



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
ГИДРОМЕТЕОРОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра прикладной и системной экологии

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**  
(бакалаврская работа)

На тему Использование биологического метода для снижения загрязненности нефтепродуктами территорий Апшеронского полуострова (Азербайджан)

Исполнитель Замяткина Елизавета Юрьевна  
(фамилия, имя, отчество)

Руководитель доктор химических наук, профессор  
(ученая степень, ученое звание)

Мансуров Марат Маруфович  
(фамилия, имя, отчество)

«К защите допускаю»  
Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_

(подпись)

\_\_\_\_\_ кандидат географических наук, доцент  
(ученая степень, ученое звание)

\_\_\_\_\_ Алексей Денис Константинович  
(фамилия, имя, отчество)

«06 06» 2022 г.

Санкт-Петербург,  
2022

## Оглавление

Введение .....	3
Глава 1 Литературный обзор .....	5
1.1 Загрязнение почвы отходами нефти и нефтепродуктами .....	5
1.1.1 Влияние загрязнения на свойства почв .....	9
1.1.2 Самоочищение почвы .....	11
1.2 Способы очистки нефтезагрязненной почвы.....	13
1.2.1 Использование микроорганизмов для восстановления нефтезагрязненных почв .....	16
Глава 2 Экологическая обстановка апшеронского полуострова .....	22
2.1 Краткая характеристика Апшеронского региона .....	22
2.2 Техногенное загрязнение почв Апшеронского полуострова .....	24
Глава 3 Объекты исследования и методика проведения экспериментов .....	26
3.1 Объекты исследования.....	26
3.2 Результаты и обсуждения .....	29
Заключение .....	40
Список использованной литературы.....	42

## Введение

Нефтяное загрязнение является одной из самых серьезных и крупных глобальных экологических проблем из-за своей специфики. Интоксикация почвы нефтепродуктами приводит к изменению практически всех свойств: физических, биохимических и микробиологических, нарушает структуру почвенного покрова, вызывает практически полную депрессию функциональной активности растений и почвенных организмов, даже в относительно небольших дозах.

Апшеронский полуостров является территорией с особыми природными условиями и уникальным типом хозяйственного освоения. Необходимо его индивидуальное рассмотрение с экологической точки зрения.

Процессы саморегуляции в загрязненных нефтью почвах этого региона уже продолжительное время не обеспечивают естественное восстановление этих экосистем. Поэтому обязательно следует изучить потенциальные способы рекультивации нефтезагрязненных почв. В данной работе акцент будет сделан на исследовании возможности использования биологического метода рекультивации.

Объектами исследований служили образцы нефтезагрязненных почв, взятых на территории Апшеронского полуострова (Азербайджан). Мезофильные бактерии были выбраны в качестве объекта изучения в связи с продолжительным изучением данных бактерий на базе лабораторий Агрофизического Института и высоким потенциалом их использования. Тематика актуальна на сегодняшний день.

Цель работы: Изучить возможность применения биологического метода очистки нефтезагрязненных почв территорий Апшеронского полуострова (Азербайджан) для снижения загрязненности нефтепродуктами.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Изучить и провести литературный анализ данных по вопросам влияния загрязнения нефтью и нефтепродуктами на почвы;

2. Провести анализ экологической обстановки Апшеронского полуострова;
3. Изучить биологические методы восстановления нефтезагрязненных почв, в частности метод биоремедиации с применением нефтеокисляющей микрофлоры;
4. Получить накопительные культуры мезофильных микроорганизмов-нефтедеструкторов из почвы, находящейся в зоне добычи нефти на территории Апшеронского полуострова, для потенциального получения биопрепаратов, способных разрушать нефтепродукты;
5. Провести микроэксперимент, подкрепленный расчетами – насколько эти микроорганизмы работают в присутствии искомым почв.

Автор выражает благодарность сотрудникам лаборатории сектора Экологической микробиологии отдела Светофизиологии растений и биопродуктивности агроэкосистем ФГБНУ АФИ, в особенности Александру Сергеевичу Галушко за руководство в проведении экспериментов, обсуждение полученных результатов, за его помощь во всех аспектах нашего исследования и, конечно, за помощь в написании и оформлении выпускной работы. Его советы принесли неоценимый вклад.

## Глава 1 Литературный обзор

### 1.1 Загрязнение почвы отходами нефти и нефтепродуктами

К настоящему времени значительная интенсификация добычи, транспортировки, переработки и использования нефти и нефтепродуктов привела к тому, что процесс загрязнения земель углеводородами принимает большие масштабы. Нефть и нефтепродукты являются одними из самых распространённых и опасных техногенных загрязнителей окружающей среды, их выделяют как приоритетные [11]. К основным источникам нефтепродуктов относят смазочные масла и моторные топлива, используемые для работы транспортных средств и механизмов, технологические выбросы промышленных предприятий, включающие предприятия по добыче, переработке и синтезированию углеводородов. Также, не стоит забывать о добыче и перевозке сырья, которые охватывают значительные пространства, что неизбежно влечет к сбросам в окружающую среду [15].

Нефтяное загрязнение выделяют в отдельный вид из-за того, что нефть имеет очень сложный состав (сотни различных соединений углеводородов), а также из-за ее одномоментного поступления в среду [10].

Загрязнение почв при повреждении нефтепроводов и при авариях на нефтехранилищах, нефтеперегонных заводах и предприятиях нефтехимии приобрело довольно значительные масштабы, а также на них могут происходить пожары и диверсии [19]. В России ежегодно потери нефти составляют около 3 млн. т или 1,2% от ее добычи [5].

В результате этого окружающая среда загрязняется нефтепродуктами, страдает животный мир, а попадание нефти в питьевую воду угрожает здоровью населения [24]. Схема путей поступления нефти и нефтепродуктов в окружающую среду представлена на рисунке 1.1.



Рисунок 1.1 – Пути поступления нефти и нефтепродуктов в окружающую среду [24]

К тому же, нефтяные загрязнения, происходящие в случае аварий, по последствиям можно сопоставить с теми, которые наблюдаются во время обычной производственной деятельности. Многие ошибочно полагают, что аварии с выливом нефти являются основной причиной нефтяного загрязнения, но из данных научных исследований сообщается об обратном. Можно привести такой пример – более 85% таких загрязнений поступает в мировые воды в процессе безаварийного функционирования производства [6].

Самым опасным исходом при авариях, связанных с разливом нефти и нефтепродуктов, можно назвать токсическое загрязнение компонентов окружающей среды, к которым относятся вода, почва и атмосферный воздух (рисунок 1.2). Скопление нефти в понижениях рельефа может привести к возгоранию и задымлению из-за выделения горючих газов. Может произойти взрыв и пожар, а также возникнуть угроза населению и их имуществу [24].



Рисунок 1.2 – Схема причинно-следственных закономерностей развития аварий [24]

### Состав нефти

Выяснение генезиса нефти и газа имеет большое теоретическое и практическое значение. Изучение происхождения нефти и газа начали еще до того, как возникла нефтяная промышленность.

Основные химические элементы, из которых состоит нефть – это углерод и водород. Содержание углерода в нефти (С) – 82-87% и водорода (Н) – 11-14%. Во всех нефтях наряду с углеводородами имеется значительное количество соединений, включающих такие гетероатомы, как сера, азот и кислород, содержание которых зависит от возраста и происхождения нефти. Содержание серы может составлять от 0,2 до 7,0%, кислорода в нефти содержится от 0,05 до 3,6%, а содержание азота не превышает 1,7% в небольших количествах встречаются фосфор, ванадий, никель, железо, алюминий и др. [24].

Групповой углеводородный состав разных видов нефти варьируется в широких пределах. Выделяют нефти нескольких видов: парафиновые, парафино-нафтеновые, нафтеновые, парафинонафтено-ароматические, нафтено-ароматические, ароматические.

Внешний вид нефти: маслянистая густая жидкость различной степени прозрачности и разного цвета зеленоватого или коричневого оттенка. Реже встречается желтая или даже бесцветная. В нефти выявлено более 450 индивидуальных соединений, а число углеродных атомов в углеводородах нефти может колебаться от  $C_4$  до  $C_{60}$  [10].

Все нефти можно разделить на две группы. Нефти категории А отличаются тем, что на их хроматограммах проявляются пики нормальных и изопреноидных алканов. На хроматограммах нефти категории Б, этих пиков нет. К нефти типа А1 относятся нефти с относительно низкой смолистостью, в которых регистрируют высокое содержание бензиновых фракций. В нефти типа А2 изопреноидные алканы (1-6%) преобладают над нормальными (0,5-5%). В нефти типа Б циклоалканы содержатся в количестве от 60-75%. У нефти типа Б2 нафтеновый и парафино-нафтеновый состав, она выделяется высоким содержанием циклоалканов – 60 – 75%. Вот чем отличаются нефти типа Б1 – они содержат мало легких фракций и в них полностью отсутствуют нормальные и изопреноидные алканы [10].

