



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 Применение мезофильных нефтеразрушающих бактерий для
восстановления загрязненных территорий Ленинградской области (г. Пушкин)

Исполнитель _____ Садовских Елизавета Сергеевна
(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)

_____ Алексеев Денис Константинович
(фамилия, имя, отчество)

09 06 » 2022 г.

Санкт-Петербург,
2022

Оглавление

Введение	3
Глава 1 Взаимодействие почвенных микроорганизмов и нефти.....	5
1.1 Влияние нефти на состояние экосистем	5
1.2 Механизм биоремедиации почв	9
1.3 Характеристика почвенных бактерий, разлагающих нефть	14
Глава 2 Объекты исследования и методики проведения практической части ...	17
2.1 Объект исследования и природные условия района	17
2.2 Антропогенное воздействие на окружающую среду в месте отбора проб ...	21
2.3 Методики получения накопительных культур мезофильных бактерий-нефтедеструкторов	22
2.4 Методики и схема эксперимента по оценке эффективности работы выделенных накопительных культур микроорганизмов	24
Глава 3 Результаты практической части и выводы	30
3.1 Описание результатов получения культур бактерий-нефтедеструкторов	30
3.2 Описание результатов проведения эксперимента	34
Заключение	40
Список использованной литературы.....	42

Введение

Одним из основных ресурсов в энергетическом плане до сих пор остается нефть, использование которой не проходит бесследно для окружающей среды, а наоборот становится техногенным загрязнением. Добыча и использование углеводородного топлива ведет к ряду экологических проблем, например, загрязнение и деградация экосистем, влияние на климат. В случае с транспортировкой нефти проблема приобретает масштабы, выходящие за границы месторождений, складов и заводов, приобретая повсеместный характер. При попадании нефти в среду начинается процесс миграции: просачивание в грунтовые воды, аккумуляция в растениях, испарение в воздух, что в конечном итоге может привести к снижению качества данной среды. В разных литературных источниках эксперты дают схожие оценки ежегодным потерям сырой нефти. В статье Смольниковой В.В. и Емельянова С.А [17] статистика гласит, что из более, чем 4 млрд т мировой добычи сырой нефти, в окружающую среду может попадать более 50 млн т. Для России показатель потерь находится на уровне до 5 % от величины ее добычи [17]. Но официальная статистика почти не учитывает мелкие разливы и технологические утечки, что могло бы в разы увеличить статистику объемов загрязнения окружающей среды.

Из-за несовершенства технологий, устаревшего оборудования и человеческого фактора риски разливов нефти на сегодняшний день велики. Такое техногенное загрязнение становится все более острой проблемой в связи с тем, что общее состояние качества среды ухудшается. Нефть оказывает токсическое действие на живые организмы, нарушая естественные процессы экосистемы, поэтому актуальным остается вопрос о наиболее приемлемом методе ликвидации загрязнения, в частности нефти с поверхности почв.

Одним из методов очистки, который близок по принципу действия к естественным процессам в природе является биологический метод, или биоремедиация. В местах загрязнения уже существуют естественные

нефтедеструкторы, но процесс ремедиации может занимать продолжительное время из-за климатических факторов или других причин, например, нехватки питательных веществ для данных микроорганизмов, в связи с чем требуется дополнительная стимуляция их жизнедеятельности или привнесение дополнительного их количества на загрязненные участки.

Целью данной работы является сбор информации о биологическом методе очистки территорий от нефтяных разливов в почвенном слое, а также постановка эксперимента применения нефтеразрушающих бактерий для биоремедиации антропогенно нарушенных почв в условиях климата Ленинградской области и исследование их эффективности.

В соответствии с целью в данной работе ставятся следующие задачи:

1. Сделать литературный обзор источников, посвященных теме ремедиации почв с помощью биологического метода;
2. Ознакомиться на практике с методикой культивирования мезофильных бактерий и поставить эксперимент с пробами загрязненных нефтью техногенных почв г. Пушкина, расположенных в непосредственной близости к железнодорожным путям, на предмет исследования эффективности работы нефтеразрушающих бактерий;
3. Сделать заключение о способах применения и эффективности данных нефтедеструкторов, и о возможности использования данного метода на исследуемой территории.

