тв и ГАУ (1:1)
	Сорбент АУДТ	АУДТ	Разные	Смесь Тв и АУД (1:1)

В качестве комплексных минеральных удобрений использовали азофоску (АЗФ) с содержанием 16% действующего вещества (д.в.) в пересчете на $N_{\text{сум.}}$, P_2O и K_2O . Известкование проводили с помощью доломитовой муки (ДМ), в состав которой входит 40% $CaCO_3$ и 40% $MgCO_3$ (пр-во ООО «ГЕРА», Московская обл.).

2. Условия проведения экспериментов

Закладывали два типа экспериментов: в микрополевых и вегетационных условиях.

2.1. Микрополевой эксперимент

Микрополевой эксперимент проводили на экспериментальной площадке ИФХиБПП РАН (г. Пушкино Московской обл.). Он был заложен в конце июля 2020 г. и продолжался в течение 3-х сезонов – до конца октября 2022 г., т.е. в течение 27 месяцев. Таким образом, в первый год моделировались погодные условия ХМАО, для которого характерно теплое, но короткое лето.

Эксперимент с подзолом иллювиально-железистым (далее Подзол) проводили в сосудах из поливинилхлорида без дна размером 35×35×35 см³ (площадь образца 0.1 м²), которые вкапывали в землю на глубину 25 см. Исходную почву удаляли на глубину 10 см, дно застилали пластиковой сеткой «серпянкой» и заполняли сосуд экспериментальной почвой – по 10 кг, как описано в [19]. Для моделирования нефтеразлива почву поверхностно загрязняли нефтью в соответствующем количестве и оставляли на 3 суток при температуре воздуха 5–22°C, без осадков. Затем почву тщательно перемешивали на всю глубину (около 10 см), анализировали на исходное содержание нефтепродуктов и сразу же подвергали обработке. Схема микрополевого эксперимента приведена в Таблице 2. Каждый вариант закладывали в 3-х повторностях.

Таблица 2. Схема закладки микрополевого эксперимента.

Шифр	Вариант / сорбент	Доза нефти, масс. %	Доза сорбента, масс. %	Суммарная доза					
				БП, кл./г	АЗФ, мг д.в./кг	ДМ, г/кг			
ЧК	Чистый контроль	-	-	-	150	0.5			
Серия Н1									
НК1	Необрабатываемый контроль	6.0	-	-	-	-			
К1	Контроль 1		-	2×10 ⁷	1000	3.0			
В5	Вермикулит		5						
В10			10						
ГАУ5	ГАУ		5						
ГАУ10			10						
АУД5	АУД		5						
АУД10			10						
Тн10	Торф низинный		10						
Тн20			20						
Тв10	Торф верховой		10						
Тв20			20						
СС10	Спилсорб		10						
СС20			20						
Серия Н2									
К2	Контроль 2	12.0	-				2×10 ⁷	1600	4.8
АУДТ20	АУДТ		20	6.2					

Было заложено 2 серии образцов (**Серия Н1** и **Серия Н2**), которые были загрязнены двумя разными дозами нефти, 6 и 12% на сухой вес почвы, соответственно. В **Серии Н1** были заложены два контрольных образца, в том числе необрабатываемый контроль (**НК1**), а также контроль (**К1**), который обрабатывали методом классической биоремедиации, заключающемся во внесении биопрепарата на основе нефтедеструкторов, а также основных биофильных элементов (НРК), известковании для поддержания оптимального рН почвы и создании оптимальных аэрогидротермических условий (периодическое перемешивание) для активации микроорганизмов. Помимо этого, были заложены образцы с применением метода сорбционной биоремедиации, где почву обрабатывали так же, как в контроле **К1**, но на фоне дополнительного внесения сорбентов. В качестве сорбентов использовали вермикулит, ГАУ, АУД, торф верховой, торф низинный, Спилсорб. Сорбенты вносили в дозах, близких к оптимальным, определенным на основе наших предыдущих экспериментов [19, 28].

В **Серии Н2** из-за ограниченного объема почвы было заложено только 2 варианта: контроль **К2** без сорбентов и вариант с композитным сорбентом АУДТ20. Было сделано предположение, что при сильном загрязнении такой малогумусированной супесчаной почвы, как подзол иллювиально-железистый, эффективность ремедиации можно повысить за счет внесения 20% композитного сорбента АУДТ, состоящего из смеси равных количеств торфа верхового и смешанного сорбента АУД.

Дополнительно был заложен вариант с фоновой чистой почвой, который использовался в качестве чистого контроля (**ЧК**) для оценки фито- и биотоксичности загрязненных почв. В каждой серии опыта все загрязненные образцы почв (контрольные и опытные с сорбентами) обрабатывали одинаково за исключением дополнительного внесения доломитовой муки в некоторые образцы.

На первом этапе в сосуды вносили сорбенты в соответствии со схемой, почву тщательно перемешивали, а через сутки вносили комплексные минеральные удобрения в виде азофоски. В образцах **Серии Н1** и **Серии Н2** суммарная доза АЗФ составила, соответственно, 1000 и 1600 мг/кг в пересчете на каждое действующее вещество: N, P₂O₅ и K₂O. Удобрения вносили в 4 приема: в самом начале обработки, а также через 1.5, 9 и 11 мес. При этом около 75% от этой дозы АЗФ было внесено в течение 1-го сезона, а остальное количество – в течение 2-го сезона. Суммарное количество минеральных удобрений было рассчитано исходя из примерного соотношения исходного содержания углерода нефтепродуктов к суммарному содержанию д.в. биофильных элементов C:N:P:K=40:1:0.4:0.8.

Одновременно с биофильными элементами (во избежание сильного подкисления почвы) вносили доломитовую муку (ДМ). Ее дозу рассчитывали исходя из трехкратного количества ДМ к весу АЗФ в пересчете на сухой вес. Кроме того, через 2 и 12.5 месяцев в некоторые образцы вносили дополнительное количество ДМ. Сигналом для этого служило сильное подкисление почвы (до pH<6.0), которое фиксировалось в основном в вариантах с органическими сорбентами, примерно через неделю после внесения минеральных удобрений. В конечном итоге суммарная доза ДМ, внесенной в образцы с максимальными дозами органических сорбентов, была в 1.5–2.5 раза выше, чем в контроле **К1** или в вариантах с добавками минеральных и углеродистых сорбентов. Дозы АЗФ и ДМ в контроле **ЧК** были снижены до уровней, рекомендуемых в сельском хозяйстве.

Через 1 сутки после 1-го и 2-го внесения АЗФ и ДМ во все образцы с загрязненной почвой (за исключением **НК1**) вносили биопрепарат Микробак (далее БП) в количестве 10⁷ кл./г в соответствии с рекомендациями разработчиков [33]. В ходе всего эксперимента почву во всех сосудах (кроме **НК1**) по мере необходимости увлажняли отстоянной водопроводной водой во избежание сильного пересушивания. Во время внесения добавок или при отборе образцов на анализ почву в сосудах перемешивали на всю глубину экспериментального образца. В начале 2-го и 3-го сезонов почву в сосудах засеивали смесью семян клевера красного (*Trifolium pratense*) и райграса высокого (*Arrhenatherum elatius*) в соотношении 1:1 в количестве 1 г/сосуд, а через 2 или 3 месяца растения удаляли.

В ходе инкубирования почву периодически перемешивали и отбирали образцы для определения различных характеристик. Определяли суммарное содержание углеводов нефти (УВН) и промежуточных продуктов окисления углеводов нефти (ОУВН). Кроме того, определяли численность углеводород-окисляющих микроорганизмов в почве и ее дегидрогеназную активность, а также водный pH и полевую влажность почвы. Через 11 мес. (30.04.2021 г.) и 23 мес. (05.06.2023 г.) после начала обработки для оценки интегральной токсичности почв определяли их фитотоксичность стандартным методом по длине корней проростков пшеницы (*Triticum vulgare*), а также биотоксичность в остром и хроническом биотестах с *Daphnia magna*. Биотест на дафниях был повторен через 27 мес. (02.10.2023 г.) после начала обработки.

2.2 Вегетационный эксперимент

Вегетационный эксперимент **Серии Н2в** закладывали одновременно с экспериментом в микрополевых условиях. Его основная цель была оценить правильность выбора состава и дозы композитного сорбента АУДТ. Для этого были заложены образцы **Серии Н2в** с почвой, загрязненной 12% нефти, в котором сравнивали результаты, полученные в вариантах с двумя дозами (10 и 15%) торфа низинного или АУД, а также с двумя дозами (15 и 20%) смешанных сорбентов на основе торфа: с добавкой диатомита (АУДТ) и без него (АУТ). Из-за сложного состава сорбента АУДТ к нему был применен термин «композитный».