Физические свойства нефти в первую очередь зависят от её плотности. Единицы измерения в системе СИ –  $кг/м^3$ . Изменяется плотность в пределах от 0,70 до 1,04  $г/см^3$ . Обычно плотность нефти меньше 1 и колеблется в пределах 0,82 – 0,92  $г/см^3$ . По плотности нефти классифицируются: на лёгкие (до 0,81  $г/см^3$ ); средние (0,81 – 0,87  $г/см^3$ ); тяжёлые (0,87 – 0,90  $г/см^3$ ); очень тяжёлые (0,90 – 1,04  $г/см^3$ ). Вязкость нефти – свойство жидкости оказывать сопротивление перемещению её частиц при движении. Вязкость нефти меняется в широких пределах в основном от 0,1 до 2000  $мПа·с$ . Параметр вязкости имеет большое значение для установления характера и масштабов миграции, а также при разработке залежи и добычи нефти [8].

### 1.1.1 Влияние загрязнения на свойства почв

Экологический ущерб от загрязнения почв нефтепродуктами весьма значителен – начиная снижением продуктивности и качества почв заканчивая выводом земель из сельскохозяйственного оборота. Сами углеводороды мало токсичны, но высокое их содержание резко ухудшает водно-физические свойства почв, что в конечном итоге причиняет ущерб сельскому и лесному хозяйству [18].

Для подземных и поверхностных вод создается такая опасность, как попадание нефтепродуктов в водоносные горизонты, реки и водоемы. Загрязнение почвы углеводородами оказывает большое влияние на все основные характеристики почвы: химические, агрохимические, физические и микробиологические свойства. При загрязнении природной среды нефтью происходят резкие ответные реакции во всех компонентах экосистем, включая почву. Самая опасная из них – может произойти существенная перестройка всего почвенного профиля. К примеру, нефть гидрофобизирует частицы почвы, снижается содержание элементов минерального питания, возрастает влажность нижележащих горизонтов. После того, как нефть попадает в почву, происходит агрегирование частиц, нарушаются ее пористость и плотность, что шаг за шагом приводит к изменению аэрации, температурного и водного режимов почвы. Культивирование растений на почвах, которые загрязнены полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ) наносит вред животным, а также здоровью человека. ПАУ – это вещества с резко выраженными канцерогенными и мутагенными свойствами.

Углеводороды нефти по токсическому действию на почвенную микрофлору составляют следующий ряд: ароматические > нафтены (циклоалканы) > парафины > сырая нефть. Наиболее токсичными компонентами для почвенной микрофлоры являются полициклические ароматические углеводороды [15].

Действие нефти на живые организмы почвы во многом определяется её концентрацией (таблица 1.1).

Таблица 1.1 – Воздействие нефтепродуктов на живые организмы почвы [15]

Концентрация нефти	Оказываемый эффект
0,7-50 мл/кг	Возникают первые нарушения в микробном сообществе
50-300 мл/кг	Происходит резкое снижение видового разнообразия и смена состава микробного сообщества
> 300 мл/кг	Наблюдается полное подавление роста и развития микроорганизмов в загрязненной почве

Еще нужно принимать во внимание, что попавшие в почву углеводороды нефти и нефтепродукты замедляют жизненную активность актиномицетов, азотфиксирующих, олигонитрофильных, нитрифицирующих, целлюлозоразрушающих бактерий, диатомовых и желто-зеленых водорослей, угнетают их; резко уменьшается содержание азота и фосфора и пропадают нитраты. Все перечисленное оставляет отпечаток на питательной ценности почв. Из-за загрязнения нарушается равновесие процессов, связанных с круговоротом азота в почве [15]. Усиливается активность денитрификаторов. В почве, в значительной степени, подавляется активность многих почвенных ферментов, отвечающих за круговорот органического вещества [22] Массированное нефтяное загрязнение почвы, происходящее при аварийных разливах, сопровождается острым токсическим действием на живые организмы. Важную роль в процессах самоочищения почв от нефти играют микроорганизмы. Когда происходит запахивание загрязненных участков вглубь почвы нефть не разлагается или разлагается крайне медленно, из-за анаэробных условий [15].

### 1.1.2 Самоочищение почвы

При таких условиях, когда практически во всех отношениях подавляется функциональная активность почвенной флоры и фауны, можно сказать, что определяющая роль в деградации нефтепродуктов принадлежит микроорганизмам. В почве разложение углеводов главным образом обеспечивается работой углеводородокисляющих микроорганизмов. В процессе своей жизнедеятельности эти организмы минерализуют нефть и нефтепродукты до углекислоты и воды, а также могут превращать в соединения, которые способны утилизироваться другими группами почвенных микроорганизмов.

Развитие углеводородокисляющих почвенных микроорганизмов может быть чрезвычайно интенсивным. Основная масса исследований указывает на то, что ответом микроорганизмов на нефтяное загрязнение являются повышение их количества и усиление активности. Было выявлено, что происходит увеличение числа микроорганизмов узкой специальности: твердых и жидких парафинов, окисляющих газообразные углеводороды, ароматических углеводородов [12].

Также известно, что меняется численность и некоторых других почвенных микроорганизмов: целлюлозоразрушающих микроорганизмов, грибов актиномицетов, нитрифицирующих бактерий. Углеводородокисляющие бактерии и грибы широко распространены и присутствуют в различных типах почв и природных условий. Эти факторы и влияют на их численность и видовой состав[11]. На сегодняшний день было определено, что эти микроорганизмы расселяются повсеместно, и в особенности их много там, где в почве локализованы газообразные или жидкие углеводороды [4].

Современные исследования утверждают, что загрязнение нефтью и нефтепродуктами подавляет активность почвенной микрофлоры. Страдает видовое разнообразие микроорганизмов вследствие того, что отбираются лишь немногочисленные виды, обладающие повышенной метаболической активностью.

При нефтяном загрязнении почвы, во время разложения углеводов возникают такие условия, которые лимитируют рост и развитие микроорганизмов нефтедеструкторов. Но не все почвенные бактерии могут разлагать нефть и нефтепродукты. Часть организмов способна окислять их до промежуточных продуктов, которые могут использоваться другими видами как источник питания [4].

Если рассматривать комплекс почвенных микроорганизмов как биологическую систему, то можно прийти к выводу, что он динамичен. Состав и структура биоценозов изменяются непрерывно в ходе сложного процесса биологического разложения углеводов, протекающего очень длительное время, а не только в случаях загрязнения. Можно сделать вывод, что биологическое разрушение углеводов определяет и направленность сукцессий микроорганизмов [4].

Сообщается, что на скорость самоочищения почвы от углеводов влияют такие факторы как исходная концентрация и тип почвы, а также почвенно-климатические условия. Особо высокая скорость снижения концентрации заметна в первые месяцы после загрязнения. Дело в том, что первоначально испаряются легкие фракции, а затем наблюдаются физический вынос с водными потоками и фотохимическое окисление углеводов нефти.

Но по прошествии времени скорость самоочищения заметно снижается и зависит в большей степени от активности почвенной микробиоты. Можно привести такой пример, степень самоочищения от легких нефтепродуктов при исходной концентрации 5 г/кг за 1,5 месяца составляет до 80% [17].

При загрязнении почвы нефтью в количестве 10-40 л/м<sup>2</sup> убыль за 1 год составила 40-51%, за 2 года – 56-61%. Ученые с помощью метода экстраполяции прогнозируют самоочищение от нефти и нефтепродуктов слоя почвы 0-60 см до концентрации 500 мг/кг, к сроку через 6 лет после слабого загрязнения, через 11 лет после среднего и через 16 лет после сильного загрязнения [21].

Исходя из этого, основой механизма разрушения нефти и нефтепродуктов в почве являются физические, химические и биологические процессы.

Интенсивность этих процессов меняется в зависимости от времени, прошедшего с момента загрязнения. Одной из главных особенностей процесса разрушения можно назвать разную скорость преобразования отдельных компонентов нефти. Соединения, которые являются результатом химических преобразований углеводородов различных классов становятся частью биогеоценотического круговорота, а также могут основывать органоминеральные комплексы [16].

## 1.2 Способы очистки нефтезагрязненной почвы

Рекультивация нефтезагрязненных земель представляет собой сложный комплекс инженерных мероприятий по технической подготовке земель с учетом мер по сохранению биоразнообразия. Работы по рекультивации для лесохозяйственных, сельскохозяйственных и других целей обычно имеют два основных этапа – технический и биологический, которые осуществляются с учетом существующих наилучших доступных технологий.

Технический этап предполагает ограничение распространения загрязнения нефтью и нефтепродуктами в результате разлива за пределы его образования и использование нефтесборочных средств, таких как машины и механизмы. Его основная цель максимально снизить риски загрязнений за пределами места разлива нефти [1].

Биологический этап рекультивации нефтезагрязненных земель можно описать как комплекс агротехнических, биотехнологических и фитомелиоративных мероприятий по восстановлению их хозяйственной и экологической ценности. В частности, к ним относят:

1. Внесение органических и минеральных удобрений;
2. Внесение биопрепаратов нефтеокисляющего действия;
3. Посев трав и высадка древесных растений.

