

Научная статья

УДК 502.654:631.4:665.6

DOI: 10.15372/KhUR2025658

EDN: JBUQUH

Биоремедиация мерзлотных почв с разными сроками нефтезагрязнения: особенности и оценка эффективности

С. Х. ЛИФШИЦ[✉], Ю. С. ГЛАЗНЕЦОВА, О. Н. ЧАЛАЯ, И. Н. ЗУЕВА

ФИЦ “Якутский научный центр СО РАН”, Институт проблем нефти и газа СО РАН, Якутск, Россия

E-mail: lifsara@yandex.ru[✉], glyaz1408@mail.ru, oncha@ipng.ysn.ru, inzu@ipng.ysn.ru

Аннотация

Биоремедиация служит наиболее актуальным и востребованным способом очистки почв от нефтезагрязнений, особенно в северных регионах. Приведены результаты натурных экспериментов по изучению влияния давности нефтезагрязнения на эффективность микробиологической ремедиации почв на территории бывшего нефтепровода (юго-запад Якутии). Очистку проводили путем внесения биопрепарата на основе накопительных культур аборигенных углеводородокисляющих микроорганизмов, предварительно выделенных из почв данной территории. Установлено, что степень деструкции свежего загрязнения через год после проведения биоремедиации составила 77.4 %, а для старого 7-летнего загрязнения – всего 34.3 % (от уровня, оставшегося через 7 лет после разлива). Впервые снижение эффективности процессов биоремедиации рассмотрено с позиций цепного свободно-радикального механизма микробиологического окисления. В отсутствие легкоокисляемого субстрата, в данном случае – алканов от $n\text{-C}_{12}$ до $n\text{-C}_{24}$, а также 12,13-метилалканов, которые за 7 лет деградировали естественным путем, инициирование окисления замедлялось и внесение биопрепарата уже не позволило достигнуть высокой степени очистки. Кроме того, образование промежуточных продуктов реакции (высокомолекулярных нафтено-ароматических углеводородов) могло тормозить цепной процесс окисления вследствие образования устойчивых промежуточных радикалов. Новообразование смол, отмеченное в процессе биоремедиации, приводит к гидрофобизации почв и нарушению их водно-воздушного режима, что также могло отрицательно влиять на процессы окислительной деградации нефтезагрязнения. Показано, что способ биоремедиации нефтезагрязненных почв наиболее эффективен в случае свежих нефтезагрязнений.

Ключевые слова: свежее и старое нефтезагрязнение почв, биоремедиация, микробиологическое окисление, цепной свободно-радикальный механизм

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания (рег. № 122011200369-1) Института проблем нефти и газа СО РАН – обособленного подразделения ФИЦ ЯНЦ СО РАН, финансируемого Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования ФИЦ ЯНЦ СО РАН (Якутск).

Для цитирования: Лифшиц С. Х., Глазнецова Ю. С., Чалая О. Н., Зуева И. Н. Биоремедиация мерзлотных почв с разными сроками нефтезагрязнения: особенности и оценка эффективности // Химия в интересах устойчивого развития. 2025. Т. 33, № 3. С. 337–347. DOI: 10.15372/KhUR2025658. EDN: JBUQUH.

Bioremediation of cryogenic soils with fresh and old oil pollution: specific features and assessment of efficiency

S. KH. LIFSHITS , Y. S. GLYAZNETSOVA, O. N. CHALAYA, I. N. ZUEVA

Federal Research Center "The Yakut Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences", Institute of Oil and Gas Problems SB RAS, Yakutsk, Russia

E-mail: lifsara@yandex.ru , glyaz1408@mail.ru, oncha@ipng.ysn.ru, inzu@ipng.ysn.ru

Abstract

Bioremediation is the most relevant and popular method of soil purification from oil pollution, especially in the northern regions. The results of field experiments to study the influence of the age of oil pollution on the efficiency of microbiological remediation of soils on the territory of the former oil pipeline (southwest of Yakutia) are presented. Purification was carried out by introducing the biological preparation based on enrichment cultures of indigenous hydrocarbon-oxidising microorganisms, previously isolated from the soils of this territory. It was found that the degree of destruction of fresh pollution a year after bioremediation was 77.4 %, and for old 7-year-old pollution it was only 34.3 % (of the level that remained 7 years after the oil spill). For the first time, a decrease in the efficiency of bioremediation processes has been considered from the standpoint of the chain free radical mechanism of microbiological oxidation. In the absence of a readily oxidised substrate, specifically alkanes from $n\text{-C}_{12}$ to $n\text{-C}_{24}$, as well as 12,13-methylalkanes, which naturally degraded over 7 years, the initiation of oxidation slows down, and the addition of the biological preparation no longer allows achieving high purification efficiency. In addition, the formation of intermediate reaction products (high-molecular naphthenic-aromatic hydrocarbons) could inhibit the chain oxidation process due to the formation of stable intermediate radicals. The new formation of resins during bioremediation leads to hydrophobisation of soils and disruption of their water-air regime, which also could have a negative effect on the oxidative biodegradation of oil pollution. It has been shown that the method of bioremediation of oil-contaminated soils is most effective in the case of fresh oil spills.

Keywords: fresh and old oil pollution of soils, bioremediation, microbiological oxidation, chain free radical mechanism

ВВЕДЕНИЕ

Нефть и нефтепродукты являются в настоящее время основными загрязнителями окружающей среды. Разработка месторождений, транспорт, переработка и хранение углеводородного сырья неизбежно связаны с различного рода утечками, разливами, а иногда и крупномасштабными авариями [1–4]. Несмотря на предпринимаемые усилия к уменьшению аварийных ситуаций, количество их не падает, а масштабы экологических последствий растут [5–7]. При попадании нефти в почву разрушается сложившийся почвенный микробиом, гибнет расти-

тельность, в том числе высшая [8]. В настоящее время разработано много способов восстановления почв от нефтезагрязнений [3, 9]. Однако тип почвы, климатические особенности региона, состав загрязнителя оказывают влияние на выбор того или иного способа очистки [3, 10, 11], что повышает актуальность поиска эффективных методов борьбы с нефтезагрязнениями.