Эксперимент закладывали с образцами почвы весом 1 кг, которые помещали в пластиковые вегетационные сосуды на 1.5 л. с отверстиями в дне и с поддонами. Схема закладки эксперимента приведена в Таблице 3. Все обработки почвы проводили практически с теми же дозами БП, что и

в микрополевом эксперименте, но с несколько большими дозами АЗФ и ДМ, которые вносили примерно в те же сроки, что и в микрополевом эксперименте. Дозы АЗФ были немного увеличены, так как в этих образцах были обнаружены несколько более высокие исходные уровни УВН и их метаболитов по сравнению с образцами микрополевого эксперимента. Все образцы закладывали в 3-х повторностях.

Почву в сосудах во время вегетационного периода инкубировали на экспериментальной площадке под дугами с укрывным материалом, а в холодный период – в условиях оранжереи при температуре 20–25°C. Почву в сосудах периодически увлажняли, не давая ей пересыхать, ежемесячно перемешивали и периодически отбирали на анализ.

Таблица 3. Схема закладки вегетационного эксперимента – *Серия Н2в*.

Шифр	Вариант	Доза нефти, масс. %	Доза сорбента, масс. %	Суммарная доза		
				БП, кл./г	АЗФ, мг д.в./кг	ДМ, г/кг
<i>ЧК</i>	Чистый контроль	-	-	-	150	0.5
<i>К2в</i>	Контроль <i>К2в</i>	12.0	-	2×10 ⁷	1800	5.4
АУД10	АУД		10			
АУД15			15			
Тв10	Торф верховой		10			
Тв15			15			
АУТ15	АУТ		15			
АУТ20			20			
АУДТ15	АУДТ		15			
АУДТ20			20			

Кроме того, через 4 и 14 мес. определяли фитотоксичность почвы стандартными методами: по длине корней проростков пшеницы и по фитомассе 1-месячных растений райграса.

3. Методы анализа

Суммарное содержание углеводов нефти (УВН) в почве определяли сертифицированным методом ИК-спектрии ПНД Ф 16.1:2.2.22-98 [34]. Для этого воздушно сухие образцы почвы экстрагировали четыреххлористым углеродом, экстракт очищали путем пропускания через колонку с окисью алюминия и измеряли концентрацию УВН в очищенных экстрактах по поглощению при длине волны 3.42 мкм с помощью ИК-спектрометра на концентратомере КН-2М (Сибприбор, Россия). Кроме того, оценивали суммарное **содержание продуктов окисления углеводов нефти** (ОУВН) разработанным нами методом – по количеству полярных С–Н-содержащих соединений. Эту величину оценивали по разнице между суммарной концентраций С–Н-содержащих соединений и их неполярных производных (соответственно в неочищенных и очищенных экстрактах), как описано в [18].

Численность углеводород-окисляющих микроорганизмов (УОМ) в почве определяли методом посева почвенной суспензии соответствующего разведения на минимальную агаризованную среду, где источником углерода и энергии служили пары дизельного топлива [35]. **Дегидрогеназную активность почвы** определяли методом, описанным в [36]. **Водный рН почвы** измеряли с помощью рН метра в суспензии почвы в дистиллированной воде при соотношении 1:2.5.

Фитотоксичность почвы определяли тремя методами. Для выбора дозы сорбента и наблюдения за процессом очистки фитотоксичность почвы регулярно определяли по гибели семян клевера ползучего (белого) (*Trifolium repens* L.) с помощью разработанного нами экспресс-метода [37]. Кроме того, в конце 2-го и 3-го сезонов определяли **фитотоксичность** почв стандартными методами: по задержке роста корня 7-дневных проростков пшеницы (*Triticum vulgare*), проращиваемых в оптимальных условиях (при температуре воздуха 20±2°C, влажности воздуха 60±5% и влажности почвы 70±5% от ППВ) в соответствии с ИСО 11269-1:2012 [38], либо по

изменению фитомассы растений. В последнем случае почву во всех вегетационных сосудах засеивали семенами райграса пастбищного (*Lolium perenne*), через 1 месяц растения вынимали, промывали водой, высушивали при 40°C и определяли их сухой вес. Фитотоксичность почвы рассчитывали по снижению показателей всхожести или роста растений по сравнению с аналогичными показателями в чистом контроле.

Одновременно с определением фитотоксичности по ростовым параметрам растений определяли **биотоксичность почвы** с помощью биотестов на гидробионтах – по смертности *Daphnia magna* в водно-почвенном экстракте в соответствии с ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06, Т 16.1:2.3.3.9-06 [39].

4. Статистическая обработка результатов.

Все результаты представлены в виде средних величин из 3-х повторностей со стандартными отклонениями. Содержание УВН и ОУВН в почве, а также различные почвенные характеристики в каждом образце сравнивали с аналогичными параметрами в соответствующих контрольных образцах почвы **К** с помощью критерия Стьюдента и программы STATISTICA10. Различия считались значимыми при $p < 0.05$ ($n=3$).

Результаты

1. Результаты микрополевого эксперимента

На рисунках 3-5 показаны результаты микрополевого эксперимента с подзолом иллювиально-железистым и двумя уровнями нефтяного загрязнения. На рисунке 3 приведены данные по динамике изменения концентраций УВН и ОУВН в почве **Серии Н1**, загрязненной 6% нефти, а также динамике изменения различных характеристик почвы в ходе ее биоремедиации. Результаты экспериментов **Серии Н1** показали, что исходные концентрации УВН и ОУВН в почве, измеренные через 3 сут. после внесения нефти были, соответственно, 31.8 ± 1.3 и 10.3 ± 2.1 г/кг из-за быстрого испарения легколетучих углеводородов и, возможно, из-за частичного микробного разложения УВН. При проведении биоремедиации умеренно загрязненной почвы **разложение УВН** в контроле **К1** протекало сравнительно быстро, и за первые 4 месяца концентрация УВН в почве снизилась до 11.2 ± 0.9 г/кг. Затем разложение нефти замедлилось, и к концу 2-го и 3-го сезонов (через 14 и 27 мес., соответственно) остаточные концентрации УВН в **К1** достигали 9.4 ± 0.5 и 6.1 ± 0.8 г/кг, а ОУВН – 9.0 ± 0.9 и 4.4 ± 0.4 г/кг, соответственно. В необрабатываемом контроле **НК1** концентрация УВН в почве снизилась лишь до 25.7 ± 2.2 г/кг, а концентрация ОУВН даже возросла до 15.5 ± 0.9 г/кг.

Внесение сорбентов всех 3-х классов существенно ускорило разложение УВН, но это явление наблюдалось преимущественно в первые 4 месяца, затем процесс замедлился во всех образцах почв. К концу 3-го сезона концентрации УВН в некоторых вариантах с сорбентами АУД5, Тн10 и СС10 варьировали в интервале 5.0–5.9 г/кг, а в остальных вариантах – в интервале 6.0–8.4 г/кг. При этом разница между Концентрациями УВН в опытных образцах и в контроле **К1** во многих случаях была статистически недостоверной. Различие между содержанием ОУВН в почти во всех опытных образцах незначительно отличалось от контрольного уровня, и лишь в присутствии 10% АУД и 20% СС в первые месяцы накапливалось примерно вдвое меньшее количество ОУВН, чем в **К1**.

Более существенные различия между опытными и контрольным образцами наблюдались для некоторых свойств почвы, особенно для показателей ее **фитотоксичности**. В первые 2 месяца в контроле **К1** семена клевера белого (*Trifolium repens*) почти полностью погибали, затем фитотоксичность постепенно снижалась, но даже к концу 2-го и 3-го сезонов она оставалась повышенной: до 35 ± 5 и $27 \pm 3\%$, соответственно. В то же время, внесение всех исследованных сорбентов (кроме 20% СС) резко снизило фитотоксичность почвы в первые 3–4 месяца до малотоксичного уровня (9–25%). Однако в присутствии всех органических сорбентов, особенно Спилсорба, фитотоксичность почвы вновь временно повышалась до 29–64% в зависимости от сорбента.

Изменения фитотоксичности почвы согласуются не только со снижением концентрации поллютантов, но и с динамикой изменением **pH почвы**. В контроле **К1**, а также в присутствии обеих доз вермикулита, ГАУ и АУД, уровень pH почвы колебался, в основном, в пределах от 6.0 до 7.3. В то

же время добавки органических сорбентов в дозе 10% и, еще более, 20% приводили к резкому подкислению почвы до pH 5.0–5.8 в зависимости от сорбента. Наиболее сильно снижался pH в варианте СС20. В большинстве случаев подкисление почвы сопровождалось повышением фитотоксичности и лишь своевременное внесение дополнительного количества ДМ обеспечивало нейтрализацию избыточной кислотности почвы, что сопровождалось снижением уровня фитотоксичности. В общей сложности для поддержания pH почвы, близкого к нейтральному, в образцах с органическими сорбентами потребовалось внесение примерно в 1.5–2.5 раза более высоких доз ДМ (Таблица 2).