Эти мероприятия направлены на улучшение агрофизических, агрохимических, биохимических и других свойств почвы, формирование

условий для постепенного и окончательного восстановления почвенного покрова. После их проведения ожидается, что видовое разнообразие флоры и фауны также восстановится [1].

С целью восстановления загрязненных почв создаются эффективные технологии их очистки.

Технологии очистки классифицируют по двум категориям *ex situ* и *in situ*. Технологии *ex situ* применяют для обработки загрязненной почвы, удаленной с верхнего слоя загрязненной территории. Но всегда нужно учитывать, что экскавация земель может привести к деформации морфологической структуры обрабатываемого участка и серьезным нарушениям течения поверхностных и подземных вод. И все же, изоляция и обработка почв за пределами участка дают возможность использовать более сложные приемы обработки. Такой способ может быть более результативным и быстродействующими, а также более безопасными для грунтовых вод, местных жителей, животных и растений [13].

Технологии *in situ* обладают преимуществами перед технологиями *ex situ* в силу непосредственного использования их на месте разлива. Это намного уменьшает риск негативного влияния загрязняющих веществ на человека и окружающую среду в процессе извлечения, транспортировки и восстановления загрязненных участков почв, что в то же время ведет к экономии средств. Но эта технология очистки имеет большой недостаток. Проблема в гетерогенной природе субстрата на участках, где необходимо восстановление, как с геологической точки зрения, так и с точки зрения проникновения загрязнения. Выбор и применение технологий *in situ* могут быть сделаны только после долгого исследования свойств обрабатываемой поверхности. Вдобавок к этому, может потребоваться специализированная очистка загрязненной области. При неблагоприятных окружающих условиях есть большая вероятность возникновения сложной ситуации с устойчивыми загрязняющими веществами [14].

Современные технологии очистки земель условно разделяют на механические, физико-химические и биологические. Основные из них описаны в таблицах 1.2 и 1.3.

Таблица 1.2 – Основные методы очистки почв от нефтяных загрязнений [23]

Методы	Способы ликвидации	Особенности применения
Механические	Обвалка загрязнения, откачка нефти в ёмкости	Это первичные мероприятия при разливе с использованием техники и резервуаров (однако просачивание нефтепродуктов в почву не прекращается – проблема не решается)
	Замена почвы	Вывоз почвы на полигоны для естественного разложения
Физико-химические	Сжигание	Является экстренной мерой при опасности прорыва нефти в водные источники. В зависимости от типа нефти уничтожается от 50 до 70% разлива, оставшаяся часть проникает в почву. Из-за того, что температура недостаточно высокая в атмосферу попадают токсичные продукты сгорания; после сжигания необходимо вывозить почву на специальные полигоны для промышленных отходов
	Предотвращение возгорания	Проводят при разливе легковоспламеняющихся продуктов в жилых кварталах, на автомагистралях, цехах, где возгорание опаснее загрязнения земли; изоляцию разлива сверху проводят с помощью противопожарной пены или засыпки сорбентами
	Промывка почвы	Происходит в промывных барабанах с применением ПАВ; использованные воды отстаиваются в гидроизолированных емкостях или прудах, где в дальнейшем проводится их разделение и очистка
	Дренирование почвы	Является разновидностью промывки почвы на месте с помощью дренажных систем (может использоваться в кооперации с нефте-разлагающими микроорганизмами)
	Экстракция растворителями	Проводится в промывных барабанах летучими растворителями, а затем происходит отгонка их остатков паром
	Сорбция	Разливы на твердой поверхности, например, на такой как асфальт, утрамбованный грунт или бетон, засыпается специальными сорбентами для поглощения нефтепродуктов, а также для снижения пожароопасности при разливе легковоспламеняющихся продуктов
	Термическая десорбция	Проводится нечасто – если есть соответствующее оборудование, позволяет получать полезные продукты вплоть до мазутных фракций

Таблица 1.3 – Продолжение таблицы 2 [23]

Биологические	Биоремедиация	Способы:
		<p>1) биостимуляция – биологическая обработка почвы, заключающаяся в обеспечении оптимальных условий для развития собственной почвенной микрофлоры, то есть это содействие бактериям в почве;</p> <p>2) биологическая обработка загрязненной почвы в биореакторе, в котором за счет перемешивания обеспечивается контакт микроорганизмов с нефтью и нефтепродуктами, и создаются условия для осуществления процесса очистки;</p> <p>3) биоаугментация – биологическая обработка <i>in situ</i>, базирующаяся на внесении в почву микроорганизмов – деструкторов загрязнения.</p> <p>4) фиторемедиация – ликвидация остатков нефти с помощью высевы трав, устойчивых к загрязнению нефтью, таких как щавель, осока, клевер ползучий и другие, которые активизируют почвенную микрофлору (этот способ является окончательной стадией рекультивации)</p>

### 1.2.1 Использование микроорганизмов для восстановления нефтезагрязненных почв

В настоящее время все предпочтительнее становятся биологические методы очистки от нефтяных загрязнений. Они мобилизуют естественные природные деструкторы нефти, что дает возможность не нагружать поврежденные почвы [4].

Механические и физико-химические методы более трудозатратны и поэтому существенно более дорогие по сравнению с биоремедиацией. Данную технологию можно считать экологически безопасной вследствие того, что разложение углеводородов с использованием бактерий стимулирует естественные природные процессы. Помимо этого, лишь биоремедиация способна к обеспечению полного удаления нефтяных загрязнителей из почвы и водоемов [2].

Биоремедиация проводится, преимущественно, посредством двух основных подходов. Первый – это внесение в почву удобрений и добавок, благодаря которым развитие аборигенной почвенной микрофлоры происходит гораздо интенсивнее, тем самым ускоряется разложение нефти. Для успешной работы микроорганизмов-нефтедеструкторов в почву вносят: фосфор, азот, магний, калий и микроэлементы.

Данные микроорганизмы способны поддерживать жизнедеятельность и в пресной, и в соленой воде, но нужно заметить, что при солености 10-20% интенсивность разложения понижается. Еще одним важным, можно сказать, определяющим фактором является температура, ведь при прочих идентичных условиях, она определяет интенсивность разложения углеводородов микроорганизмами. Диапазон значений pH, при котором нефтеокисляющие микроорганизмы способны функционировать довольно широкий – 3,5-11. Также необходимы определенная влажность и наличие достаточного количества кислорода. Без всего перечисленного микроорганизмы не способны развиваться и поддерживать жизнедеятельность. Поддержание почвы во влажном состоянии это один из основных агротехнических приемов для управления её биологической активностью и оказывает эффективное воздействие на темпы разложения углеводородов. Благодаря улучшению водного режима улучшаются и агротехнические свойства почв, в том числе, это положительно отражается на микробиологической деятельности и активности биопроцессов и на подвижности питательных веществ [7].

Второй подход состоит в том, что в почву вносятся бактериальные препараты. Их основные составляющие это один или несколько активных штаммов-деструкторов, способных разрушать нефть и нефтепродукты. При этом подходе, проводится добавление культур микроорганизмов-нефтедеструкторов к естественной ассоциации микроорганизмов. В качестве активных штаммов-деструкторов нефти и нефтепродуктов для создания на их основе биопрепаратов использовали микробы, выделенные из вероятных ареалов их распространения – загрязненных нефтепродуктами почв, отобранных из различных климатических

районов. Из выделенных микроорганизмов выбирались, обладающие наибольшей активностью. Ученые использовали их как основу для разработки бактериального препарата [7].

С недавнего времени гораздо чаще применяют биопрепараты, которые состоят из двух и более штаммов бактерий, так как монокультура не способна в полной мере решить такую проблему, как очистка территории от нефти, состоящей из множества компонентов.

Чтобы провести эффективную ремедиацию техногенно загрязненных нефтью почв считается наиболее перспективным выделение чистых культур из представителей аборигенной микрофлоры, применение консорциума нескольких штаммов бактерий, создание технологий с целью поддержания их активности на загрязненных территориях [3].

Препарат также включает необходимые питательные вещества, стимуляторы ферментативной деятельности входящих в его состав штаммов микроорганизмов и сорбент, обладающий высокой сорбционной емкостью [6].

Изучение углеводородокисляющих бактерий, комбинаций штаммов, их жизнеспособности и способов введения в загрязненную природную среду способно вывести на новый уровень борьбу с нефтяными загрязнениями. После обработки нефтезагрязнений данным способом в почве остаются только легко разлагающийся бактериальный белок, который не требуется утилизировать, а также нетоксичные продукты разложения нефти. Эти продукты жизнедеятельности бактерий и сами отмирающие бактерии легко усваиваются аборигенной микрофлорой, и в дальнейшем дают основу для формирования гумуса (в случае применения препарата для очистки почвы) или образуя донный ил (при использовании на воде).

Самыми значимыми характеристиками препаратов-деструкторов нефти и нефтепродуктов считаются условия, в которых они наиболее результативны: диапазон разрушаемых загрязняющих веществ (легкие и тяжелые ароматические углеводороды, смолы, легкие и твердые алканы, асфальтены и другие), оптимальная и критическая температура их использования. Эффективность

очистки определяется такими факторами, как концентрация и вид нефтепродукта, а также гранулометрический состав почвы [20].