Процессы самовосстановления почв от нефтезагрязнений протекают медленно, особенно это касается северных территорий [8, 12–14]. Длительный период отрицательных температур в приповерхностных слоях мерзлотной почвы определяет низкие скорости протекания микро-

биологических процессов, в ходе которых и осуществляется биodeградация нефтезагрязнения. Для сохранения экологического благополучия почвенных экосистем необходимо изучение процессов трансформации нефтезагрязнения и разработка восстановительных мероприятий. На начальном этапе наиболее целесообразной является механическая очистка почв от нефтезагрязнений. Иногда ее совмещают с выемкой загрязненного грунта для очистки его на специально выделенных площадках или для складирования в шламовых амбарах. Однако для северных территорий нарушение почвенного покрова противопоказано из-за возможной деградации мерзлоты [13]. В дальнейшем наиболее экологичным и эффективным является использование биологических методов, основанных на естественных процессах разложения нефти в природе, – методах биоремедиации [15–18]. Под биоремедиацией понимают окислительную деструкцию нефтезагрязнения под влиянием углеводородоокисляющих микроорганизмов (УОМ). Биоремедиация может осуществляться либо путем активации в нефтезагрязненной почве собственной углеводородоокисляющей микрофлоры, либо путем внесения УОМ в виде биопрепаратов [19, 20].

Микроорганизмы, использующие углеводороды в качестве источника питания, распространены в природе [21]. Различные штаммы микроорганизмов имеют избирательную способность к окислению углеводородов [22]. Специфика микробиологического окисления нефти и нефтепродуктов обусловлена своеобразием углеводородов как химических соединений [23]. Наиболее изучены пути деградации микроорганизмами алканов, как одних из самых доступных соединений [24, 25]. Углеводороды, имеющие в составе молекулы разветвленную цепь атомов, менее доступны биохимическому окислению из-за пространственных затруднений при взаимодействии “субстрат – фермент”. Циклоалканы поддаются биологическому разложению труднее алканов. Это связано с наличием цикла, который окисляется сложнее, чем молекулы с линейной структурой [24]. Ароматические углеводороды наиболее токсичны для живых организмов. Устойчивость полициклических ароматических углеводородов к биodeградации увеличивается с ростом количества конденсированных ароматических ядер в молекуле. Тем не менее они также способны подвергаться микробиологическому окислению. Алкилированные бензолы окисляются значительно интен-

сивнее, чем сам бензол. При этом алкилированные ароматические соединения в основном окисляются за счет боковых алкильных цепей [24, 26]. Следовательно, микроорганизмы наиболее быстро и эффективно развиваются на *n*-парафинах. Однако предельные углеводороды, особенно нормальные алканы с короткой углеродной цепью, составляющие основную часть легких фракций нефти (C_5-C_{11}), оказывают токсическое воздействие на почвенные микробные сообщества [26, 27]. Большинство микроорганизмов *n*-алканы с числом атомов углерода менее 9 не ассимилируются, хотя и могут быть окислены. Токсичность их снижается в смеси с *n*-алканами с числом атомов углерода выше 9 [26]. Летучесть этих соединений способствует испарению, вследствие чего их содержание в нефти резко снижается в первые недели, месяцы после загрязнения (на 40–50 %) [27]. Твердые высокомолекулярные парафины также плохо поддаются микробиологическому окислению [19, 28]. Они менее токсичны, чем более низкомолекулярные структуры, однако могут надолго “запечатать” все поры почвенного покрова, нарушив водно-воздушный режим почв, что приводит к полной деградации биоценоза [27].

Кроме того, обнаружена и более узкая специфичность субстрата: микроорганизмы могут расти на одном углеводороде и не развиваться на другом, близком к первому по строению, физическим и химическим свойствам [23]. В результате существует большое количество путей биodeградации различных фракций нефти [26].

Конечными продуктами биологического окисления нефтяных углеводородов являются вода и углекислый газ. Однако в почвах накапливаются и промежуточные продукты: спирты, органические кислоты, эфиры и другие соединения. В итоге окислительная биodeградация нефтезагрязнения сопровождается конденсацией органического вещества. Вследствие этого при аэробном разрушении нефтей независимо от их типа повышается их плотность, увеличивается содержание смолисто-асфальтеновых компонентов и уменьшается концентрация парафиновых углеводородов [23, 26].

Как видно, процессы биогенного окисления углеводородов очень сложны. На направление процесса биогенного окисления могут оказывать влияние многие факторы: температура, солнечное излучение, кислотность среды, окислительно-восстановительные условия, оригинальный состав почвенной микрофлоры и степень ее адаптивности к данным условиям, тип почв и др.

Цель данной работы – изучение влияния давности нефтяного загрязнения мерзлотных почв на эффективность процессов биоремедиации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты и методы исследования

В качестве объекта исследований послужила территория бывшего нефтепровода Талакан–Витим (юго-запад Якутии, Ленский район), на которой более 10 лет назад произошел аварийный разлив нефти. После аварии нефтепровод был демонтирован, таким образом появилась возможность изучать процессы трансформации нефти в мерзлотных почвах в отсутствие новых разливов. На территории были выделены участки, с которых ежегодно отбирались почвенные пробы. На части из них проводились работы по биоремедиации. На других (контрольных) участках процессы трансформации нефтезагрязнения шли только естественным путем. Поскольку почвы в своем составе обычно содержат природное органическое вещество, для объективной оценки уровня нефтезагрязнения и изучения процессов его трансформации было изучено углеводородное состояние почв, не подвергшихся нефтезагрязнению, характеризующее природный геохимический фон. Для исследований по влиянию давности нефтезагрязнения на результативность проводимых биоремедиационных мероприятий были выбраны два экспериментальных участка. На одном из них (свежий разлив, участок № 1) работы по очистке были проведены в тот же год после разлива, на другом (старый разлив, участок № 2) – через 7 лет после аварии. В ландшафте исследуемой территории оба участка занимают автономные позиции. Почвы характеризуются холодным профилем и в течение 7–8 месяцев в году имеют отрицательную температуру. Почвенно-растительный слой на глубине 0–10 (15) см представляет суглинок оторфованный, увлажненный, темно-серого (ближе к черному) цвета с корнями растительности.

В ходе эксперимента оба участка были обработаны биопрепаратом. В его состав входили накопительные культуры аборигенных УОМ, предварительно выделенные из почв данной территории [29]. Концентрация микробных клеток в жидкой форме биопрепарата составляла не менее $(1-9) \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Во всех случаях биопрепарат вносили в одинаковых количествах – 1.5 л на 1 м² загрязненной территории.