В период наиболее быстрого снижения концентрации УВН наблюдалось практически симметричное повышение *численности углеводов-окисляющих микроорганизмов*, которая во всех образцах достигала максимума в первые 1.5–3 месяца обработки. В контроле *К1* численность УОМ возрастала до 260 ± 33 млн КОЕ/г, тогда как в большинстве вариантов с сорбентами максимальная численность УОМ была в несколько раз выше. При этом наибольшее увеличение средней максимальной численности УОМ (до 900–1200 млн КОЕ/г) наблюдалось в вариантах с обеими дозами вермикулита и АУД. В почвах с добавками 10% органических сорбентов численность УОМ также существенно повышалась, однако в присутствии высоких доз (20%) органических сорбентов максимум УОМ снижался до 350–450 млн КОЕ/г и приближался среднему контрольному уровню в *К1*.

Аналогичным образом изменялась величина *дегидрогеназной активности* почвы (ДГА). Через 2–3 месяца ДГА повышалась до максимума: в контроле *К1* – до 31.2 ± 3.0 мг ТФФ/г в ч., в вариантах с минеральными/углеродистыми сорбентами – до 51–65, а с органическими – до 28–46 мг ТФФ/г в ч. К концу сезона величина ДГА снизилась, и в дальнейшем регистрировалось лишь небольшое превышение ДГА по сравнению с чистой почвой: в пределах 2.7–5.0 и 0.6–0.7 мг ТФФ/г в ч, соответственно.

Иная картина наблюдалась при измерении полевой *влажности почвы*. По способности удерживать влагу в нефтезагрязненной почве сорбенты располагались в ряду: ГАУ < АУД < В < Тн = Тв < СС, причем величина полевой влажности почв возрастала с увеличением дозы сорбентов. В контроле *К1* влажность почвы в середине 1 и 2-го сезонов оставалась низкой (от 8 до 10%), в присутствии ГАУ и АУД она возрастала до 11–12 и 13–18% соответственно, а в вариантах с вермикулитом – до 22–28%. Но наиболее высокая влажность почвы (до 22–38%) поддерживалась во всех вариантах с органическими сорбентами.

На рисунке 4 приведены динамики изменения тех же характеристик почвы *Серии Н2* с высоким уровнем загрязнения (*К2* и АУДТ20), где они сравниваются с результатами 3-х вариантов *Серии Н1* (*К1*, АУД5 и АУД10). Сравнение полученных результатов показало, что разложение УВН в контроле *К2* протекало значительно медленнее, чем в менее загрязненной почве.

В первые 4 мес. *содержание УВН* снизилось с 67.0 ± 2.9 до 38.8 ± 4.4 г/кг, после чего процесс разложения резко замедлился, а к концу 3-го сезона концентрация УВН оставалась сравнительно высокой (22.3 ± 2.8 г/кг), тогда как в варианте АУДТ20 концентрация УВН за этот период снизилась до 7.2 ± 2.5 г/кг.

В сильно загрязненной почве перед началом обработки обнаруживали повышенные уровни ОУВН (13.4 ± 0.9 г/кг), концентрация которых медленно снижалась в течение всего периода. К концу наблюдений их содержание в опыте и контроле снизилось до 6.1 ± 0.6 и 8.2 ± 0.8 г/кг соответственно, а разница в содержании ОУВН между этими вариантами в большинстве точек отбора была статистически недостоверной. Таким образом, в почвах *К2* и АУДТ20 к концу наблюдений произошло разложение УВН на 67 и 89% соответственно, а концентрация ОУВН в обоих образцах снизилась на 40–55%.

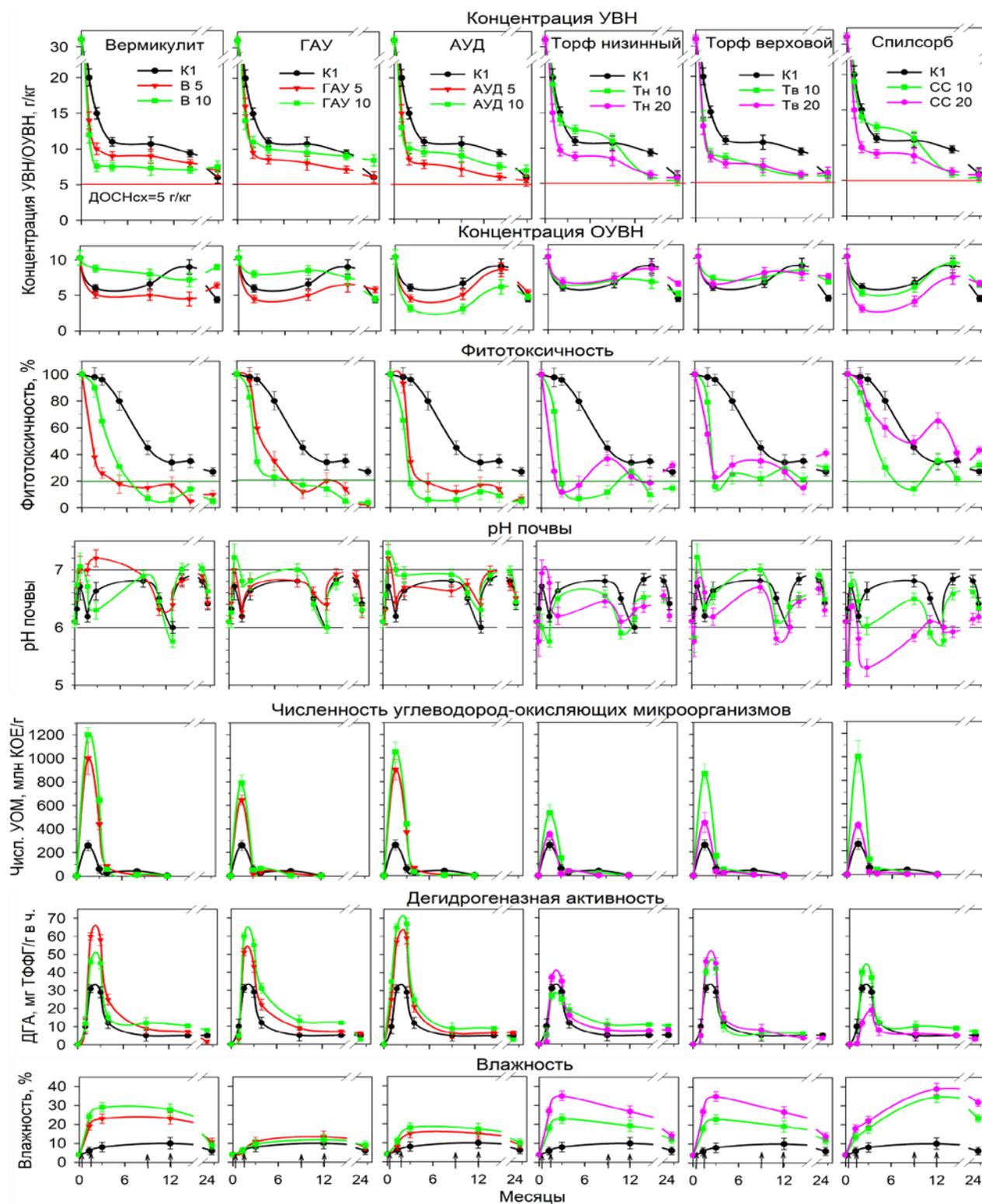


Рисунок 3. Влияние двух доз (5 и 10%) минеральных и углеродистых сорбентов (В, ГАУ, АУД) и двух доз (15 и 20%) органических сорбентов (Тн, Тв, СС) на динамику изменения содержания УВН и ОУВН, а также характеристик почвы в ходе биоремедиации Подзола, загрязненного 6% нефти, в условиях микрополевого эксперимента *Серии Н1*. Здесь и далее стрелками указано время внесения АЗФ и ДМ; красными линиями отмечены уровни ДОСН, а зелеными – уровни минимальной фито- и биотоксичности почв.

Другие характеристики почв *Серии Н2* изменялись аналогично почвам *Серии Н1*, но в сильнозагрязненной почве разница между опытными и контрольным образцами по ряду показателей была более существенной. Вплоть до конца 3-го сезона **фитотоксичность** почвы *К2* оставалась очень высокой (>70%), тогда как в варианте АУДТ20 она снизилась до минимума (<20%) уже в первые месяцы обработки и далее поддерживалась на уровне 19–25%. В сильно загрязненном контроле *К2* наблюдался более низкий максимум **численности УОМ**, чем в *К1*, однако в варианте АУДТ20 этот показатель был на порядок выше, чем в *К2*: 450.3 ± 42.1 и 58.4 ± 4.6 млн КОЕ/г соответственно.