Бактерии, разрушающие нефть, по температурному фактору, что означает по температуре среды обитания, разделяют на физиологические группы: термофильные, мезофильные и психрофильные, так как именно температура является одним из основных факторов, оказывающих большое влияние на их жизнедеятельность, а также популяционную динамику.

Все без исключения физико-химические процессы, обеспечивающие активность функций клетки, и, помимо прочего, состояние ее молекул, в той или иной степени находятся в зависимости от температуры. При повышении температуры скорость химических реакций возрастает, вследствие этого, скорость роста микроорганизма тоже растет. Но при высоких температурах белки, нуклеиновые кислоты и другие клеточные биополимеры могут необратимо разрушиться. Это приведет к гибели клетки. Очень низкая температура также неблагоприятна для нее. Процессы биологического синтеза нарушаются, следовательно рост клетки останавливается. Каждому микроорганизму присущи минимальная температура, ниже нее роста не происходит; оптимальная температура, при ней она развивается с наибольшей скоростью, и максимальная температура, выше которой роста нет (рисунок 1.3) [20].

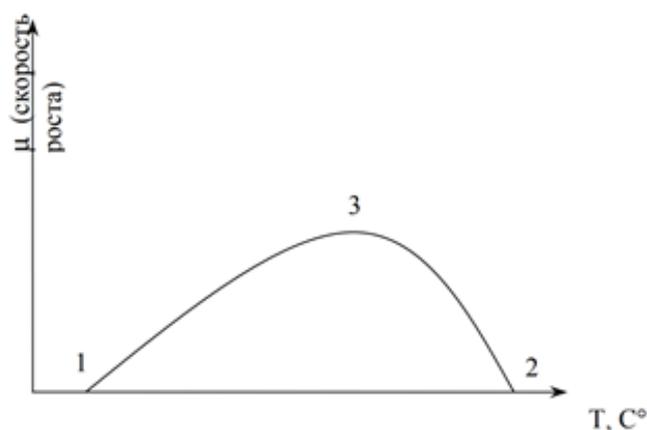


Рисунок 1.3 – Зависимость роста микроорганизмов от температуры.

Кардинальные точки: 1 – минимум; 2 – максимум; 3 – оптимум [19]

Эти температурные точки называются кардинальными. Они характерны для каждого вида. Рост бактерий в большинстве случаев происходит в интервале температур порядка 40°C, однако иногда эти рамки значительно уже. Температурные интервалы, в которых возможен рост микроорганизмов, весьма широки – от отрицательных до значений выше 100 °С.

Данные исследований указывают на то, что оптимум зависимости от температуры находится ближе к максимуму. По отношению к температуре бактерии разделяют на три основные группы: психрофилы, которые способны относительно быстро развиваться при температуре 0 °С; термофилы, развивающиеся при температуре выше 45 – 50 °С, и мезофилы, растущие в диапазоне умеренных температур [20].

Один из ключевых факторов, определяющих минимальную температуру роста бактерий, – это инактивация транспортных механизмов. Психрофилы могут осуществлять активный транспорт необходимых веществ к клетке при низкой температуре. У мезофилов при таких же температурах транспортные системы за очень короткий срок выходят из строя.

У мезофилов температурный оптимум находится в пределах 30-40°C. Он очень близок к температуре тела теплокровных животных, но многие микроорганизмы гораздо лучше растут при температуре 20-25°C. Для свободноживущих мезофилов максимальная температура около 45 – 50 °С, она близка к максимальному нагреву почвы солнцем. Минимальная температура – 10 °С. К мезофилам относятся цианобактерии. Их считают наиболее многочисленной группой бактерий. Типичный мезофил *E. coli*: нижняя граница роста – 10°C, верхняя – 49°C, оптимальная температура 37°C (при росте на богатой среде). Термофилы – это организмы, растущие при температуре выше 50°C, и сейчас их принято делить на несколько групп [20].

Можно привести такой пример. Для того чтобы провести очистку северных территорий, где в основном добывается нефть в России, применение препаратов, у которых оптимальные рабочие температуры находятся в диапазоне более 10°C, оказывается неэффективным. Бактерии-

нефтедеструкторы, которые входят в состав известных биотехнологических препаратов, в условиях холодного климата Севера окисляют компоненты крайне медленно, а полная очистка территорий и водоемов может происходить очень длительное время – до 50 лет [3].

Из основ почвенной микробиологии известно, что почвы разных регионов содержат микроорганизмы, которые наиболее приспособлены (естественная селекция) к обитанию в данном регионе и данной экологической нише. Внесение неизвестных микроорганизмов, например, препараты иностранного производства, или микроорганизмов-нефтедеструкторов других регионов на рекультивируемые почвы вызывает непредсказуемый эффект. В целом допустимо, что эти микроорганизмы не заменят полностью микробиоту, свойственную для данной территории, хотя весьма вероятен и обратный результат. Учеными из России установлено, что для каждого региона нужна специально подобранная композиция микроорганизмов, способная сформировать основу биотехнологических препаратов с целью очистки почвы и водоемов от нефти и нефтепродуктов.

Вследствие всего этого можно сделать вывод, что целенаправленное создание препарата из аборигенной микробиоты для биологической очистки земель – актуальная задача, решение которой даст возможность значительно уменьшить последствия природных и техногенных аварий и осуществить более полную переработку и утилизацию образований и отходов нефтепроизводящей, нефтетранспортирующей и нефтеперерабатывающей промышленности [3].

## Глава 2 Экологическая обстановка Апшеронского полуострова

### 2.1 Краткая характеристика Апшеронского региона

Апшеронский полуостров расположен в Азербайджане, на западном берегу Каспийского моря (рисунок 2.1). Он представляет собой юго-восточное окончание Большого Кавказского хребта. Климат – умеренно-теплый полупустынный и сухостепной с сухим жарким летом. Среднегодовое количество осадков – 130-150 мм [13]. Среднегодовая температура воздуха 13-14°С [9].



Рисунок 2.1 – Местоположение Апшеронского полуострова

В этом регионе, который охватывает всего 6,6% территории страны, проживает свыше 60% ее населения и сосредоточено свыше 80% промышленного потенциала, отмечена тенденция роста антропогенного, а значит и техногенного воздействия. Число неблагоприятных природных

факторов, которые ограничивают самоочищение экосистем намного превышает число природных факторов, способствующих поддержанию стабильности окружающей среды. Нынешняя хозяйственная система расселения и размещения главным образом сложилась в течение XX века. Геополитическое положение и характер ресурсного потенциала остаются, как и в прошлом, главными факторами развития региона. Благодаря этому здесь самая высокая в Азербайджане плотность населения, и сформирована развитая промышленно-транспортная инфраструктура, даже несмотря на неблагоприятные условия среды (зона пустынь и полупустынь, дефицит собственных водных ресурсов и т.д.) и крайне ограниченные возможности для ведения сельского хозяйства. Специализация района преимущественно сосредоточена на нефти. Основные отрасли – добыча, первичная переработка и транспортировка сырой нефти, нефтяное машиностроение, рыбный промысел [13].

У аридных экосистем очень слабая способность к самовосстановлению, и даже при низком уровне антропогенного воздействия их природная устойчивость постепенно разрушается. Данные территории больше всего заселены и освоены людьми – а значит в наибольшей степени изменены человеком, и поэтому для них необходим эксплуатационно-защитный режим природопользования. Структура аридных экосистем в экологическом отношении довольно уязвима. Количество поступающей влаги здесь является лимитирующим экологическим фактором, и изменение водного режима, даже в малейшей степени, приводит к всевозможным изменениям ландшафтно-экологической обстановки. Данные изменения имеют как естественный, так и антропогенный характер. При естественном характере природная обстановка изменяется постепенно, при человеческом вмешательстве – радикальным образом.

Экологическая ситуация на полуострове имеет прямую связь с высокой концентрацией промышленного производства. Природные ресурсы Азербайджана в основном залегают на Апшеронском полуострове и на Каспийском шельфе, и в настоящее время интенсивно разрабатываются.

Скорость и масштабы этого процесса беспрецедентны. На сегодняшний день в стране разрабатываются 37 месторождений на суше и 17 – в азербайджанском секторе Каспийского моря. Из недр добыто более 1,4 млрд. т нефти и 430 млрд. м<sup>3</sup> газа. На долю региона приходится около 60% общей нефтедобычи на суше, практически вся нефтехимия, вся нефтепереработка, свыше 80% металлургической промышленности, больше 80% машиностроения и металлообработки, около 30% вырабатываемой электроэнергии, более 40% пищевой, 50% легкой, 70% производящих строительные материалы [13].

Зная показатели нагрузок от промышленности, ситуацию в Апшеронском промышленном регионе можно считать экологически остро стоящей. Социально-экологические показатели на Апшеронском полуострове свидетельствуют о неблагоприятной экологической обстановке. Можно увидеть достаточно сильное отклонение от нормы в структуре экосистем региона, низка репродуктивная способность территории, очень высок индекс антропогенной нагрузки [13].