Пробы почв на участках отбирали с глубины 0–10 см перед внесением биопрепарата и через год после очистки согласно методическим рекомендациям [30, 31]. Для сравнения также были отобраны пробы почв на соседних загрязненных (контрольных) участках, отдаленных от экспериментальных на расстояние от 10 метров и более для исключения диффузного распространения микроорганизмов. На этих участках восстановительные мероприятия не проводились. Пробы сушили, отделяли от корней растений, растирали и исследовали с использованием комплекса геохимических методов анализа. Для определения уровня нефтезагрязнения использовали метод холодной хлороформенной экстракции. Выделенный хлороформенный экстракт (ХЭ) далее использовали для изучения деградации нефтезагрязнения в процессах биоремедиации.

Структурно-групповой состав ХЭ исследовали методом ИК-Фурье спектроскопии на спектрометре Protege 460 FT-IR (Nicolet, США). Групповой компонентный состав ХЭ определяли методом колоночной жидкостно-адсорбционной хроматографии [32]. Исследования методом хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) углеводородных фракций ХЭ [33] выполняли на системе, включающей газовый хроматограф Agilent 6890 (Agilent Technologies, США) с интерфейсом и высокоэффективным масс-селективным детектором Agilent 5973N. Идентификацию индивидуальных углеводородов осуществляли компьютерным поиском в библиотеке NIST-05 Национального института стандартов и технологии США. Более подробно методики описаны в работе [34].

Все аналитические исследования проводили в трех повторностях. Полученные результаты представлены в виде средней арифметической величины и ее стандартной ошибки ($M \pm SEM$). Сравнение средних значений выборок проводили методом однофакторного дисперсного анализа (ANOVA). Значимость отличий от контроля определяли, используя критерий Даннета для множественных сравнений при $p < 0.05$. Расчет проводился с помощью программы статистического анализа StatPlus 2007 (AnalystSoft Inc.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты экспериментов по биоремедиации нефтезагрязненных участков приведены в табл. 1. Как видно, уровень нефтезагрязнения до начала биоремедиации на обоих участках

ТАБЛИЦА 1

Результаты экспериментов по биологической очистке нефтезагрязненных почв с разной давностью загрязнения (длительность очистки – 1 год)

Параметр	Участок № 1		Участок № 2	
	Свежее загрязнение (в год аварии)		Старое загрязнение (через 7 лет после аварии)	
	до очистки	после очистки	до очистки	после очистки
Уровень нефтезагрязнения, г/кг	155.8±7.8	35.2±1.8	183.4±9.2	120.6±6.0
Степень деструкции, %	–	77.4±3.9	–	34.3±1.7
Групповой состав ХЭ, %:				
Углеводороды	80.2±8.0	51.6±5.2	59.0±5.9	44.2±4.4
Смолы:	18.8±1.9	46.7±4.7	38.6±3.9	51.2±5.1
Бензолные	3.7±0.4	10.1±1.0	10.2±1.0	18.7±1.9
Спирто-бензолные	15.1±1.5	36.6±3.7	28.4±2.8	32.5±3.3
Асфальтены	1.0±0.1	1.7±0.2	2.4±0.2	4.8±0.5
Состав предельных углеводородов:				
Максимум <i>n</i> -алканов	<i>n</i> -C ₁₅ , <i>n</i> -C ₁₇	<i>n</i> -C ₁₄ , <i>n</i> -C ₁₅	<i>n</i> -C ₂₅	–
Σ <i>n</i> -алканов, %	44.7±6.7	35.0±5.3	32.6±4.9	–
Σ12- и 13-метилалканов, %	16.1±2.4	8.8±1.3	2.9±0.3	–
Σизопреноидов, %	15.2±2.3	31.1±4.7	32.4±4.9	–
Изопреноиды/ <i>n</i> -алканы	0.3±0.1	0.9±0.1	1.0±0.2	–
Pr/ <i>n</i> -C ₁₇	0.6±0.1	3.0±0.4	3.5±0.5	–
Ph/ <i>n</i> -C ₁₈	1.3±0.2	6.0±0.9	6.2±0.9	–
Σ(Pr + Ph)/Σ(<i>n</i> -C ₁₇ + <i>n</i> -C ₁₈)	0.9±0.1	4.2±0.6	4.9±0.7	–

Примечания. 1. ХЭ – хлороформенный экстракт проб почв; Pr – пристан; Ph – фитан. 2. Прочерк – не обнаружены.

характеризовался как очень высокий согласно классификации Гольдберга [35]: участок № 1 – 155.8 г/кг, участок № 2 – 183.4 г/кг. Для сравнения выход ХЭ для проб почв с фоновых участков составлял 0.1–0.8 г/кг. Экспериментальные участки различались по времени, прошедшему после разлива нефти. Участок № 1 характеризовал свежее загрязнение, а на участке № 2 прошло 7 лет после разлива нефти, что отразилось на составе выделенных из проб почв экстрактов.

На рис. 1 представлены ИК-спектры выделенных ХЭ. Согласно полученным данным, в химической структуре экстракта исходной пробы с участка № 1 со свежим загрязнением преобладают углеводородные соединения (см. рис. 1, а), на что указывают полосы поглощения (п. п.) метильных и метиленовых групп (1460, 1380, 720 см^{–1}), ароматических циклов (750, 810 и 1600 см^{–1}) при незначительном вкладе п. п. карбонильных групп (1700 см^{–1}). Таким образом, характер этого ИК-спектра близок к нефтяному. На участке № 2 за 7 лет после аварии успели пройти процессы естественной дегградации нефтезагрязнения под влиянием собственной почвенной микрофлоры и физико-химических факторов среды. В отличие от участка № 1 в

спектре экстракта с участка № 2 (см. рис. 1, в) присутствуют п. п. кислородсодержащих групп – гидроксильных (3300 см^{–1}), эфирных (1170 см^{–1}), и интенсивные п. п. карбонильных групп (1700 см^{–1}). На рис. 2 представлены относительные коэффициенты поглощения указанных кислородсодержащих групп (D'_i), которые рассчитывали по формуле:

$$D'_i = D_i / D_{1460}$$

где D_i – оптические плотности п. п. кислородсодержащих групп; D_{1460} – оптические плотности п. п. метиленовых групп.

Видно, что в исходной пробе с участка № 2 с давним загрязнением произошли изменения, характерные для нефтезагрязнения, частично подвергшегося окислительной дегградации. Об этом же свидетельствует и групповой состав ХЭ (см. табл. 1). Если содержание углеводородной фракции в составе ХЭ почвенной пробы с участка № 1 составляет 80.2 %, то на участке № 2 вследствие протекания процессов естественной окислительной деструкции на долю углеводородов приходится уже всего лишь 59.0 %. Однако этот показатель далек от такового для чистых почв, в составе ХЭ которых содержание углеводородов колеблется в пределах 7.5–18.6 %.