Аналогичная картина наблюдалась и по максимальным показателям **ДГА**. В опыте и контроле *К2* максимум ДГА достигал 37.2 ± 3.1 и 10.2 ± 1.4 мг ТФФ/г в час. соответственно. В первые месяцы обработки в *Серии Н2* наблюдалось существенное подкисление почвы до pH 5.5, однако в дальнейшем за счет дополнительного внесения ДМ в варианте АУДТ20 удалось поддерживать уровень pH почв близкий к нейтральному, хотя в этом композитном сорбенте также присутствовал торф. Но особенно заметная разница наблюдалась между показателями **полевой влажности почв**. В образцах АУДТ20 полевая влажность почвы в ходе инкубирования колебалась в интервале 23–31%, тогда как в контроле *К2* она не превышала 10%, что связано с высокой гидрофобностью сильно загрязненной почвы.

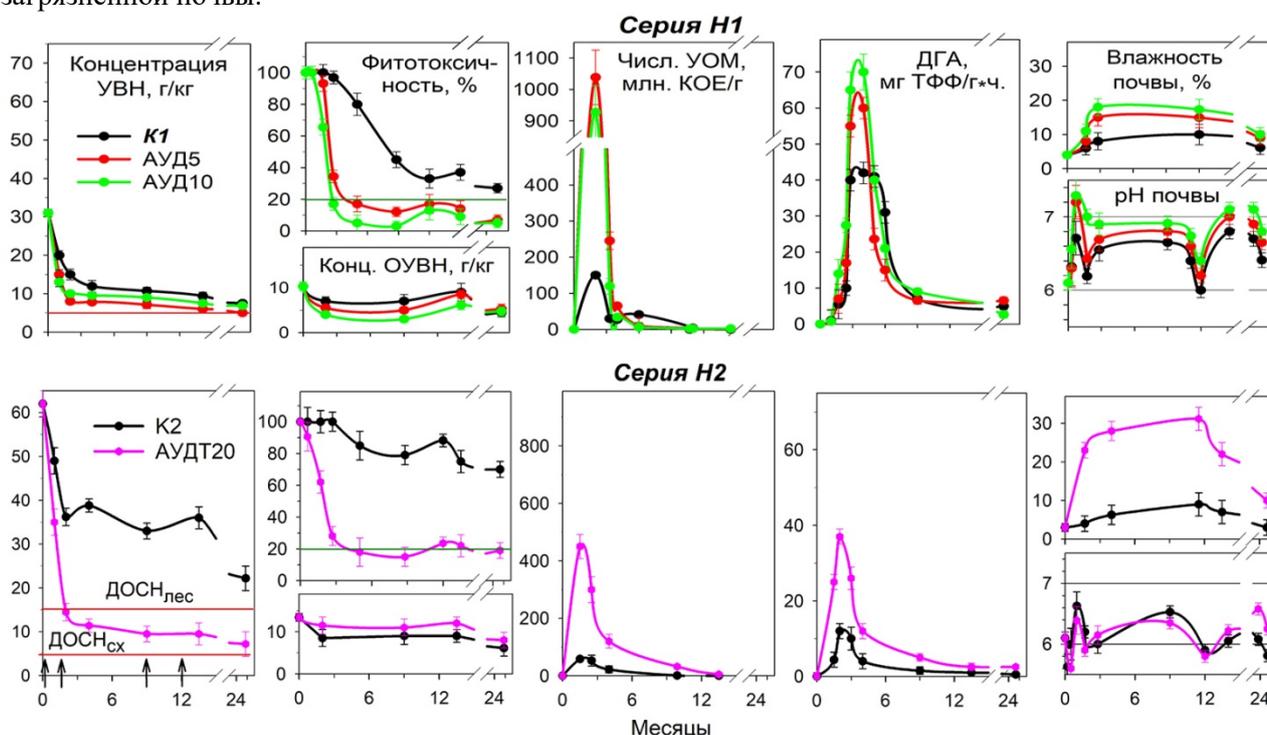


Рисунок 4. Влияние двух доз (5 и 10%) смешанного сорбента АУД и композитного сорбента АУДТ в дозе 20% на динамику изменения концентраций УВН и ОУВН в образцах Подзола, загрязненного, соответственно, 6% и 12% нефти, а также различных характеристик загрязненных почв в ходе трехлетнего микрополевого эксперимента в наилучших вариантах *Серии Н1* и двух вариантах *Серии Н2* соответственно.

На рисунке 5 приведены данные оценки показателей **интегральной токсичности почв** в конце 2-го и 3-го сезонов, где они сравниваются также с показателями pH почв. Представлены данные определения фитотоксичности почв сертифицированным методом по длине корней проростков пшеницы, а также биотоксичности по смертности *Daphnia magna* в остром и хроническом опытах. Во 2-м сезоне (через 11 мес.) в почве из необработанного контроля *НК1* высейнные растения полностью погибали, а на 3-й год рост корней ингибировался на $54 \pm 4\%$. В контроле *К1* во 2-м и 3-м сезонах **фитотоксичность почв**, оцененная сертифицированным методом, снизилась до 74 ± 6 и $25 \pm 4\%$ соответственно, тогда как в контроле *К2* этот показатель оставался еще очень высоким ($66 \pm 7\%$) до конца 3-го сезона.

С другой стороны, в **Серии Н1** уже во 2-м сезоне фитотоксичность почв с добавками АУД снизилась до минимума (12–15%), а в присутствии вермикулита и ГАУ – до 21–43%, тогда как в вариантах со всеми органическими сорбентами она оставалась высокой – в пределах 35–95%. Повышенная фитотоксичность почвенных образцов с органическими сорбентами совпадала с понижением рН почв до 6.0 и менее. Однако, в 3-м сезоне в большинстве вариантов с сорбентами фитотоксичность почв приблизилась к минимуму (<20%) за исключением почвы варианта СС20 с рН <6.0, где длина корней проростков еще была достоверно ниже на 32–34%, чем в чистом контроле. В **Серии Н2** фитотоксичность почвы АУДТ20 в середине 3-го сезона снизилась до минимума, тогда как в контроле **К2** она оставалась очень высокой (66±5%).