## 2.2 Техногенное загрязнение почв Апшеронского полуострова

То, что в структуре экономики Апшерона преобладают нефтедобывающая, нефтеперерабатывающая, химическая, энергетическая, машиностроительная, металлургическая, агропромышленная отрасли сформировало в регионе внушительное количество природно-техногенных систем. Всё это изменило природные ландшафты в широких пределах. Эти системы вызывают изменение геохимических, гидрологических, геофизических параметров экосистем.

Очень большая часть полуострова загрязнена углеводородами, огромные площади заняты насыпями буровых шламов. Более 18 тыс. га земли загрязнены нефтью и её продуктами. Из-за отходов только лишь химической промышленности стали непригодными 1300 га. Так 7400 гектаров почв загрязнены нефтью, из них 2800 га нуждаются в первостепенной очистке.

Загрязнения проникают вглубь почвы на глубину 2-3 метров. После многолетнего загрязнения почвенного покрова токсичными углеводородами нефти при анализе экологических последствий можно свидетельствовать о «сверхнормативной нагрузке» на аридные системы. Процессы саморегуляции уже не способны обеспечивать самовосстановление разрушаемых экосистем. В конечном итоге баланс в этих экосистемах нарушился, так как усилилось воздействие на природную среду [13].

В долговременном плане наибольшую экологическую опасность несет наличие в составе нефтяных загрязнений полиароматических соединений. Полиароматические соединения с доказанным мутагенным действием накапливаются в нефтезагрязненных почвах, так как почва обладает способностью накапливать эти вещества, и локализуются в их микрочастицах в достаточных количествах, в результате чего можно ожидать появления мутагенной активности у самой почвы, как природного субстрата. Данные исследований указывают на то, что в нефтезагрязненных почвах Апшерона накапливаются полиароматические соединения, включающие: нафталин, фенантрен, дибензотиофен, флуорантен/пирен, бензоантрацен/бензопирен, и ПАУ, количество которых превышает ПДК в тысячи раз. Загрязнение почвенного покрова также сопровождается загрязнением как поверхностных, так и грунтовых вод.

Исходя из этого, процессы саморегуляции в загрязненных нефтепродуктами почвах и водоемах Апшеронского полуострова уже долгое время не могут обеспечить восстановление этих экосистем естественным путем в результате природных процессов [13].

Основная и первостепенная цель исследования экологической обстановки Азербайджана – это восстановление исходной продуктивности почв и ее рекреационных качеств для возвращения непригодных для использования почв в близкое к исходному состоянию. Анализ данных в этом направлении, прежде всего, проводится для восстановления плодородия почв страны, загрязненных углеводородами вследствие интенсивной хозяйственной деятельности [15].

## Глава 3 Объекты исследования и методика проведения экспериментов

### 3.1 Объекты исследования

Объектами исследования были выбраны образцы нефтезагрязненных почв и грунтов, взятых в местах нефтедобычи на территории Апшеронского полуострова (Азербайджан). Характеристика и координаты мест отбора представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Коды и координаты мест отбора проб почвогрунтов и их характеристика.

Место отбора	Номер	Координаты места отбора	pH	Содержание нефтепродуктов, г/кг	Характеристика образца
Апшеронский п-ов, Азербайджан (А)	А 2-1	40.440278, 50.160278	н/о	н/о	Почва, берег нефтезагрязненного озера
	А 2-1b	40.440278, 50.160278	н/о	38,3	Окисленный слой седимента нефтезагрязненного озера
	А 3-1	40.464722, 49.834444	н/о	51,3	Поверхность нефтезагрязненного озера, качалка Бинагады
	А 4-2	40.501944, 49.891111	н/о	н/о	«Горящая земля», почва на расстоянии 20 м
	А 6-1	39.999444, 49.398056	н/о	н/о	Седимент нефтезагрязненного озера
	А 7-1	39.999167, 49.398333	н/о	14,8	Поверхность нефтезагрязненного озера, качалка Лок Батан

\*Примечание: н/о – не определялось

Работы начались с ознакомления с оборудованием лаборатории.

Использовались такие приборы как:

- 1) Автоклав – ВК-75 использовался для стерилизации посуды, почвы и жидких сред;

- 2) Денситометр McFarland Biosan DEN-1В – предназначен для измерения мутности клеточных суспензий, принцип работы прибора основан на измерении оптической плотности;
- 3) рНметр – Мультитест ИПЛ 301 – для измерения водородного показателя;
- 4) Весы – CAS MV;
- 5) Центрифуга Sigma 1-13;
- 6) Вортекс – Vortex V-1 plus – применяется для перемешивания различных растворов и суспензий клеток в пробирках;
- 7) Газовый хроматограф «Кристалл- 2000М» (рисунок 3.1);
- 8) Микроскоп – Axiostar plus Zeiss (рисунок 3.1).



Рисунок 3.1 – Микроскоп Axiostar plus Zeiss и Газовый хроматограф «Кристалл- 2000М»

#### Принцип работы хроматографа

Газовый хроматограф – это прибор, который разделяет образец какого-либо вещества на компоненты. Внутри него находится колонка, заполненная специальным сорбентом. Сорбенты бывают разных типов, и, следовательно, могут задерживать различные вещества. В нашем случае использовался Сорбент Порапак Q, в нем находится стабильный полимер, который удерживает  $\text{CO}_2$ . Прибор продувается газом, а на выходе стоит анализатор/детектор. Первый шаг

– отбирается проба 0,5 мл и вводится в начало колонки, те вещества, которые колонка не задерживает идут стоком газа. Детектор анализирует и записывает пики сигнала. Кислород и азот выходят быстро, а  $\text{CO}_2$  задерживается и выходит чуть позже, и поэтому детектор рисует большой пик на графике – хроматограмме. Для каждого вещества для одной колонки время выхода стабильно. Компьютерная программа фиксирует сигнал и измеряет высоту пика. Чем больше вещества в пробе, тем выше пик. Но у детектора есть предел чувствительности. Примерное время выхода 1,5 минуты.

### Среда Ворошиловой-Диановой

В данном эксперименте использовалась жидкая минеральная питательная среда Ворошиловой-Диановой (сокращенно ВД) подходящая для роста мезофильных почвенных микроорганизмов.

Состав среды ВД:

$\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1 г/л,

$\text{NaCl}$  – 1 г/л,

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1 г/л,

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1 г/л,

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2 г/л,

$\text{CaCl}_2$  – 0,02 г/л.

В работе обязательно необходим раствор щелочи ( $\text{NaOH}$ ), для изменения рН, так как углеводороды сильно подкисляют среду. Путем добавления по каплям раствора щелочи рН среды необходимо довести до 7,0 – 7,2.

Среда стерилизовалась с помощью метода автоклавирования 30 минут при 0,5 атм.

### Фосфатный буфер (PBS)

Также использовался фосфатный буфер (PBS).

Состав среды:

$\text{NaCl}$  – 5 г/л,

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 3,5 г/л,

$\text{KH}_2\text{HPO}_4$  – 1,5 г/л.

Далее следует отобрать 100 мл буфера и добавить к нему  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (хлорид аммония) из расчета 0,25 г/л.

рН среды до 7,2-7,4.

### 3.2 Результаты и обсуждения

При проведении работ образцам почв для удобства дальнейшего подписывания были присвоены новые наименования. Они представлены в таблице (таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Названия образцов почв

Номер	Название
А 3-1	4
А 4-2	5
А 7-1	6
А 2-1b	7
А 2-1	8
А 6-1	9

Для работы были выбраны образцы под номерами 4, 5 и 6. Их высев проводили на модифицированную жидкую минеральную питательную среду Ворошиловой–Диановой. Это было необходимо для выявления присутствия мезофильных бактерий и получения накопительных культур в усредненных пробах. Накопительная культура создается для того, чтобы увеличить концентрацию целевых бактерий.

Навеску почвы массой 0,1 г помещали в пробирку с 5 мл среды ВД в двух повторностях. Нефть вносили непосредственно в пробирку (контрольные

пробирки без нефти). Работа велась в стерильных условиях в боксе. Шпатель, кончики пробирок и пипеток обжигались огнем спиртовки перед началом работы и после смены почв. Накопительные бактериальные культуры культивировали в термостате при постоянной температуре 28°C (рисунок 3.2).