Автор приносит искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории сектора Экологической микробиологии отдела Светофизиологии растений и биопродуктивности агроэкосистем ФГБНУ АФИ за помощь в реализации практической части данной работы, и лично Александру Сергеевичу Галушко, за представляющие интерес для изучения материалы, за помощь в освоении правил и методик работы с микроорганизмами, за руководство и помощь в постановке эксперимента, контроль и помощь в обработке данных и обсуждение полученных результатов. Благодаря наставничеству Галушко А.С. был получен ценный опыт проведения исследовательской работы

Глава 1 Взаимодействие почвенных микроорганизмов и нефти

1.1 Влияние нефти на состояние экосистем

Один из постулатов американского эколога Барри Коммонера, которые он сформулировал в своей книге "Замыкающийся круг", говорит о том, что любое действие имеет свои последствия, так как все тесно связано между собой [24].

Использование нефти обеспечивает человека энергией для существования, но наряду с этим приносит негатив в виде загрязнения и ухудшения обстановки вокруг. Привнесение чужеродных веществ приводит к изменениям закономерностей экосистемы. Вещество начинает вносить свой вклад, изменяя физические, химические свойства компонентов, что в свою очередь влияет на качество среды и ее биоразнообразие.

Загрязнение окружающей среды нефтью – серьезная экологическая проблема. Для понимания последствий такого загрязнения стоит рассмотреть состав поллютанта.

Компонентный состав нефти включает в себя [16]:

1. Многочисленные углеводороды до 80-90 % их процентного содержания и другие органические соединения, такие как меркаптаны, асфальтены.

2. До 10 % воды, до 4 % газов;

3. Небольшие количества минеральных солей и микроэлементов.

Основные углеводородные компоненты сырой нефти представлены в таблице 1.1 [23].

Таблица 1.1 – Три основных углеводородных компонента сырой нефти

	Органическое соединение	Основные представители
1	Парафины	Декан
		Гексадекан
		Октан
2	Нафтены (циклоалканы)	Циклопентан
		Циклогесан
		Метилциклопентан
3	ПАУ (полициклические ароматические углеводороды)	Нафталин
		Антрацен
		Бензопирен

Скорость разложения и доступность нефти для деградации обуславливается структурой углеводородов, которые можно поделить на две группы: алифатические и ароматические соединения. Алифатические углеводороды, например, алканы имеют линейную структуру, поэтому легко разлагаются под действием микроорганизмов. Более сложную структуру с количеством циклических колец имеют ароматические соединения, например, циклоалканы, полициклические ароматические углеводороды, которые наиболее устойчивы к биodeградации [25].

Можно сделать вывод, что чем длиннее и сложнее структура соединения, тем более сложен и затруднен процесс его биологического окисления [26].

Таким образом, видно, что нефть представляет собой многокомпонентную смесь, ее составляющие могут иметь различную структуру, поэтому степень токсичности для окружающей среды будут определять углеводороды, которые входят в ее состав.

Единым механизмом является то, что нефть, попадая в среду, покрывает поверхность почвы и вызывает задержку выделяемого почвенными

организмами углекислого газа, а также нарушает структуру почвенных частиц и заполняет поровое пространство. В таких условиях нарушаются водные (влагоемкость, гигроскопичность, фильтрационная способность) и воздушные свойства (воздухоёмкость, воздухопропускная способность), а также циркуляция питательных веществ [23].

На растения нефть оказывает токсический эффект вызывая различные аномалии в развитии, а также препятствуя естественному поступлению влаги и питательных веществ, закупоривая поверхность корней [3].

Последствия нефтяного загрязнения, мигрирующего через компоненты природы и трофические связи в экосистемах, могут в конечном итоге воздействовать на здоровье человека. Неполное разложение загрязнителя до безвредных конечных продуктов, придает нефти токсичные свойства [25]. Что может приводить к угнетению роста и развития прежних живых организмов.