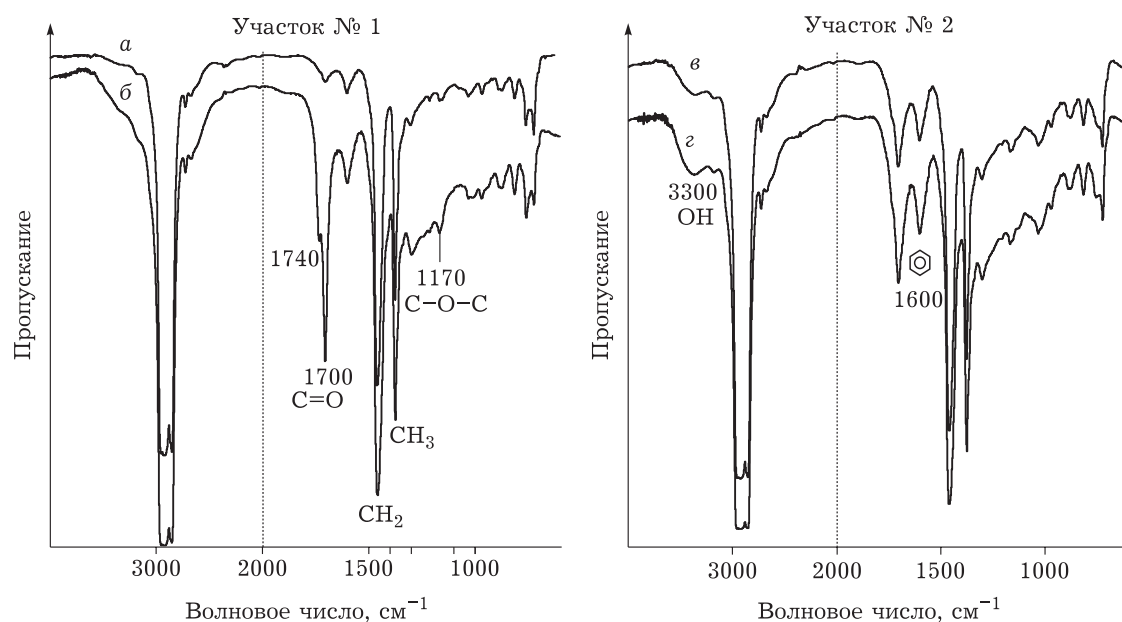


Рис. 1. ИК-спектры хлороформенных экстрактов, выделенных из проб почв, отобранных: на участке № 1 – до биологической очистки (а) и через год после очистки (б); на участке № 2 – до биологической очистки (в) и через год после очистки (г).

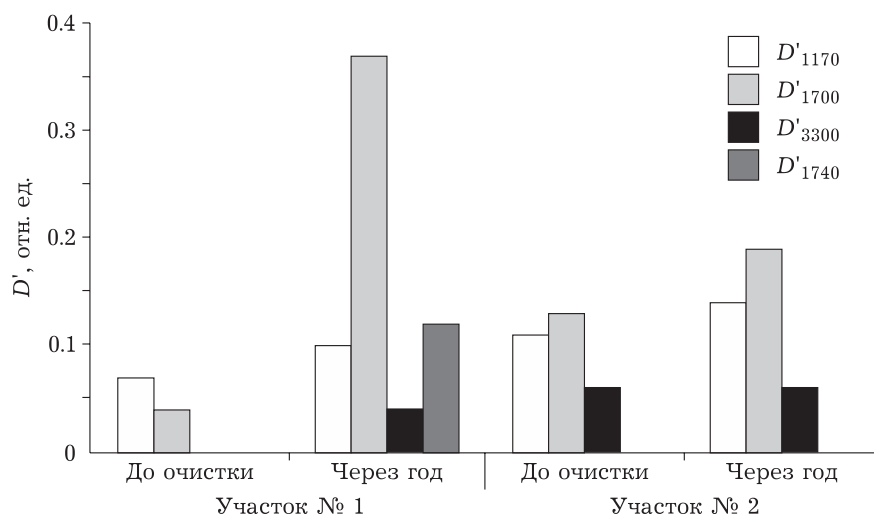


Рис. 2. Относительные коэффициенты поглощения кислородсодержащих групп (D') в ИК-спектрах хлороформенного экстракта, выделенного из проб почв с разных участков: D'_{1170} – эфирных групп и связей C–O–C; D'_{1700} и D'_{1740} – карбонильных групп C=O; D'_{3300} – гидроксильных групп OH.

Для понимания процессов деградации нефтезагрязнения большую информацию дает распределение индивидуальных насыщенных углеводородов, представленное на рис. 3. Учитывая низкий выход ХЭ фоновых проб почв и невысокую долю содержащихся в них углеводородов, можно полагать, что природное органическое вещество не оказало существенного влияния на картину распределения углеводородов загрязнителей. По данным ГХ-МС анализа (см. табл. 1 и

рис. 3, а), в исходном загрязнении участка № 1 в составе насыщенных углеводородов преобладают относительно низкомолекулярные *n*-алканы с максимумом распределения на $n\text{-C}_{15,17}$. В составе предельных углеводородов также присутствуют структуры ряда 12- и 13-метилалканов. Такое распределение насыщенных углеводородов характерно для состава талканской нефти [36], которая и явилась источником загрязнения почв исследуемой территории.