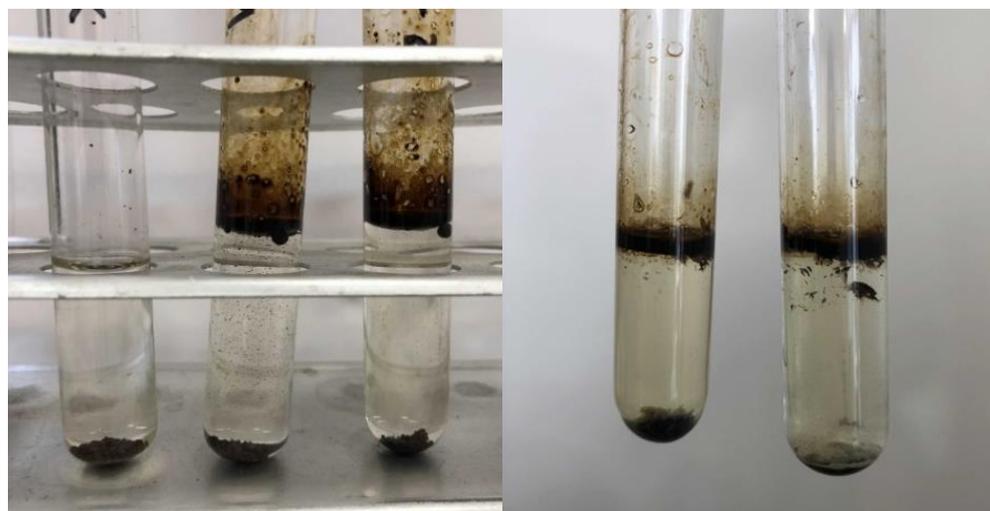


Рисунок 3.2 – Накопительные бактериальные культуры после культивирования в термостате

Чтобы определить динамику роста культур в жидкой среде, смотрели есть ли рост на границе нефть/среда – то есть проводили визуальное наблюдение, затем смотрели изменение оптической плотности среды (непосредственно в пробирке): 1) без встряхивания, 2) после встряхивания пробирок и 10-минутного отстаивания. Образцы под номерами 4 и 5, как видно из таблицы 3.3, показали неудовлетворительные результаты и в дальнейшей работе не исследовались. Были выбраны новые образцы (7, 8 и 9).

Таблица 3.3 – Оптическая плотность проб под номерами 4 и 5

Проба	17.фев	24.фев
4-1	0,15	0,18
4-2	0,41	0,2
5-1	0,08	0,17
5-2	0,3	0,42

Показавшие лучший результат накопительные культуры в количестве 0,5 мл пересевали в двух повторностях в пробирки с 5 мл жидкой средой ВД, с добавлением нефти и культивировали в термостате (рисунки 3.3 и 3.4). Пересев – это перенос части выращенной на питательной среде культуры микроорганизма на другую, свежую стерильную среду. Пересев проводился несколько раз. После каждого посева смотрели изменение оптической плотности среды и помещали в термостат. Результаты измерения представлены в таблице 3.4.



Рисунок 3.3 – Пересеянные накопительные культуры



Рисунок 3.4 – Процесс разложения бактериями нефтяной пленки

Таблица 3.4 – Измерения оптической плотности за весь период работы

Проба	17.фев	Проба	24.фев	Проба	03.мар	Проба	10.мар	24.мар	21.апр
6-1	0,6	6-2-1	0,63	6-2-1-1	0,33	6-2-1-2.1	0,57	0,27	0,62
6-2	0,93	6-2-2	0,51	6-2-1-2	0,41	6-2-1-2.2	0,55	0,22	-
		7-1	1,08	7-2-1	0,62	7-2-1.1	0,61	0,54	0,73
		7-2	0,56	7-2-2	0,54	7-2-1.2	0,37	0,48	-
		8-1	0,97	8-1-1	0,76	8-1-1.1	0,31	0,09	-
		8-2	0,74	8-1-2	0,44	8-1-1.2	0,45	0,23	0,34
		9-1	0,47	9-2-1	0,35	9-2-2.1	0,68	0,3	0,67
		9-2	0,3	9-2-2	1,15	9-2-2.2	0,42	0,08	-
						9-2-2.1(1)	-	-	0,86

После проведенных пересевов, были выбраны четыре накопительные культуры, которые были рассмотрены под микроскопом (6-2-1-2.1; 7-2-1.1; 8-1-1.2; 9-2-2.1). Для этого их поместили в пробирки Эппендорфа и несколько раз центрифугировали и встряхивали на вортексе, тем самым бактерии стало возможно с помощью стерильной остуженной петли штрихом перенести на предметное стекло. При микроскопировании получились следующие результаты – самые подвижные и упитанные бактерии в пробирке из точки под номером 7-2-1.1 (можно заметить изогнутые), самые маленькие из точки под номером 9-2-2.1. Они представлены на рисунках 3.5 и 3.6.

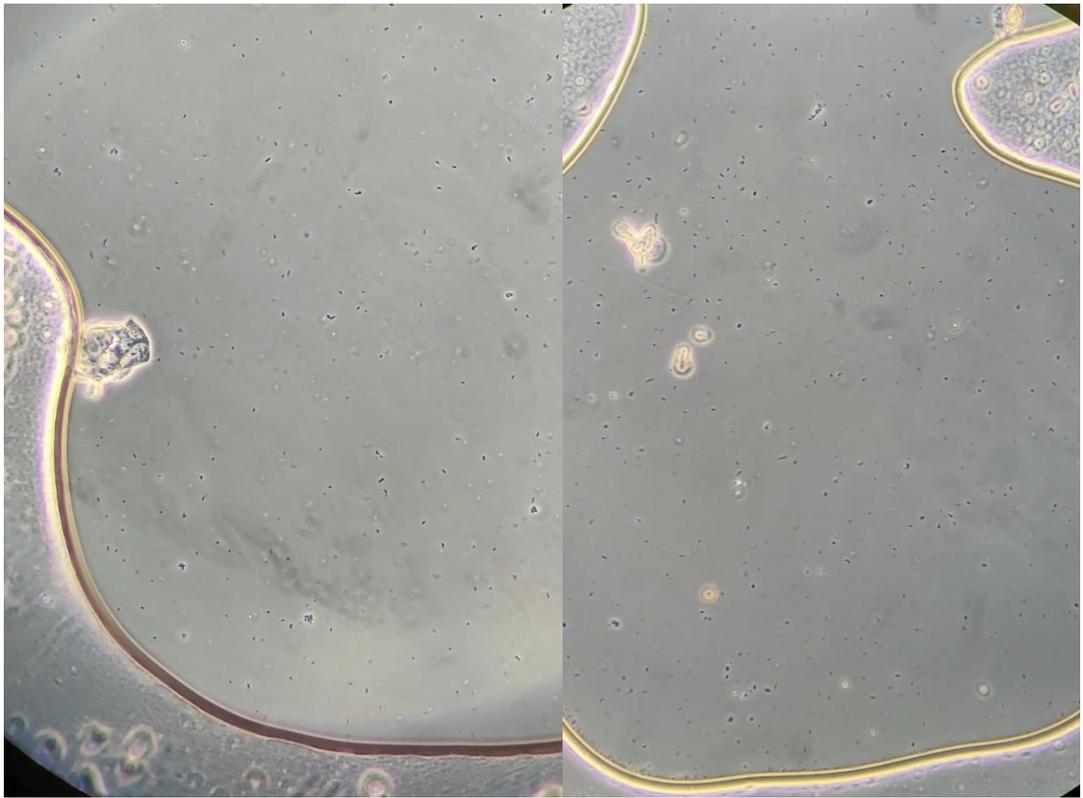


Рисунок 3.5 – Микрофотография клеток из проб 6-2-1-2.1 и 7-2-1.1

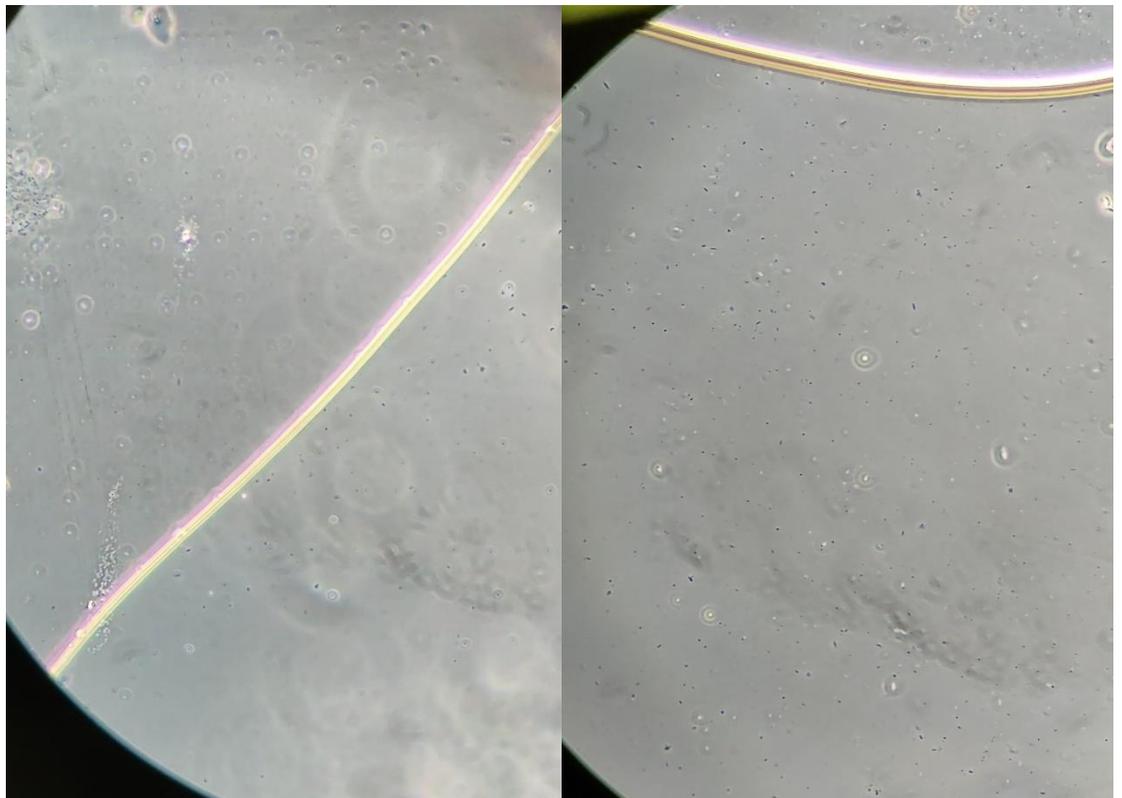


Рисунок 3.6 – Микрофотография клеток из проб 8-1-1.2 и 9-2-2.1

Затем, чтобы выяснить насколько работают выделенные микроорганизмы деструкторы нефти в присутствии искоемых почв, был проведен микроэксперимент. Он заключается в измерении количества  $\text{CO}_2$ , образованного бактериями при разрушении нефти, с помощью газового хроматографа, что показывает активность бактерий, так как они в процессе своей жизнедеятельности выделяют  $\text{CO}_2$ .