Но в определенных количествах нефть может также и стимулировать развитие некоторых видов. Так при нефтезагрязнении почв наблюдается перестройка прежней структуры биоты: начинают преобладать виды, способные существовать в сложившихся условиях, что значительно обедняет биоразнообразие [23].

В новой структуре начинает преобладать группа углеводородокисляющих микроорганизмов, которые являются маркером, определяющим нефтяное загрязнение. Для поддержания своего метаболизма они используют процессы окисления, что может приводить к большому потреблению кислорода и угнетению жизнедеятельности других почвенных аэробных микроорганизмов [12]. Что также обедняет видовое разнообразие.

Такие условия среды, как температура, количество осадков, качество почв, во многом определяют активность биоты, поэтому различные территории имеют свои особенности, которые влияют на скорость развития микроорганизмов. Как следствие, скорость самоочищения почв будет отличной в различных почвенно-климатических зонах [5].

В таких природных зонах, как степь, полупустыня и пустыня, процессы удаления нефти могут быть ускорены теплыми температурами. А также при непромывном водном режиме уменьшается риск просачивания загрязнителя в грунтовые воды. В условиях аридного климата создаются благоприятные условия для частичного испарения с поверхности почв токсичных легких фракций нефти, но что также ведет к загрязнению окружающего воздуха [5]. Тяжелые фракции, попадая в почву образуют долговечные очаги загрязнения [3]. При достаточно развитом биоценозе, высоком содержании гумуса, оптимальной температуре и влажности биодegradация может быть заметно ускорена.

Для территории Ленинградской области характерны условия, отличные от упомянутых выше. Из-за более низких средних температур и условий гумидного климата области процесс самоочищения замедлен и осложнен.

В районах с холодным и умеренно-холодным климатом – тайга, тундра, избыточным увлажнением и промывным режимом нефть может начать мигрировать нисходящими потоками по почвенному профилю, что представляет угрозу загрязнения грунтовых вод. Проблема аккумуляции и создания очагов загрязнения присуща и для данных областей. В условиях низких температур, низкого содержания гумуса и заболоченности почвы являются уязвимыми и их естественное восстановление может быть растянуто на долгие годы [5].

Обобщенно можно говорить о том, что нефтяное загрязнение почв приводит к ряду экологических проблем [26]:

1. Изменение водных, воздушных и механических свойств почвы
2. Нарушение соотношения в структуре почвенной фауны и флоры
3. Обеднение почв из-за потери доступности питательных веществ для биоты, снижение процессов азотификации, нитрификации, минерализации
4. Нарушение устойчивости почвенной экосистемы, как следствие деградация и эрозии

5. Миграция загрязняющего вещества в сопредельные среды: в поверхностные и подземные воды в – результате смывов и просачивания по почвенному горизонту

Возврат в первоначальное состояние таких экосистем скорее невозможен, но восстановление в рамках их устойчивости происходит. В природных условиях очищение может растягиваться во времени [4] и, особенно в условиях холодного и гумидного климата [5], поэтому для ускорения механизма разрабатываются и применяются различные методы. В данном случае важно найти эффективные и приемлемый способ, какой может быть биологическая ремедиация.

1.2 Механизм биоремедиации почв

Существуют различные методы очистки почв от токсикантов. Их можно подразделить на физические, например, термический метод – удаление загрязнителя под действием сильного нагрева, химические – отверждение и стабилизация – для недопущения движения загрязняющего вещества по почвенному горизонту в грунтовые воды, а также биологические – фито- и биоремедиация – деструкция нефти с помощью живых организмов [19].

Каждый метод имеет свои преимущества и недостатки. За счет физических, химических методов можно добиться высоких показателей очистки, но недостатком считается их стоимость и энергозатратность. Поэтому в последнее время актуальным становится использование биологического метода [18].