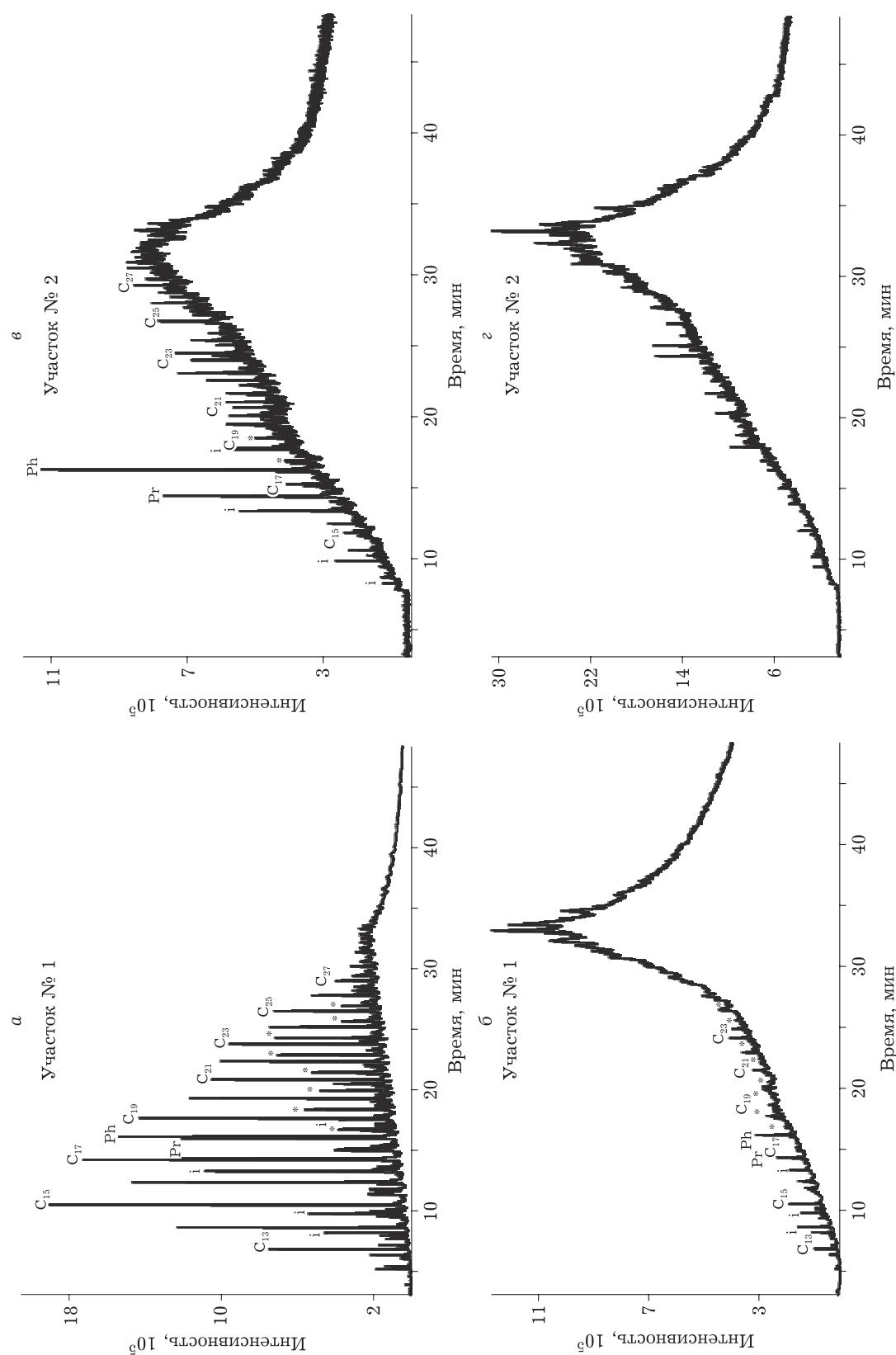


Рис. 3. Масс-хроматограммы углеводородов в хлороформных экстрактах проб почв, отобранных: на участке № 1 – до биологической очистки (а) и через год после очистки (б); на участке № 2 – до биологической очистки (в) и через год после очистки (г). Усл. обозн.: C₁₃-C₂₇ – n-алканы; Ph – пристан; Pr – фитан; * – 12- и 13-метилалканы; i – изопреноиды.

А на участке № 2 за 7 лет произошли изменения, характерные для процессов естественной биodeградации (см. табл. 1 и рис. 3, в). В значительной мере уменьшилось содержание *n*-алканов и практически исчезли 12- и 13-метилалканы. Индивидуальные насыщенные ациклические углеводороды в основном представлены изопреноидами (пристаном и фитаном), которые с трудом подвергаются процессам биodeградации. Масс-хроматограмма характеризуется наличием “горба”, который обусловлен содержанием в составе углеводородной фракции высокомолекулярных неразделенных метано-нафтовых и нафто-ароматических структур, которые, вероятно, являются продуктами трансформации более простых алкановых углеводородов [13]. Таким образом, старое загрязнение в отличие от свежего уже частично биodeградировало.

Рассмотрим, какие изменения произошли в составе нефтезагрязнения в ходе проведения годичных восстановительных мероприятий. На участке № 1 степень деструкции нефтезагрязнения составила 77.4 %, в то время как на участке № 2 – только 34.3 % (см. табл. 1). Для сравнения в те же годы на соседних участках без внесения биопрепарата этот показатель составил лишь 21.1 и 13.7 % соответственно. Таким образом, на обоих участках под влиянием биопрепарата протекали процессы биodeградации, только с разной интенсивностью. Биodeградация в обоих случаях сопровождалась окислительной деструкцией нефтезагрязнения. Об этом свидетельствуют изменения, произошедшие в структурно-групповом составе ХЭ. Так, в ИК-спектре экстракта пробы с участка № 1 через год после очистки (см. рис. 1, б и 2) вдвое увеличилась интенсивность п. п., соответствующих эфирным связям (D'_{1170}); практически на порядок возросла интенсивность п. п. карбонильных групп (D'_{1700}); появилась п. п. при 3300 см^{-1} , характерная для гидроксильных групп, и обозначился дополнительный максимум для карбонильных групп при 1740 см^{-1} , присутствующий обычно в ИК-спектрах экстрактов чистых почвенных проб. В пробе с участка № 2 после очистки также произошли изменения в структурно-групповом составе ХЭ, только менее выраженные, чем на участке № 1 (см. рис. 1, г и 2). В групповом составе исходной пробы с участка № 1 содержание углеводородных компонентов уменьшилось на 36 %, а на участке № 2 – только на 25 %. По мере биodeградации нефтезагрязнения в составе ХЭ почв обоих участков возросла доля фракций смолисто-асфальтеновых веществ (см. табл. 1). Как видно из приведенных данных,

групповой состав ХЭ исходного загрязнения почв участка № 2 до биологической очистки только через 7 лет после разлива приблизился к составу загрязнения участка № 1 после очистки с участием биопрепарата.