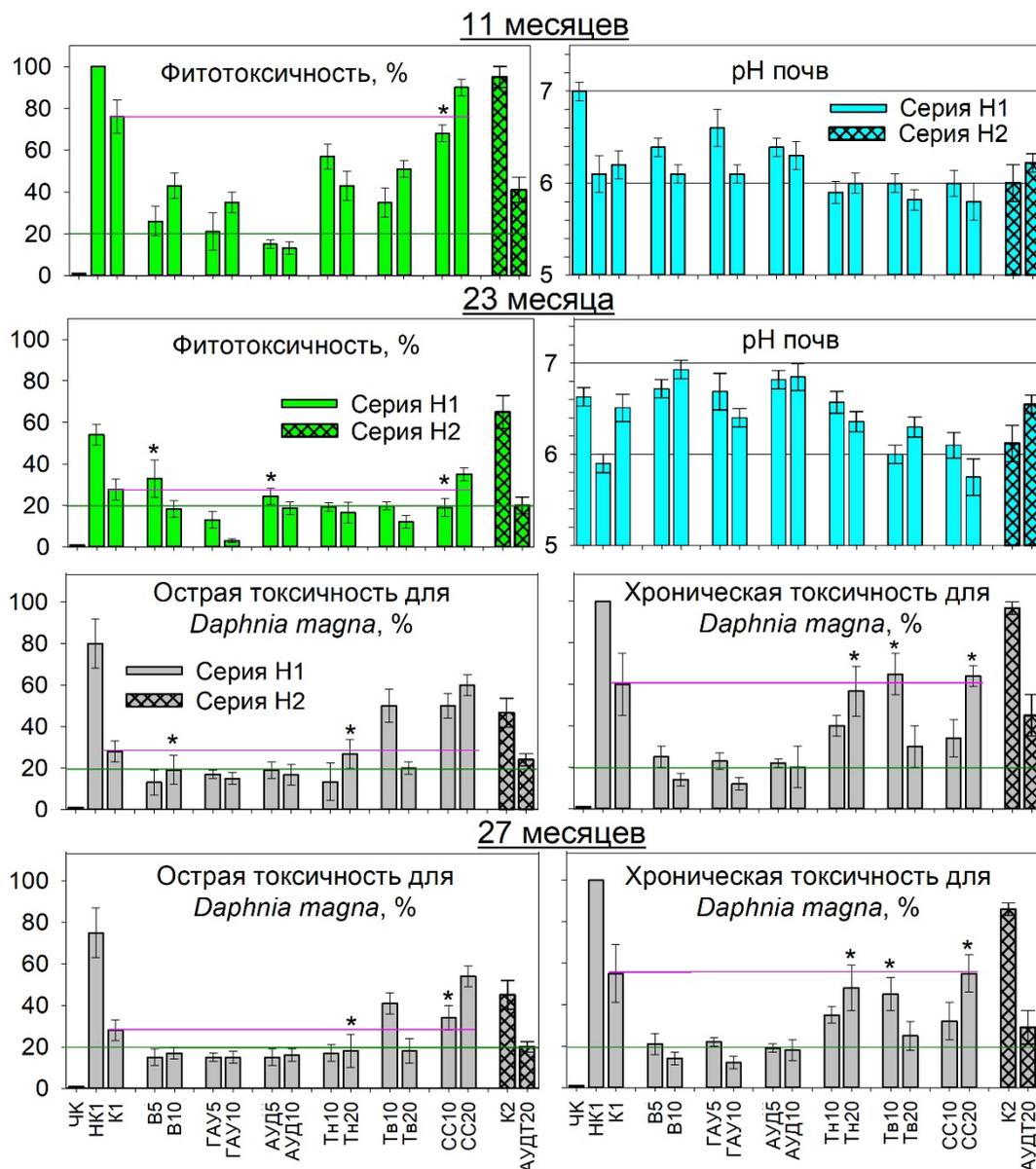


Рисунок 5. Влияние одной или двух доз сорбентов (В, ГАУ, АУД, Тн и Тв, СС, АУДТ), на показатели интегральной токсичности и рН почвы Подзол, загрязненной 6 и 12% нефти, оцененные через 11, 23 и 27 мес. после начала обработки в условиях микрополевого эксперимента **Серии Н1** и **Серии Н2**. Интегральную токсичность почвы оценивали по длине корней проростков пшеницы (*Triticum vulgare*), а также по биотоксичности в остром и хроническом биотестах с *Daphnia magna*. Звездочками отмечены варианты, в которых разница между опытными и контрольной вариантами была недостоверной ($p < 0.05$). Шифры соответствуют вариантам, приведенным в Таблице 2. Малиновыми прямыми отмечен уровень фито- и биотоксичности почвы в контроле **К1**.

Данные по фитотоксичности подтверждаются результатами *биотестов на гидробионтах Daphnia magna*, при этом результаты, полученные с помощью дафний, показывают еще более высокий уровень биотоксичности почв, чем с помощью фитотестирования.

Наиболее значимые различия проявляются при определении хронической токсичности водно-почвенных суспензий, оцениваемой по размножению дафний. В вариантах *Серии Н1* в последнем сезоне биотоксичность образцов *НК1*, как острая, так и хроническая, была очень высокой и колебалась в пределах 75–80 и 98–99% соответственно. В контроле *К1* эти показатели снизились лишь до 27–28 и 55–60%, соответственно. Внесение минеральных и углеродистых сорбентов уже через 23 мес. обеспечило достоверное снижение смертности дафний по сравнению с контролем *К1*, а через 27 мес., и в остром, и в хроническом биотесте этот показатель снизился до минимума (<20%). Однако те же показатели для большинства образцов с органическими сорбентами до конца наблюдений оставались повышенными.

В то же время в *Серии Н2* в середине и конце 3-го сезона показатели острой и хронической токсичности контрольной почвы *К2* оставались высокими: в пределах 44–48 и 69–74% соответственно. В противоположность этому, обработка сильнозагрязненной почвы методом сорбционной биоремедиации с внесением 20% АУДТ к концу 3-го сезона обеспечила снижение этих показателей до 20 ± 2 и $28\pm 9\%$, соответственно, т.е. почти до допустимого уровня (<20%).

2. Результаты вегетационного эксперимента

Результаты вегетационного эксперимента представлены на рисунках 6 и 7. На рисунке 6 показана динамика изменения содержания УВН и ОУВН в почвах, а также разных почвенных свойств в ходе всего периода наблюдения. Из представленных данных следует, что все изученные сорбенты оказывали положительное действие на скорость разложения нефти. К концу 3-го сезона концентрация УВН в контроле *К2в* снизилась с 71.2 ± 3.4 до 16.3 ± 1.1 г/кг. При этом в почве первоначально накапливались значительные количества ОУВН – 20.9 ± 3.8 г/кг, затем их концентрация в контроле сначала несколько возрастала, а к концу эксперимента снизилась с до 13.3 ± 0.7 г/кг.

В присутствии всех сорбентов разложение УВН ускорилось, особенно в первые месяцы, а через 26 мес. остаточные концентрации УВН в этих почвах были в 1.5–2 раза ниже, чем в контроле *К2в*. Наиболее быстро разложение УВН, как и ожидалось, протекало в вариантах АУДТ15 и АУДТ20, в которых остаточные концентрации УВН в конце 1-го сезона варьировали в пределах 13.9–17.3 г/кг, а к концу 3-го сезона – в пределах 4.9–6.1 г/кг, причем отличие между вариантами с разными дозами АУДТ в обоих случаях было статистически недостоверным. В остальных образцах с сорбентами разложение УВН протекало немного медленнее, а в конце 3-го сезона остаточные концентрации УВН варьировали в интервале 8.4–10.5 г/кг, то есть в вариантах с сорбентами к концу наблюдений концентрация УВН снизилась на 85–92% по сравнению с 77% в *К2в*, а в наилучших вариантах (с АУДТ) она достигла уровня ДОСНсх.

Фитотоксичность почв с сорбентами в *Серии Н2в* снижалась значительно быстрее, чем в контроле *К2в*, а наилучшие результаты также были продемонстрированы в вариантах с двумя дозами композитного сорбента АУДТ, где минимальный уровень фитотоксичности (<20%) был достигнут через 7–12 мес., тогда как в почве с другими смешанными сорбентами – только через 13–26 мес. Образцы с добавками одного торфа, также, как и контрольные образцы *К2в*, наоборот, сохраняли повышенную фитотоксичность (до 35–50%) вплоть до конца наблюдений.

В вегетационном эксперименте, так же, как и в микрополевом, повышенная фитотоксичность образцов с добавками обеих доз торфа коррелировала с существенным понижением *pH почвы* – до уровня <6.0. Величины pH образцов со смешанным сорбентом АУТ в некоторые периоды времени также были пониженными, но в меньшей степени, чем с одним торфом. С другой стороны, в вариантах с добавками АУД и АУДТ pH почв колебался в основном в интервале от 6.0 до 7.4.

Во всех образцах вегетационного эксперимента **численность УОМ** повышалась в первые месяцы после начала обработки. При этом наблюдалось 2 максимума их численности: через 2 и 5 мес., т.е. примерно через 1,5–2 мес. после первых двух внесений основной части АЗФ и ДМ.