Сначала нестерильно добавили 0,2 г почвы (выбрали почву под номером А 7-1) в пенициллиновые флаконы (рисунок 3.7). В часть из них добавили нефть. Закрыли их сверху металлическими колпачками и стерилизовали в автоклаве.



Рисунок 3.7 – Процесс добавления почвы и нефти

Затем подготовили суспензии бактерий. Так как среда, в которой культивировались микроорганизмы, стимулирует их рост, клетки необходимо было отмыть с помощью центрифугирования.

Эксперимент проводили по двум сценариям. Первый – суспензия бактерий с раствором водой и небольшим количеством соли ( $\text{H}_2\text{O} + \text{NaCl}$ ), второй – с фосфатным буфером (PBS). Схема вариантов эксперимента представлена в таблице 3.5.

Таблица 3.5 – Вариации эксперимента

Среда	Наличие нефти	Среда + бактерии	Среда + бактерии + почва	Среда + почва
H <sub>2</sub> O + NaCl	+	×2	×2	×2
	-	×2	×2	×2
Фосфатный буфер PBS	+	×2	×2	×2
	-	×2	×2	×2

\*Примечание: ×2 – количество повторностей

Для бактериальной суспензии были объединены три накопительные культуры, выбранные из самых активных (7-2-1.1; 9-2-2.1 и 9-2-2.1(1)). Выбор сделали после проверки оптической плотности. В получившиеся суспензии добавили по 3 мл среды.

В автоклавированные пенициллиновые флаконы с почвой добавили шприцом по 0,3 мл суспензии и поместили в термостат.

#### Анализ полученных данных

По прошествии недели активность микроорганизмов определяли по количеству выделившегося CO<sub>2</sub> для каждого варианта. В таблицах 3.6 и 3.7 представлены высоты пиков CO<sub>2</sub>, а также рассчитанное среднее содержание CO<sub>2</sub> в объемных процентах для каждого варианта, что визуально показано на рисунке 3.8.

Таблица 3.6 – Данные представляют высоту пика CO<sub>2</sub> и среднее содержание CO<sub>2</sub> (в объемных %) при измерении на газовом хроматографе

Вариант	№ повторности	Высота пика CO <sub>2</sub>	Среднее содержание CO <sub>2</sub> в варианте	Стандартное отклонение/2	Среднее содержание CO <sub>2</sub> (в объемных %)
H <sub>2</sub> O+Почва					
Воздух	0,5	103,459	106,24		
		109,02			
H <sub>2</sub> O-нефть	1.1	419,552	427,91	7,23	0,29
		411,885			
	1.2	438,992			
		441,217			
H <sub>2</sub> O+нефть	2.1	476,605	469,89	4,97	0,32
		470,472			
	2.2	476,829			
		455,653			
PBS-нефть	1.1	682,723	704,73	20,83	0,49
		660,279			
	1.2	754,367			
		721,576			
PBS+нефть	2.1	1180,038	1287,88	86,66	0,89
		1102,338			
	2.2	1457,342			
		1411,788			
H <sub>2</sub> O+Бактерии+Почва					
H <sub>2</sub> O-нефть	1.1	784,735	679,66	50,61	0,47
		746,544			
	1.2	608,504			
		578,845			
H <sub>2</sub> O+нефть	2.1	1714,845	1488,78	113,87	1,03
		1653,174			
	2.2	1318,476			
		1268,618			
PBS-нефть	1.1	927,381	981,38	20,68	0,68
		970,575			
	1.2	1013,024			
		1014,558			
PBS+нефть	2.1	2715,567	2634,1	29,39	1,82
		2575,097			
	2.2	2623,638			
		2622,097			

Таблица 3.7 – Продолжение таблицы 3.6

Вариант	№ повторности	Высота пика CO <sub>2</sub>	Среднее содержание CO <sub>2</sub> в варианте	Стандартное отклонение/2	Среднее содержание CO <sub>2</sub> (в объемных %)
Воздух	0,5 мл	103,459	106,23		
		109,02			
H <sub>2</sub> O+Бактерии					
H <sub>2</sub> O-нефть	1.1	256,454	239,1	10,31	0,16
		256,8			
	1.2	226,429			
		216,726			
H <sub>2</sub> O+нефть	2.1	369,973	348,34	11,34	0,24
		365,531			
	2.2	332,437			
		325,409			
PBS-нефть	1.1	537,398	571,6	28,2	0,39
		527,611			
	1.2	569,594			
		651,818			
PBS+нефть	2.1	525,257	1194,92	387,84	0,82
		521,095			
	2.2	1872,35			
		1860,986			

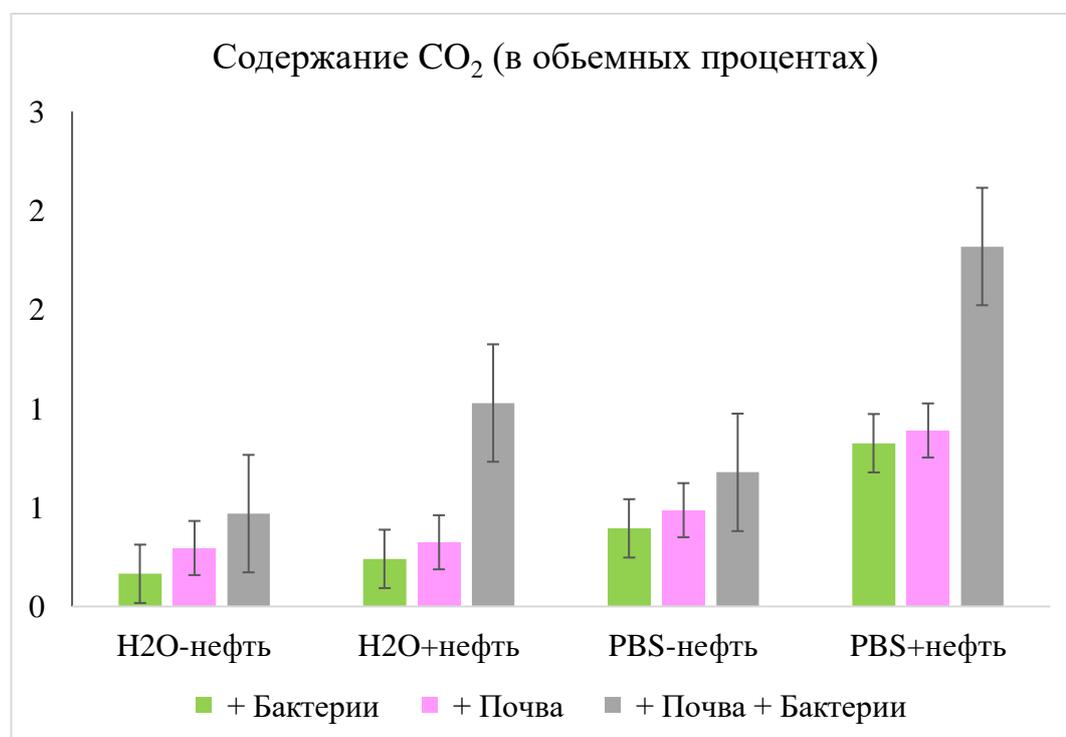


Рисунок 3.8 – Содержание CO<sub>2</sub> в объёмных процентах

Примерный анализ данных по получившейся на основе измерений и расчетов диаграмме

1 группа (H<sub>2</sub>O-нефть)

Во всех вариантах небольшое выделение CO<sub>2</sub>.

1. + бактерии – выделение CO<sub>2</sub> минимальное (нет органических веществ для окисления бактериями);
2. + почва – выделилось CO<sub>2</sub> больше, чем в первом варианте;
3. + почва + бактерии – еще больше, чем в предыдущих.

Разница между вариантами небольшая (в пределах вариации данных).