Интенсивность протекающих процессов биodeградации часто оценивают по коэффициенту биodeградации (K_i), равному отношению суммы изопреноидов пристана и фитана к сумме *n*-алканов C_{17} и C_{18} : $K_i = \Sigma(\text{Pr} + \text{Ph})/\Sigma(n\text{-}C_{17} + n\text{-}C_{18})$. После очистки на участке № 1 в составе насыщенных углеводородов в 2.5 раза увеличилось соотношение изопреноиды/*n*-алканы, коэффициент биodeградации K_i составил 4.2 (см. табл. 1). Уменьшилось содержание 12- и 13-метилалканов. На масс-хроматограмме появился высокий “горб” (см. рис. 3, б), свидетельствующий об образовании высокомолекулярных метано-нафтовых и нафто-ароматических промежуточных продуктов трансформации углеводородов. Таким образом, все изменения в составе загрязнения на участке № 1 свидетельствуют об активном протекании процессов биodeградации.

Как было указано выше, старое загрязнение за 7 лет в значительной степени подверглось процессам деградации в естественных условиях, что подтверждает характер распределения индивидуальных ациклических алканов в масс-хроматограммах пробы с участка № 2 (см. рис. 3, в). После очистки в составе углеводородной фракции уже не удалось идентифицировать предельные углеводороды. Масс-хроматограмма этого образца также характеризуется присутствием высокого “нафтового горба” (см. рис. 3, г). Однако процессы биodeградации на этом участке протекали не столь интенсивно, как на первом. Коэффициент деструкции нефтезагрязнения оказался в 2.3 раза ниже в сравнении с участком № 1, при этом уровень загрязнения все еще оставался очень высоким – 120.6 г/кг (см. табл. 1).

Многие исследователи отмечают, что старое нефтезагрязнение с трудом поддается процессам микробиологической очистки [36–38]. Предполагается, что отсутствие легкодоступных для микроорганизмов парафиновых углеводородов не стимулирует накопление аборигенных УОМ. Однако, как видно из результатов эксперимента, и внесение биопрепарата не способно в полной мере активизировать процессы биodeградации. Механизмы биodeградации, направленность процесса деструкции индивидуальных углеводородов и их смесей, обладающих различной степенью устойчивости к окислению, зависят главным образом от физиологических особенностей

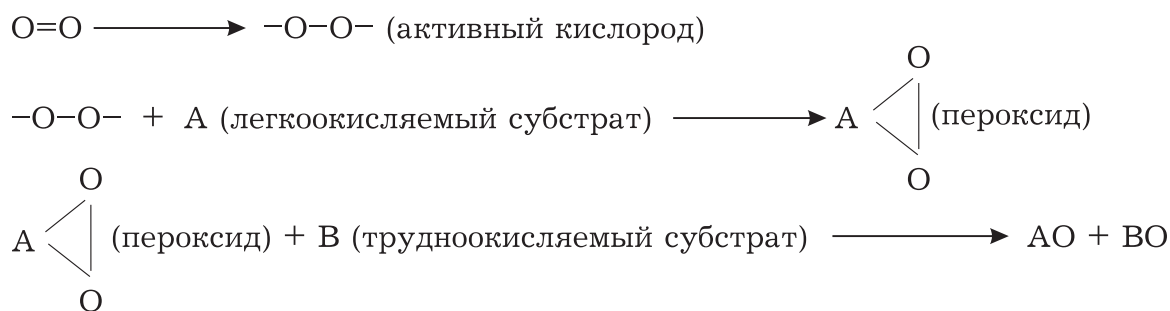


Рис. 4. Схема микробиологического окисления при участии углеводородокисляющих микроорганизмов.

каждого рода микроорганизмов, их ферментативной активности [16, 23]. Тем не менее, вероятно, существуют некие общие закономерности, связанные с механизмом микробиологического окисления углеводородов. В основе современных представлений о механизме микробиологического окисления углеводородов лежат перекисная теория Баха–Энглера и концепция о цепном характере окислительных процессов, разработанная Н. Н. Семеновым [26, 39]. Согласно перекисной теории Баха–Энглера, первичная реакция кислорода с легкоокисляемыми органическими соединениями приводит к накоплению пероксидов, которые играют роль активного кислорода и способны окислять уже более устойчивые химические молекулы [26, 39]. Таким образом, существует фаза инициирования окислительных реакций, роль которой выполняет первичная реакция кислорода с легкоокисляемыми соединениями по схеме, представленной на рис. 4.

Большое число исследований посвящено изучению механизмов инициирования окислительных процессов, которые сложны и многообразны [23, 39]. Значительно меньше известно о дальнейших стадиях окисления, конечными продуктами которых являются вода и углекислый газ. В природе процесс микробиологического окисления часто заканчивается образованием промежуточных продуктов [23]. Важно отметить тот факт, что начальная стадия микробиологического окисления нефтезагрязнения протекает по цепному свободно-радикальному механизму с автоускорением и для ее инициирования необходимы легкоокисляемые субстраты, которыми, по-видимому, и являются алкановые углеводороды. Как видно из рис. 3, а, в, за 7 лет после аварии в естественных условиях без проведения очистительных мероприятий в первую очередь деградировали *n*-алканы (от $n\text{-C}_{12}$ до $n\text{-C}_{24}$), а также 12,13-метилалканы. По-видимому, эти углеводороды и служат для микроорга-

низмов наиболее легкоокисляемыми субстратами. В составе углеводородной фракции остались практически одни изопреноиды. Как уже упоминалось выше, есть предположение, что разветвленные молекулы, к которым относятся изопреноиды, труднодоступны биохимическому окислению из-за конформационных затруднений [24]. Следует отметить, что микроорганизмы обладают свойством избирательного отношения к различным углеводородам, различающимся не только по структуре, но и даже по количеству атомов, входящих в эти структуры [23]. Так, максимум содержания *n*-алканов, приходящийся на $n\text{-C}_{15}$ в первый год после аварии, сместился на $n\text{-C}_{25}$ через 7 лет (см. рис. 3, а, в). По-видимому, *n*-алканы с длиной цепи C_{25} и выше труднее поддаются процессам микробиологического окисления. Вследствие этого они входят в состав углеводородных фракций нативного органического вещества почв и донных осадков. Это объясняет и тот факт, что загрязнения почв смазочными маслами, характеризующимися высокомолекулярным составом, трудно поддаются микробиологической очистке.