Рекультивация нарушенных земель состоит из двух этапов: технического и биологического. При высоких уровнях загрязнения неотъемлемым является технический этап – необходимо производить снятие верхних слоев почв и грунтов с большими концентрациями загрязняющих веществ, проведение мелиоративных работ, очистка почв с помощью физических и химических

методов. На втором этапе для восстановления биоты почвы и улучшения характеристик почв с помощью живых организмов используют биологический метод [14].

Биоремедиация – метод очистки компонентов окружающей среды, который подразумевает использование живых организмов, разлагающих загрязняющие вещества [23]. Его зарождение относится к 70м годам XX века, и связано с поиском приемлемого способа очистки земель от нефтепродуктов [18].

Было отмечено, что нефтяные углеводороды могут разлагаться под действием таких микроорганизмов, как бактерии, грибы, дрожжи, микроводоросли. Но главенствующую роль в деградации нефти выполняют бактерии. Они способны существовать, обеспечивая себя в энергии и росте за счет деструкции углеводородов [26].

Можно отметить, что преимуществами биологического метода являются дешевизна, экологическая безопасность и эффективность. Но последнее во многом зависит от концентрации углеводородов: с увеличением содержания нефти, эффективность может падать, из недостатков также можно отметить зависимость от почвенных свойств и климата [9].

Микробиологическая ремедиация осуществляется двумя способами: биостимуляция и биоаугментация. Первый способ призван усилить и активизировать местную, или аборигенную, биоту, второй – основывается на привнесении в почву определенных культур микроорганизмов [23]. Для активизации естественных микроорганизмов проводят ряд работ по улучшению условий, например, рыхление, биовентиляция, добавление удобрений [9]. Местные микроорганизмы могут быть эффективнее привнесенных в связи с тем, что имеют механизмы для приспособления к жизни в данных почвенно-климатических условиях, а также если в экосистеме сохраняется большинство связей между различными популяциями, то, работая совместно, они могут деградировать нефть достаточно успешно, так как побочный продукт

окисления нефти одной группой бактерий может стать ресурсом для другой [26].

При суровых климатических условиях, бедных почвах и больших разливах для успешного очищения также прибегают к добавлению дополнительных штаммов микроорганизмов [9]. Совместное использование биоаугментации и биостимуляции имеет большую эффективность в очищении загрязненных нефтью почв [23].

Схожесть способов заключается в том, что в обоих случаях важным фактором является стремление к созданию оптимальных условий для микробной биоты таких, как:

- | | | |
|----------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| 1. количество воды | 2. рН почвы | 3. качество почвы |
| 4. температура почвы | 5. концентрация кислорода | 6. количество питательных веществ |

Изменение в любой из этих факторов может уменьшить популяцию микробов и в свою очередь снижает эффективность биоремедиации [23].

В результате биологической обработки происходит минерализация загрязняющего вещества, а не просто его удаление. В остатке могут оставаться продукты метаболизма бактерий, а также безопасные продукты разложения нефти. Происходит процесс превращения нефти в более доступные и легко усваиваемые другими микроорганизмами вещества [6].

По техническому воплощению метод биоремедиации можно разделить на:

1. *ex situ* – от лат. «вне места» [20]: извлечение части почвы с целью ее последующей обработки на специальном оборудовании (рисунок 1.1):