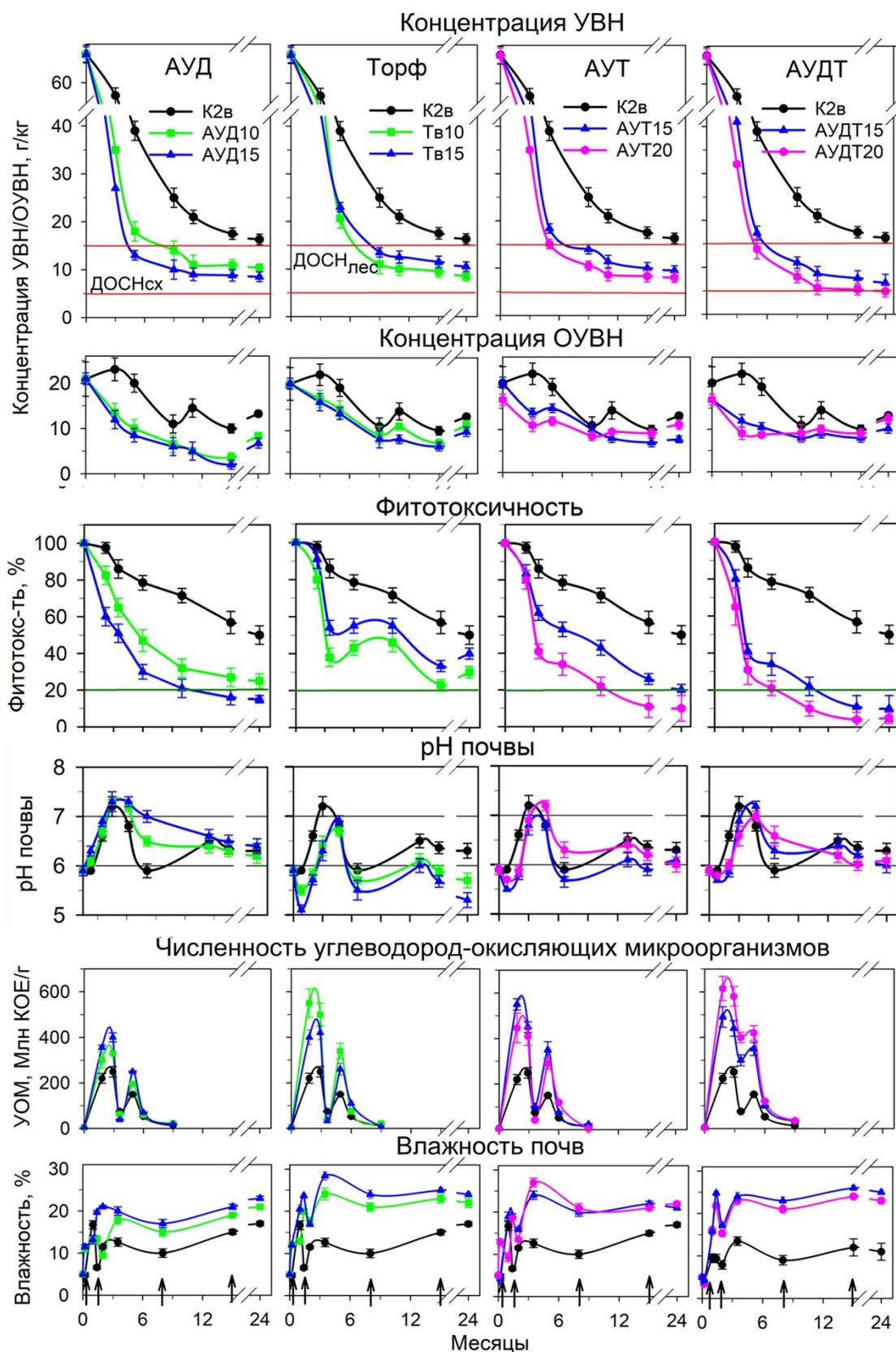


Рисунок 6. Влияние двух доз (10 и 15%) сорбентов АУД и Тв и двух доз (15 и 20%) АУТ и АУДТ на динамику изменения концентраций УВН и ОУВН в почве Подзол, загрязненной 12% нефти, а также на изменение характеристик почвы в условиях вегетационного эксперимента *Серии Н2в*. Измерялись фитотоксичность почвы, оцененная экспресс-методом, численность УОМ в почвах, их водный pH и влажность.

Максимальная численность УОМ наблюдалась в вариантах АУДТ20 (615 ± 54 млн КОЕ/г), тогда как в остальных образцах с сорбентами максимум численности УОМ варьировал в интервале 298–554 млн КОЕ/г.

Кроме того, в образцах с сорбентами на основе торфа, поддерживалась наиболее высокая *влажность почв* (от 20 до 28%), в образцах с добавками АУД она колебалась в пределах 17–23%, однако, в большинстве случаев этот показатель достоверно превосходил влажность контрольной почвы *К2в*, колебавшейся в пределах 6–16%.

На рисунке 7 представлены данные *фитотоксичности* почв *Серии Н2в*, определенной стандартными методами. Фитотоксичность контрольной почвы через 4 и 14 мес. оставалась очень высокой: 97.2 ± 2.0 и $80.7 \pm 1.8\%$ соответственно.

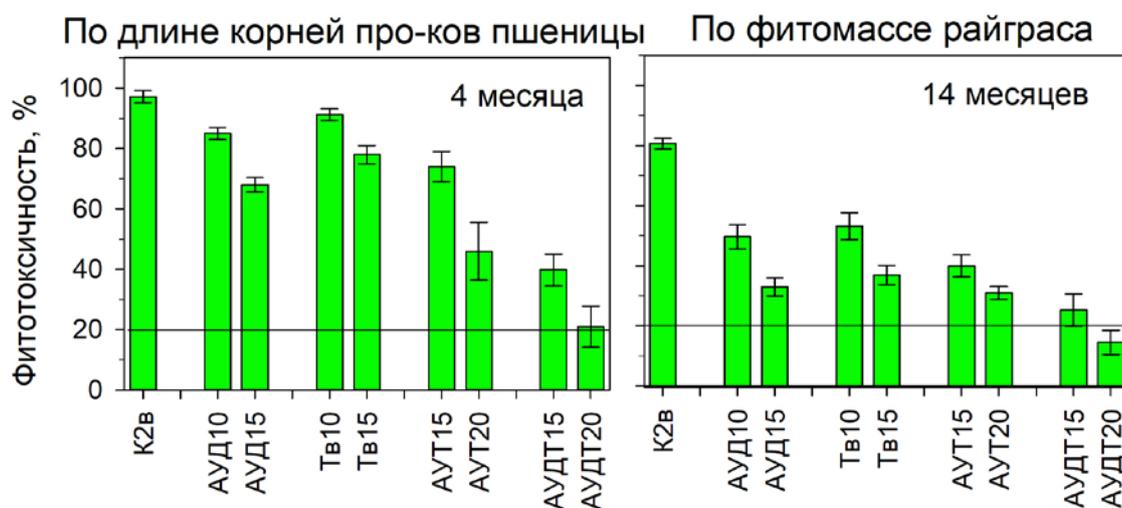


Рисунок 7. Влияние сорбентов АУД и Тв, внесенных в дозах 10 и 15%, а также АУТ и АУДТ, внесенных в дозах 15 и 20%, на фитотоксичность Подзола, загрязненного 12% нефти, в вегетационном эксперименте *Серии Н2в*. Через 4 мес. фитотоксичность почв оценивали по длине корней проростков пшеницы (*Triticum vulgare*), а через 14 мес. – по сухой фитомассе 1-месячных растений райграса пастбищного (*Lolium perenne*).

При этом, в оба срока наблюдений в вариантах с сорбентами фитотоксичность почв снижалась в ряду Тв>АУД>АУТ>АУДТ, и во всех случаях фитотоксичность почв с сорбентами была достоверно ниже, чем в контроле *К2в*. Для почв с большей дозой сорбента этот показатель был ниже, чем с его меньшей дозой. Причем, через 14 месяцев фитотоксичность почвы в варианте АУДТ20 снизилась до минимума (<20%), а в АУДТ15 – до $26.3 \pm 6.4\%$. В остальных вариантах с сорбентами к этому времени наблюдений фитотоксичность почв была выше и колебалась в пределах 31–49%.

Обсуждение

Таким образом, результаты микрополевого эксперимента показали, что при проведении биоремедиации умеренно загрязненных почв *Серии Н1* (6% нефти), как классическим методом (контроль *К1*), так и методом сорбционной биоремедиации на фоне внесения разных натуральных сорбентов, уже к концу 1-го сезона концентрация УВН снизилась с 31.8 ± 1.3 г/кг до уровня ниже допустимого для почв лесохозяйственного назначения – ДОСНлес. При этом, к концу 3-го сезона использование ряда сорбентов (5% АУД5 и 10% Тн или СС) обеспечило снижение остаточных концентраций УВН в почве до 5.5 ± 0.5 г/кг, т.е. практически до уровня ДОСНсх. В образцах с органическими сорбентами, как и в контроле *К1*, остаточные концентрации УВН колебались в интервале 6.0–8.4 г/кг, и таким образом также приблизились к уровню ДОСНсх. При этом разница между некоторыми вариантами и контролем отсутствовала.

Однако, в сильно загрязненной почве *Серии Н2* (12% нефти) аналогичное снижение концентрации УВН до указанных допустимых уровней наблюдалось только при проведении сорбционной биоремедиации на фоне внесения 20% АУДТ, тогда как в контрольной почве *К2*

конечная концентрация УВН (22.2 ± 1.8 г/кг) оставалась существенно выше обоих допустимых нормативов.

Результаты вегетационного эксперимента *Серии Н2в* подтвердили высокую эффективность сорбционной биоремедиации сильно загрязненной почвы с использованием композитного сорбента АУДТ. Хотя все изученные сорбенты и их смеси, входящие в состав АУДТ (торф, АУД и АУТ), внесенные в дозах 10, 15 или 20%, оказывали положительное действие на скорость биоремедиации сильно загрязненного нефтью Подзола, однако наилучшие результаты были получены с добавками композитного сорбента АУДТ. Сорбционная биоремедиация Подзола на фоне внесения 15 и 20% АУДТ за 4 мес. обеспечила снижение концентрации УВН с 71.2 ± 3.4 г/кг до уровня ДОСНлес, а через 14 мес. остаточные концентрации УВН в этих почвах приблизились к уровню ДОСНсх. При этом, разложение УВН сопровождалось накоплением наименьших (по сравнению с другими образцами) концентраций продуктов микробного окисления углеводов – ОУВН.

В то же время, сравнение показателей фито- и биотоксичности почв показало иные результаты. В почвах *Серии Н1*, не смотря на снижение остаточных концентраций УВН до допустимых уровней, снижение фито- и биотоксичности до минимума наблюдалось лишь в почвах с добавками обеих доз (5 и 10%) минеральных или углеродистых сорбентов (АУД, ГАУ и вермикулит). Остальные почвы (контроль *К1* и варианты с добавками органических сорбентов) проявляли еще значительную фитотоксичность вплоть до конца 3-го сезона. В вариантах с органическими сорбентами повышенная фитотоксичность коррелировала с понижением рН почв до величин 5.6–6.1. Факт высокой токсичности этих почв можно объяснить присутствием в них повышенных концентраций метаболитов ОУВН, токсичность которых, как было показано ранее [18], может быть существенно выше, чем самих углеводов. Кроме того, из-за снижения сорбции этих полярных кислородсодержащих соединений в почвах с пониженным рН их токсическое действие на растения и особенно на гидробионты может еще более повышаться.