Известно, что микробиологическое окисление нефти в почвах сопровождается ароматизацией углеводородов [28]. Об этом свидетельствует и характер масс-хроматограмм углеводородов, подвергшихся биodeградации (см. рис. 3, б–г), – появление “нафтенного горба”, обусловленного неразделенными высокомолекулярными структурами метано-нафтенного и нафтенно-ароматического характера. Можно предположить, что эти накопившиеся за 7 лет промежуточные продукты частичного окисления нефтезагрязнения являются ингибиторами цепных процессов за счет образования долгоживущих радикалов. Высокомолекулярные полициклические соединения способны к делокализации неспаренного электрона. При этом для сложных структур возможно стерическое экранирование радикального центра объемистыми заместителями, пре-

пятствующими реакциям радикалов между собой, с кислородом воздуха или другими субстратами [40]. Вероятно, вследствие этого они и накапливаются в почвах, постепенно переходя в смолисто-асфальтеновые компоненты. Новообразование смол в процессах окислительной биодегградации нефти и нефтепродуктов отмечено многими исследователями [19, 27]. Это ведет к гидрофобизации почв и нарушению их водно-воздушного режима, что также тормозит процесс окисления.

Таким образом, в естественных условиях (в описываемом эксперименте – за 7 лет после аварии) постепенно деградировали практически все легкоокисляемые углеводороды. В отсутствии этих соединений реакции окисления инициируются значительно труднее, и интродукция биопрепарата в нефтезагрязненную почву на участке № 2 уже не дала столь значимого эффекта. Следовательно, восстановление нефтезагрязненных почв способом биоремедиации наиболее эффективно в случае свежих разливов нефти, пока в составе нефтепродуктов еще присутствуют легкоокисляемые микроорганизмами углеводороды, первыми вступающими в реакции биоокисления, и не накопились ингибиторы этого процесса, а новообразование смол не привело к высокой гидрофобизации почв.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведены эксперименты в естественных условиях на территории бывшего нефтепровода Талакан–Витим (юго-запад Якутии) по изучению влияния давности загрязнения на эффективность процессов биоремедиации нефтезагрязнения в мерзлотных почвах. В экспериментальные участки вносился биопрепарат на основе накопительных культур аборигенных УОМ, предварительно выделенных из почв данной территории. Результаты исследований показали, что степень деструкции свежего загрязнения составила 77.4 %, в то время как через 7 лет после аварии – только 34.3 % от уровня загрязнения, который к тому времени оставался в почве. В отсутствие восстановительных мероприятий эти значения оказались намного ниже – 21.1 и 13.7 % соответственно. Снижение эффективности процессов биоремедиации с давностью нефтезагрязнения впервые объяснено с позиций цепного свободно-радикального механизма микробиологического окисления углеводородов. Инициаторами процесса окисления являются активные формы кислорода, образующие

пероксиды с легкоокисляемыми углеводородными субстратами, которые в свою очередь вовлекают в процесс окисления трудноокисляемые субстраты. Как показали 7-летние наблюдения, такими легкоокисляемыми субстратами служат *n*-алканы (от $n\text{-C}_{12}$ до $n\text{-C}_{24}$), а также 12,13-метилалканы. В случае давних загрязнений легкоокисляемые субстраты к моменту очистки практически полностью деградировали, и в дальнейшем интродукция УОМ уже не позволила достигнуть высокой эффективности в процессах биоремедиации. Кроме того, накопившиеся в ходе деградации высокомолекулярные нафтенароматические структуры вследствие устойчивости их радикалов могли служить ингибиторами цепных процессов окисления. Отмеченное новообразование смолисто-асфальтеновых компонентов ведет к гидрофобизации почв и нарушению водно-воздушного режима почв, что также могло тормозить процессы окисления углеводородов. Таким образом, биологические способы очистки (например, биоремедиация) наиболее эффективны в случае свежих загрязнений. Восстановительные мероприятия с использованием этих методов необходимо начинать как можно быстрее после аварийных разливов нефти и нефтепродуктов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Тумановский А. А., Квашнин А. В., Смирнов А. С. Проблемы аварийных разливов нефти и нефтепродуктов, способы их ликвидации и оценка их опасности при проведении экспертиз // Безопасность жизнедеятельности. 2018. № 1 (205). С. 11–18.
2. Петрова Е. Г. Опасность и риск чрезвычайных ситуаций с аварийными разливами нефти // Экол. системы и приборы. 2022. № 6. С. 14–18.
3. Ossai I. C., Ahmed A., Hassan A., Hamid F. S. Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: a review // Environ. Technol. Innovation. 2020. Vol. 17. Art. 100526.
4. Sui X., Wang X., Li Y., Ji H. Remediation of petroleum-contaminated soils with microbial and microbial combined methods: advances, mechanisms and challenges // Sustainability. 2021. Vol. 13, No. 16. Art. 9267.
5. Владимиров В. А. Разливы нефти: причины, масштабы, последствия // Стратегия гражд. защиты: проблемы и исслед. 2014. Т. 4, № 1 (6). С. 217–229.
6. Андреева Л. В., Нисковская Е. В. О проблемах экологической безопасности недропользования на территории России // Соврем. тенденции развития науки и технологий. 2017. № 2–2. С. 10–14.
7. Michel J., Fingas M. Oil spills: causes, consequences, prevention, and countermeasures // Fossil Fuels: Current Status and Future Directions / G. M. Crawley (Ed.). Singapore: World Sci. Publ., 2016. P. 159–201.
8. Оборин А. А., Хмурчик В. Т., Иларионов С. А., Маркарова М. Ю., Назаров А. В. Нефтезагрязненные биоценозы: процессы образования, научные основы восстановления, медико-экологические проблемы. Пермь, 2008. 505 с.