2 группа (H<sub>2</sub>O+нефть)

1. Внесенные бактерии не разрушали нефть (нехватка питательных веществ (азота, фосфора и других);
2. Выделение CO<sub>2</sub> было на уровне 1 варианта, по тем же причинам;
3. Стимуляция выделения CO<sub>2</sub>. Очевидно, внесенные бактерии разрушали нефть.

3 группа

Результаты очень близки к вариантам группы 1.

4 группа

1. В фосфатном буфере бактерии разрушали нефть;
2. Выделение CO<sub>2</sub> такое же как в варианте 1;
3. Увеличение CO<sub>2</sub> из-за разрушения нефти внесенными бактериями.

Вариант 3 последней группы показывает перспективность использования для биоремедиации этих почвенных суспензий бактерий, дополненных фосфатами.

На основании приведенных данных можно сделать вывод, что исследуемые накопительные культуры при внесении в почвы показали видимые результаты, разлагая органические вещества, но об эффективности их использования на нефтезагрязненных почвах говорить рано. Ещё нужно

понимать, что возможно в процессе работы не были учтены некоторые факторы, а также не было достаточно времени для полного выведения, изучения и определения чистых культур. Требуются дальнейшие исследования для более точных выводов.

## Заключение

В результате проведенных исследований, было выяснено, что загрязнение почвы нефтью и нефтепродуктами крайне негативно сказывается на ее свойствах. Тяжелые нефти и нефтепродукты оказывают токсическое воздействие на почвенные организмы и растения, резко нарушается почвенный микробиоценоз. Кроме того, естественное восстановление нефтезагрязненных почв протекает за длительный период, и даже после этого может не произойти полного возврата биоценоза и почвы к исходному состоянию. Многие вопросы влияния нефтяного загрязнения на почвенный покров до сих пор остаются нерешенными. Из чего следует вывод, что на большинстве территорий, подвергнувшихся нефтяному загрязнению, необходимо проводить рекультивацию.

В рамках работы, были исследованы основные методы и технологии очистки нефтезагрязнённых почв. Наиболее подробно рассматривались биологические методы, в частности метод биоремедиации с применением микроорганизмов-нефтедеструкторов. При решении задач была проанализирована экологическая обстановка Апшеронского полуострова, нарушенная в следствие исторически сложившейся долговременной добычи, переработки, транспортировки нефти. Также в ходе работы были получены накопительные культуры мезофильных микроорганизмов-нефтедеструкторов из почвы, находящейся в зоне добычи нефти на территории Апшеронского полуострова, для потенциального получения биопрепаратов, способных разрушать нефтепродукты. Был проведен микроэксперимент – насколько эти микроорганизмы работают в присутствии искомым почв. В результате микроорганизмы успешно выполнили свою работу и, по-моему мнению, их следует продолжать изучать.

По завершению работы и анализируя полученные результаты можно придти к заключению, что задачи были решены в полном объеме, а цель поставленного исследования – изучить возможность применения

биологического метода очистки нефтезагрязненных почв территорий Апшеронского полуострова (Азербайджан) для снижения загрязненности нефтепродуктами – была достигнута.

## Список использованной литературы

1. ГОСТ Р 57447-2017. Наилучшие доступные технологии. Рекультивация земель и земельных участков, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. Основные положения [Текст]. - Введ. 2017-12-01. - М. : Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2017.
2. Алексеев А. Ю. Практика биологической рекультивации [Текст] / А. Ю. Алексеев, В. А. Забелин, С. А. Куц, Н.С. Пушкарев// Нефтяное хозяйство, 2006. № 12. - С. 98-99.
3. Алексеев А. Ю. Поиск новых ассоциаций микроорганизмов – деструкторов нефти при низких положительных температурах / А. Ю. Алексеев, Е. А. Смородина, Л. С. Адаменко [и др.] // Биологическая рекультивация и мониторинг нарушенных земель : материалы IX Всероссийской научной конференции с международным участием, Екатеринбург, 20-25 августа 2012 г. - Екатеринбург: Изд-во Уральского ун-та, 2012. - С. 10-15.
4. Баландина А. В. Микробная ремедиация нефтезагрязненных агродерново-карбонатных почв и техногенных поверхностных образований в подзоне южной тайги: монография / А. В. Баландина, О. З. Еремченко// Перм. гос. фарм. акад.; Перм. гос. нац. исслед. ун-т. - Пермь: 2016. -100 С.
5. Бурлака, И. В. Эффективность рекультивации нефтезагрязненных земель в Среднем Поволжье [Текст]: автореф. дис... канд. сельскохоз, наук / И. В. Бурлака. - Саратов: 2008. -216 с.
6. Владимиров, В.А. Разливы нефти: причины, масштабы, последствия/ В.А. Владимиров // Стратегия гражданской защиты: проблемы и исследования, 2014. - С. 217-228.
7. Войкова И.В. Микробиологическая очистка воды и почвы от нефти и нефтепродуктов/ И.В. Войкова, Ю.Е. Конев// Интродукция микроорганизмов в окруж. среду. - М.: Изд-во ВИНТИ, 1994, С. 12-13.

8. Галкин В.И. Геология нефти и газа: учебно-методическое пособие / В.И. Галкин, О.Е. Кочнева // Пермь: Изд-во Перм. гос. техн. ун-та, 2011. – 113 С.
9. Гусейнова С. Р. Классификация растительного покрова экосистемы Апшеронского полуострова/ С. Р. Гусейнова // Бюллетень науки и практики, 2019. Т. 5. №11. - С. 64-70.
- 10.Ежелев, З. С. Свойства и режимы рекультивированных после разливов нефти почв усинского района республики коми [Текст]: дис... : 06.01.03/ Ежелев Захар Сергеевич. -М., 2015. -142 с.
- 11.Израэль Ю. А. Комплексный фоновый мониторинг в СССР/ Ю.А.Израэль, Ф.Я. Ровинский // Комплексный глобальный мониторинг состояния биосферы: Тр.3 Между народного симпозиума , 14-19 окт., 1985. Ташкент, Л., 1986. Т.1, с.89-105.
- 12.Исмаилов Н. М. Микробиология и ферментативная активность нефтезагрязненных почв/ Исмаилов Н.М.// Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М.: 1988. С. 42-56.
- 13.Исмаилов Н. М. Апшеронский промышленный регион – факторы экологической напряженности/ Н.М. Исмаилов, С.И. Наджафова, Гасымова А. // Аридные экосистемы. - 2015. - С. 92-99.
- 14.Лодоло А. и др. Технологии восстановления почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. Справочник/ А. Лодоло и др// М.: Изд-во РЭФИА, НИА-Природа, 2003. - 258 с.
- 15.Мамедов Г. Ш. Научные основы и принципы районирования почв Азербайджана по устойчивости к загрязнению органическими веществами/ Г. Ш.Мамедов, Н. М. Исмаилов // Баку: Изд-во Эл, 2006. - 204 с.
- 16.Мязин В.А. Разработка способов повышения эффективности биоремедиации почв Кольского Севера при загрязнении нефтепродуктами (в условиях модельного эксперимента) [Текст]: дис. канд. тех. наук: 03.02.08 / Мязин Владимир Алевсандрович -Апатиты, 2014. - 159 с.

17. Никифорова Е.М. Прогнозные ландшафтно-геохимические карты возможности деградации природной среды при добыче и транспортировке нефти / Е.М. Никифорова М.А, Глазовская, В.В. Батоян // Проблемы антропогенных воздействий на окружающую среду. - М.: Наука, 1985. - С. 45-51.
18. Пиковский Ю.И. и др . Проблема диагностики и нормирования загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами. /Почвоведение, 2003, №9, с. 1132-1140.
19. Ревель П. Среда нашего обитания. Загрязнение воды и воздуха / Ревель П., Ревель Ч.// М.: Мир, 1995. - 296 с.
20. Сахно, О. Н. Экология микроорганизмов : учеб. пособие. В 3 ч. Ч. 2 / О. Н. Сахно, Т. А. Трифонова// Владим. гос. ун-т. – Владимир: Изд-во Владим. гос. ун-та, 2009. - 52 с.
21. Фарахова И. З. Агрехимические свойства и приемы рекультивации нефтезагрязненных серых лесных почв Предкамья Республики Татарстан: автореф. дисс. ... канд. с/х. наук: 06.01.04 / Фарахова Ильясия Закариевна. - Казань, 2009. -25 с.
22. Хазиев Ф. Х. Изменение биохимических процессов в почвах при нефтяном загрязнении и активация разложения нефти / Ф. Х. Хазиев, Ф. Ф. Фатхиев Агрехимия, 1981. №10, С. 102-111.
23. Халилова, Д.И. Анализ методов очистки нефтезагрязненных почв при авариях на объектах нефтегазовой отрасли и транспорте/ Д.И. Халилова, Д. М. Юнусова // Бюллетень результатов научных исследований. - 2017. - С. 23-29.
24. Шигапов А. М. Биоремедиация нефтезагрязненных почв органическими компонентами отходов лесозаготовительной промышленности (на примере дерново-подзолистых почв Уральского федерального округа) [Текст]: дис... : 03.02.08 / Шигапов А. М. - Екатеринбург., 2016. -228 с.