Эти выводы подтверждаются результатами, полученными для сильнозагрязненной почвы *Серии Н2*. Через 3 года обработки классическим методом биоремедиации в контроле *К2* наблюдались остаточные концентрации УВН, значительно превышавшие оба допустимых уровня ДОСН. Это указывает на то, что токсическое действие на рост растений, а также на выживаемость и размножение дафний, могут оказывать сами углеводороды, остаточные концентрации которых в этой почве превышают критический уровень. В то же время, более высокий уровень биотоксичности, оцененной по гибели и размножению дафний в водных вытяжках, по сравнению с фитотоксичностью, оцениваемой по росту растений в почве, может также свидетельствовать о дополнительном токсическом действии метаболитов ОУВН, которые вследствие сравнительно высокой водорастворимости обладают более высокой подвижностью и токсичностью, чем исходные углеводороды. Полученные результаты подтверждают выводы ряда авторов о необходимости наряду с достижением допустимого уровня по содержанию нефтепродуктов в рекультивированных почвах учитывать интегральные показатели их токсичности [30, 31].

На основании полученных результатов можно также сделать вывод о высокой эффективности метода сорбционной биоремедиации для очистки от нефти подзола супесчаного. При этом, в случае умеренно загрязненной почвы наилучшим сорбентом для проведения сорбционной биоремедиации является смешанный сорбент АУД, дополнительное внесение которого в дозе, близкой к исходному уровню загрязнения, может обеспечить рекультивацию подзола иллювиально-железистого в короткие сроки. В течение первого теплого сезона концентрация УВН может снизиться до уровня ДОСНлес, а к концу 2-го или 3-го сезонов – до уровня ДОСНсх, причем к концу обработки показатели интегральной токсичности этих почв снизятся до требуемого минимума – <20%.

С другой стороны, для очистки сильно загрязненного нефтью Подзола рекомендуется внесение композитного сорбента АУДТ в дозе, двукратно превышающей исходный уровень содержания нефтепродуктов. Это объясняется повышенной гидрофобностью сильно загрязненной нефтью супесчаной подзолистой почвы, которая обусловлена ее низкой буферностью. В то же время, в сильнозагрязненной почве на фоне внесенного композитного сорбента АУДТ создаются более благоприятные условия для развития микроорганизмов-деструкторов, о чем свидетельствует также максимальное повышение численности углеводород-окисляющих микроорганизмов и более высокие,

чем в контроле, показатели дегидрогеназной активности этих почв, наблюдаемые в период максимальной скорости разложения углеводов.

Ускорение разложения углеводов нефти во всех изученных образцах в присутствии АУД или АУДТ можно объяснить созданием наиболее благоприятных условий для активации микроорганизмов-деструкторов нефти за счет нескольких факторов. Это может быть связано с понижением токсичности почвы за счет преимущественно обратимой сорбции углеводов, а также вследствие меньшего накопления токсичных продуктов окисления ОУВН. Основную роль в этом процессе, по-видимому, играет **активированный уголь**, обладающий высокой поглотительной способностью по отношению ко многим органическим соединениям.

Положительную роль добавок **диатомита** в сорбентах АУД и АУДТ можно объяснить способностью этого минерала выделять моно- и поликремниевые кислоты, которые повышают устойчивость растений к стрессу, а также снижают прочное связывание высокоядерных представителей ПАУ, входящих в состав нефти. Этот эффект был продемонстрирован в наших предыдущих исследованиях по биоремедиации нефтезагрязненных почв Русской равнины [18, 19, 23], а также для глеево-подзолистой почвы, отобранной на территории ЯНАО [28].

Другой механизм положительного влияния сорбентов АУД и, еще более, АУДТ на скорость биоремедиации нефтезагрязненного Подзола обусловлен поддержанием оптимальной влажности почвы в ходе ее обработки, что особенно важно в случае высокого уровня загрязнения. При этом наибольший эффект обеспечивают добавки **торфа**, который значительно повышает влагоемкость нефтезагрязненных почв, что было доказано нами в предыдущих исследованиях [19]. В то же время в присутствии торфа, особенно на фоне внесения высоких доз минеральных удобрений, возможно значительное подкисление почвы из-за разложения присутствующих в нем растительных остатков. Однако внесение торфа в смеси с активированным углем снижает возможное подкисление почвы за счет присутствующих в нем зольных элементов Са и Mg. Об этом свидетельствует также меньшая доза ДМ, внесенная для нейтрализации избыточной кислотности в почву вариантов с АУДТ, по сравнению с самим торфом.

Заключение

Результаты исследований, проведенных в условиях микрополевого и вегетационного экспериментов с подзолом иллювиально-железистым, загрязненным 6 и 12% нефти, продемонстрировали более высокую эффективность применения метода сорбционной биоремедиации по сравнению с классическим методом биоремедиации с помощью биопрепаратов на основе выделенных штаммов микроорганизмов-нефтедеструкторов. При этом важными факторами, влияющими на скорость микробного разложения углеводов, являются выбор дозы и формы сорбента, а также дозы комплексных минеральных удобрений и доломитовой муки, которые должны поддерживать оптимальный уровень доступных для микроорганизмов углеводов в почве, необходимое соотношение углерода и биофильных элементов, а также обеспечивать уровень кислотности почвы, близкий к нейтральному.

Таким образом, на примере экспериментов с загрязненным сырой нефтью подзолом иллювиально-железистым была показана перспективность использования метода сорбционной биоремедиации для ликвидации аварийных ситуаций вследствие утечек нефти на поверхности минеральных почв, распространенных в нефтедобывающем регионе на территории Северо-Западной Сибири. Установлено, что наилучшим сорбентом для проведения сорбционной биоремедиации умеренно загрязненных почв является АУД (смесь гранулированного активированного угля и диатомита, 4:1), а для сильно загрязненной почвы наилучшие результаты были получены с добавками композитного сорбента на основе АУД и торфа (1:1).

Применение метода сорбционной биоремедиации нефтезагрязненных подзолистых почв на фоне внесения оптимальных доз этих сорбентов может в течение уже одного-двух вегетационных сезонов обеспечить снижение концентрации нефтепродуктов до уровня, допустимого для рекультивированных почв ХМАО, предназначенных для лесного использования, а через 2–3 сезона обработки – и для почв сельскохозяйственного назначения. При этом, показатели интегральной токсичности почв будут снижены до минимума.

Механизм положительного действия этих сорбентов объясняется снижением токсичности почв за счет преимущественно обратимой сорбции углеводородов нефти и их метаболитов, поддержания оптимальной влажности и рН почвы, а также повышения устойчивости микроорганизмов и растений к неблагоприятным факторам, что создает условия для ускоренного разложения поллютантов и минимизации показателей интегральной токсичности почв.

Вклад авторов

К.б.н. Васильева Г.К. планировала исследования и писала основной текст статьи, к.б.н. Михедова Е.Е. проводила анализы почв и писала результаты экспериментов, к.б.н., с.н.с. Стрижакова Е.Р. выполняла анализы почв и писала раздел Методы анализа, Ахметов Л.И. подготовил к применению биопрепарат Микробак и определял численность микроорганизмов-деструкторов, а также участвовал в обсуждении результатов. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Основные показатели охраны окружающей среды. Статистический бюллетень. // [Электронный ресурс]. Федеральная служба государственной статистики, М., 2023. -105 с. Доступен по ссылке: https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/oxr_bul_2023.pdf. (дата посещения 01.10.2023).
2. Доклад «Об экологической ситуации в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре в 2021 году» [Электронный ресурс] — Ханты-Мансийск, 2022 год. Доступен по ссылке: <https://prirodnadzor.admhmao.ru/upload/iblock/fa0/МАКЕТ-DOKLADA-2021.docx> (дата посещения 15.09.2024).
3. Vasilyeva G. K., Strijakova E. R., Ortega-Calvo J-J. Remediation of soils polluted by oil industries. *In Soil Remediation, Science and Technology*, Ed. by J-J. Ortega-Calvo, F. Coulon (Germany, Springer-Nature, 2024, pp. 191-239. DOI: 10.1007/698_2024_1080.
4. Федеральный закон от 10.01.2002 г. № 7-ФЗ "Об охране окружающей среды" (Электронный ресурс). Статья 46, пункт 14, подпункты 4–5. Доступен по ссылке: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_34661/66adaab0989b794d736d9eb8e3a3ac44bf40a039/ (дата посещения 31.01.2023).
5. Naeem U., Qazi M. A. Leading edges in bioremediation technologies for removal of petroleum hydrocarbons. *Environ Sci Pollut Res Int.*, **27** (22), 27370–27382 (2020). DOI: 10.1007/s11356-019-06124-8.
6. Ławniczak Ł., Wozniak-Karczewska M., Loibner A. P., Heipieper H. J., Chrzanowski Ł. Microbial degradation of hydrocarbons – basic principles for bioremediation: a review. *Molecules*, **25** (4), 856 (2020). DOI: 10.3390/molecules25040856.
7. Yuniati M. D. Bioremediation of petroleum-contaminated soil: a review. *Earth Environ Sci.*, **118** (012063) (2018). DOI: 10.1088/1755-1315/118/1/012063.
8. De la Huz R., Lastra M., López J. Other environmental health issues: oil spill. *In Encyclopedia of Environmental Health*, Ed. by J. Nriagu (Burlington, NJ, USA, Elsevier, 2018), pp. 251–255. DOI: 10.1016/B978-0-12-409548-9.11156-X.
9. Башкин В. Н., Лужков В. А., Трубицина О. П. Разработка биосорбента для ликвидации последствий углеводородных загрязнений на объектах нефтегазового комплекса. *Проблемы анализа риска*, **18** (1), 40-51 (2021). DOI: 10.32686/1812-5220-2021-18-1-40-51.
10. Федорова О. С., Бондарь П. Н., Рязанова Т.В. Влияние биосорбента «унисорб-био» с иммобилизованной микрофлорой родов *Bacillus* и *Trichoderma* на восстановление почвы в условиях нефтяного загрязнения. *Журнал СВУ. Химия*. **15** (2), 289–297 (2022). DOI: 10.17516/1998-2836-0293.