9. Технологии восстановления почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами: справочник. М.: Изд-во РЭФИА и НИА-Природа, 2003. 258 с.
10. Баландина А. В., Еремченко О. З. Микробная ремедиация нефтезагрязненных агродерново-карбонатных почв и техногенных поверхностных образований в подзоне южной тайги. Пермь: Perm University Press, 2016. 99 с.
11. Camenzuli D., Freidman B. L. *On-site and in situ* remediation technologies applicable to petroleum hydrocarbon contaminated sites in the Antarctic and Arctic // *Polar Res.* 2015. Vol. 34. Art. 24492.
12. Капелькина Л. П. Нарушенные земли Севера и проблемы рекультивации // *Арктика: экология и экономика.* 2011. № 3 (3). С. 60–67.
13. Lifshits S., Glyaznetsova Yu., Erofeevskaya L., Chalaya O., Zueva I. Effect of oil pollution on the ecological condition of soils and bottom sediments of the Arctic region (Yakutia) // *Environ. Pollut.* 2021. Vol. 288. Art. 117680.
14. Chong C. W., Silvaraj S., Supramaniam Y., Snape I., Tan I. K. P. Effect of temperature on bacterial community in petroleum hydrocarbon-contaminated and uncontaminated Antarctic soil // *Polar Biol.* 2018. Vol. 41. P. 1763–1775.
15. Bodor A., Bounedjoum N., Vincze G. E., Kis A. E., Laczi K., Bende G., Szilágyi A., Kovács T., Perei K., Rákhely G. Challenges of unculturable bacteria: environmental perspectives // *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* 2020. Vol. 19, No. 1. P. 1–22.
16. Fouad F. A., Youssef D. G., Shahat F. M., Abd El-Ghany M. N. Role of microorganisms in biodegradation of pollutants // *Handbook of Biodegradable Materials* / G. A. M. Ali, A. S. H. Makhlof (Eds.). Cham: Springer, 2023. P. 221–260.
17. Zhou H., Jiang L., Li K., Chen C., Lin X., Zhang C., Xie Q. Enhanced bioremediation of diesel oil-contaminated seawater by a biochar-immobilized biosurfactant-producing bacteria *Vibrio* sp. LQ2 isolated from cold seep sediment // *Sci. Total Environ.* 2021. Vol. 793. Art. 148529.
18. Greer C. W., Juck D. F. Bioremediation of petroleum hydrocarbon spills in cold terrestrial environments // *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology* / R. Margesin (Ed.). Cham: Springer, 2017. P. 645–660.
19. Солнцева Н. П. Добыча нефти и геохимия природных ландшафтов. М.: Изд-во Московского ун-та, 1998. 369 с.
20. Wu M., Dick W. A., Li W., Wang X., Yang Q., Wang T., Xu L., Zhang M., Chen L. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2016. Vol. 107. P. 158–164.
21. Shen T., Pi Y., Bao M., Xu N., Lia Y., Lu J. Biodegradation of different petroleum hydrocarbons by free and immobilized microbial consortia // *Environ. Sci. Processes Impacts.* 2015. Vol. 17, No. 12. P. 2022–2033.
22. Abbasian F., Lockington R., Mallavarapu M., Naidu R. A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2015. Vol. 176, No. 3. P. 670–699.
23. Тимергазина И. Ф., Переходова Л. С. К проблеме биологического окисления нефти и нефтепродуктов углеводородоокисляющими микроорганизмами // *Нефтегазовая геология. Теория и практика.* 2012. Т. 7, № 1. Ст. 15.
24. Брянская А. В., Уварова Ю. Е., Слынько Н. М., Демидов Е. А., Розанов А. С., Пельтек С. Е. Теоретические и практические аспекты проблемы биологического окисления углеводородов микроорганизмами // *Вавиловский журн. генетики и селекции.* 2014. Т. 18, № 4–2. С. 999–1012.
25. Jovančević B., Antić M., Pavlović I., Vrvic M., Beškoski V., Kronimus A., Schwarzbauer J. Transformation of petroleum saturated hydrocarbons during soil bioremediation experiments // *Water Air Soil Pollut.* 2008. Vol. 190, No. 1–4. P. 299–307.
26. Жуков Д. В., Мурыгина В. П., Калужный С. В. Механизм деградации углеводородов нефти микроорганизмами // *Успехи соврем. биологии.* 2006. Т. 126, № 3. С. 285–296.
27. Пиковский Ю. И. Природные и техногенные потоки углеводородов в окружающей среде. М.: Изд-во МГУ, 1993. 207 с.
28. Бабаев Э. Р., Мамедова П. Ш., Адыгезалова В. А., Эйвазова И. М., Полетаева О. Ю. Трансформация углеводородов тяжелой балаханской нефти в процессе ее биологической деградации в почве // *Химия твердого топлива.* 2019. № 2. С. 30–36.
29. Ерофеевская Л. А., Глязнецова Ю. С., Зуева И. Н., Чалая О. Н., Лифшиц С. Х. Биоремедиация нефтезагрязненных почв в климатических условиях Крайнего Севера. Новосибирск: СО РАН, 2022. 131 с.
30. ГОСТ 17.4.4.02-2017. Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. М.: Стандартинформ, 2018. 14 с.
31. ГОСТ 17.4.3.01-2017. Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб. М.: Стандартинформ, 2018. 8 с.
32. Методика измерений № 222.0119/01.00258/2014. Определение группового состава хлороформенных битумоидов пород, почв и отбензиненных нефтей гравиметрическим методом. 2014. 15 с.
33. Методика измерений № 222.0118/01.00258/2014. Определение состава углеводородных фракций пород, почв и отбензиненных нефтей методом хромато-масс-спектрометрии. 2014. 10 с.
34. Глязнецова Ю. С., Зуева И. Н., Чалая О. Н., Лифшиц С. Х. Нефтезагрязнение почвогрунтов и донных отложений на территории Якутии: состав, распространение, трансформация. Якутск: Ахсаан, 2010. 158 с.
35. Гольдберг В. М., Зверев В. П., Арбузов А. И., Казанов С. М. Техногенное загрязнение природных вод углеводородами и его экологические последствия. М.: Наука, 2001. 125 с.
36. Глязнецова Ю. С. Особенности трансформации старого нефтяного загрязнения в почвах Арктической зоны Якутии // *Теорет. и приклад. экология.* 2021. № 2. С. 89–94.
37. Ильинский А. В., Виноградов Д. В. Особенности биологической очистки от застарелых нефтяных загрязнений почвогрунтов промышленного предприятия // *Вестн. Рязанского гос. агротехнол. ун-та им. П. А. Костычева.* 2017. № 1 (33). С. 5–11.
38. Назаров А. В., Ананьина Л. Н., Ястребова О. В., Плотникова Е. Г. Влияние нефтяного загрязнения на бактерии дерново-подзолистой почвы // *Почвоведение.* 2010. № 12. С. 1489–1493.
39. Красновский А. А. мл. Первичные механизмы фотоактивации молекулярного кислорода. История развития и современное состояние исследований: обзор // *Биохимия.* 2007. Т. 72, № 10. С. 1311–1331.
40. Реутов О. А., Курц А. Л., Бутин К. П. Органическая химия: учебник. Ч. 4. 5-е изд. М.: БИНОМ. Лаб. знаний, 2013. 726 с.

Поступила в редакцию 14.05.2024

Одобрена после рецензирования 19.06.2024

Принята к публикации 12.07.2024