11. Cui J.-Q., He Q.-S., Liu M.-H., Chen H., Sun M.-B., Wen J.-P. Comparative study on different remediation strategies applied in petroleum-contaminated soils. *Int J Environ Res Public Health*, **17** (5), 1606 (2020). DOI: 10.3390/ijerph17051606.
12. Мязин В. А., Исакова Е. А., Васильева Г. К. Влияние гранулированного активированного угля на скорость биоремедиации почв Мурманской области, исторически загрязненных нефтепродуктами. *Проблемы региональной экологии*, **2**, 20–26 (2020). DOI: 10.24411/1728-323X-2020-12020.
13. Myazin V. A., Korneikova M. V., Chaporgina A. A., Fokina N. V., Vasilieva G. K. The effectiveness of biostimulation, bioaugmentation and sorption-biological treatment of soil contaminated with petroleum products in the Russian Subarctic. *Microorganisms*, **9**, 1722 (2021). DOI: 10.3390/microorganisms9081722.
14. Minnikova T., Kolesnikov S., Ruseva A., Kazeev K., Minkina T., Mandzhieva S., Sushkova S. Influence of the biochar on petroleum hydrocarbon degradation intensity and ecological condition of haplic chernozem. *Eur J Soil Sci*, **11** (2), 157–166 (2022). DOI: 10.18393/ejss.1037798.
15. Zavgorodnyaya Y. A., Stepanov A. A., Trofimov S. Y., Farkhodov Y., Pervakova V. N., Sokolova T. A., Aptikaev R. S. Effect of introduction of clays, mineral fertilizers, and soil ameliorants on decomposition of organic pollutants in oil-polluted sand under conditions of model experiment. *Moscow University Soil Sci Bull.*, **72** (1), 35–41 (2017). DOI: 10.3103/S0147687417010070.
16. Уркапа С. Р., Ено О. Н. Modeling of *Azadirachta indica* leaves powder efficiency for the remediation of soil contaminated with crude oil. *Chem Internat.*, **7** (1), 62–70 (2021). DOI: 10.5281/zenodo.4032367.
17. Васильева, Г. К., Стрижакова Е. Р., Бочарникова Е. А., Семенюк Н. Н., Яценко В. С., Слюсаревский А. В., Барышникова Е. А. Нефть и нефтепродукты как загрязнители почв. Технология комбинированной физико-биологической очистки загрязненных почв. *Российский химический журнал*, **57** (1), 79–104 (2013).
18. Vasilyeva G., Kondrashina V, Strijakova E., Ortega-Calvo J.-J. Adsorptive bioremediation of soil highly contaminated with crude oil. *Sci Tot Environ.*, **706**, 135739 (2020). DOI: 10.1016/j.stotenv.2019.135739.
19. Vasilyeva G., Mikhedova E., Zinnatshina L., Strijakova E., Akhmetov L., Sushkova S., Ortega-Calvo J.-J. Use of natural sorbents for accelerated bioremediation of grey forest soil contaminated with crude oil. *Sci Tot Environ.*, **850**, 157952 (2022). DOI: 10.1016/j.stotenv.2022.157952.
20. Al-Muqbel D., Otifi M., Aly R., Darra R., Al-Othman A., Tawalbeh M., Halalshah N. Bioremediation of petrochemical sludge from soils. In *Metagenomics to Bioremediation*. Ed. by V. Kumar, M. Bilal, S. K. Shahi, V. K. Carg (Elsevier Science, 2022), pp. 379–402. DOI: 10.1016/B978-0-323-96113-4.00009-3.
21. Sozina I. D., Danilov A. S. Microbiological remediation of oil-contaminated soils. *J Mining Inst.*, **260**, 297–312 (2023). DOI: 10.31897/PMI.2023.8.
22. Слюсаревский А. В., Зиннатшина Л. В., Васильева Г. К. Сравнительный эколого-экономический анализ методом рекультивации нефтезагрязненных почв путем биорекультивации *in situ* и механической замены грунта. *Экология и промышленность России*, **22** (11), 40–45 (2018). DOI: 10.18412/1816-0395-2018-11-40-45.
23. Kondrashina V., Strijakova E., Zinnatshina L., Bocharnikova E., Vasilyeva G. Influence of activated carbon and other additives on bioremediation rate and characteristics of petroleum-contaminated soils. *Soil Sci. (Special Issue)*, **138** (4), 150–159 (2018). DOI: 10.1097/SS.0000000000000234.
24. Середина В. П., Садыков М. Е., Блохина С. Л. Физическое состояние фоновых почв нефтяных месторождений средней тайги Западной Сибири. *Вестник Томского государственного университета. Биология.*, **4** (16), 17–29 (2011).
25. Башкин В. Н., Галиулин Р. В. Рекультивация нарушенных почв на Тазовском полуострове. *Жизнь Земли*, **2**, 153–159 (2020). DOI 10.29003/m1385.0514-7468.2020_42_2/153-159.
26. Chaudhary D. K., Kim J. New insights into bioremediation strategies for oil-contaminated soil in cold environments. *Biodegradation*, **142**, 58–72 (2019). DOI: 10.1016/J.IBIOD.2019.05.001.

27. Korneykova, M. V., Myazin V. A., Fokina N. V., Chaporgina A. A. Bioremediation of soil of the Kola Peninsula (Murmansk region) contaminated with diesel fuel. *Geography Environment Sustainability*, **14** (1), 171–176 (2021). DOI: 10.24057/2071-9388-2019-170.
28. 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*, **28** (4), 595–605 (2023). DOI: 10.31242/2618-9712-2023-28-4-595-605.
29. 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"».
30. Капелькина Л. П., Бардина Т. В., Чугунова М. В., Бакина Л. Г., Герасимов А. О., Бардина В. И., Малышкина Л. А. Экотоксикологическая оценка буровых шламов нефтяных месторождений биологическими методами. *Приборы*, **3** (165), 50-55 (2014).
31. Терехова В. А. Биотестирование почв: подходы и проблемы. *Почвоведение*, **2**, 190–198 (2011).
32. СП 2.1.7.1386-03. Санитарные правила по определению класса опасности токсичных отходов производства и потребления, 2003. 20 с.
33. Filonov A., Akhmetov L., Puntus I., Solyanikova I. Removal of oil spills in temperate and cold climates of Russia: experience in the creation and use of biopreparations based on effective microbial consortia. *In: Biodegradation, pollutants and bioremediation principles*. Ed. by E. D. Bidoia, R. N. Motagnolli (Boca Raton, CA, USA, Taylor's & Francis CRC Press), pp. 137–159 (2021). DOI:10.1201/9780429293931-7.
34. 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-спектromетрии. Москва, 2006, 21 с.
35. Теппер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. И. Практикум по микробиологии: 5-е издание, В. К. Шильникова. (Дрофа, Москва, 2004). 256 с.
36. Хазиев Ф. Х. *Методы почвенной энзимологии*, Ф. Х. Хазиев. (Наука.ю Москва, 2005). 252 с.
37. Vasilyeva G. K., Kondrashina V. S., Strijakova E. R., Pinsky D. L. Express-phytotest for choosing conditions and following process of soil remediation. *Environ Geochem Health.*, **44** (2) 433–445 (2020), DOI: 10.1007/s10653-020-00727-8.
38. ИСО 11269-1:2012 - Качество почвы. Определение воздействия загрязняющих веществ на флору почвы, 2012.
39. ПНД Ф Т 14.1:2.4.12-06, Т 16.1:2.3.3.9-06. Токсикологические методы анализа. Методика определения острой токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по смертности дафний (*Daphnia magna Straus*), утв. ФГУ «ФЦАО» 19.04.2011. 33 с.