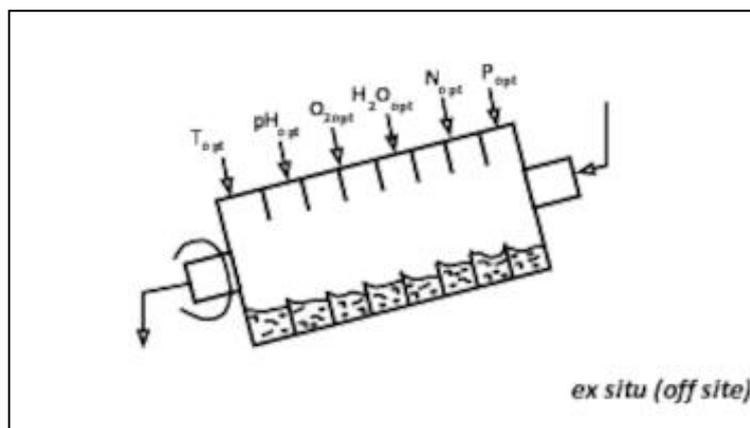


Рисунок 1.1 – Вариант очистки загрязненной почвы ex situ

На рисунке представлен биореактор, в который помещают загрязненную нефтью почву, предварительно просеяв от больших камней и корней. Внутри аппарата создают оптимальные условия для процесса микробиологической минерализации, добавляют бактерий-деструкторов, питательные вещества и перемешивают для равномерного распределения веществ. После очищения почву возвращают на прежнее место [13].

Существуют и другие способы, например, очищение на полевых грядках, куда перемещают почву и в процессе постоянного рыхления, орошения, улучшают свойства почв, стимулируют рост и развитие аборигенных микроорганизмов, а также добавляемых экзогенных. После восстановления почву также возвращают на прежнее место [13].

2. *in situ* – от лат. «на месте» [20]: загрязненная почва не перемещается (рисунок 1.2), а остается на месте (лишь при высоких концентрациях нефти прибегают к снятию верхнего слоя), а затем производится активация аборигенной биоты или внесение определенных штаммов микроорганизмов.

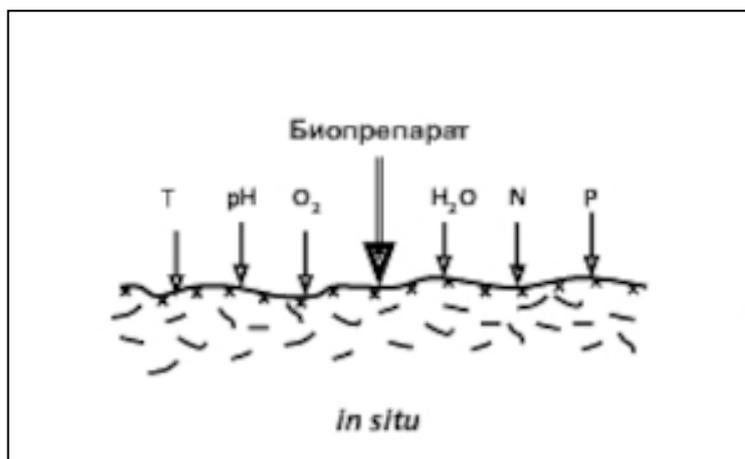


Рисунок 1.2 – Вариант очистки загрязненной почвы *in situ*

На рисунке представлена схема обработки почвы без ее перемещения. Такой способ оправдан в случаях невозможности изъятия грунтов, например, под автомагистралями, железными дорогами, зданиями. Создание оптимальных условий – привнесение удобрений, микроорганизмов, рыхление производится на месте [13]. Таким образом, можно отметить следующие преимущества применения биоремедиации [26].

1) Это естественный процесс: микроорганизмы-нефтедеструкторы увеличивают численность при присутствии нефтяного загрязнения, а после очищения среды от нефти, микробная популяция естественным образом сокращается. Продукты биологической очистки обычно являются безвредными (например, углекислый газ – используемый для фотосинтеза, вода и жирные кислоты).

2) Вместо простого переноса загрязняющих веществ из одной среды в другую (например, из почвы в подземные воды или в воздух) бактерии минерализуют нефть;

3) Экономически более выгодна, чем другие технологии очистки;

4) Данный метод может быть осуществлен на месте ("in situ"). Это снижает расходы устраняет необходимость переноса загрязненных отходов за пределы местности, а также снижает ресурсозатратность и риск вторичного загрязнения.

1.3 Характеристика почвенных бактерий, разлагающих нефть

Почва – сложная экологическая система, которая населена различными микробными популяциями. Их роль в поддержании устойчивости почв как компонента природы очень велика.

Как было упомянуто выше, структура микробных популяций загрязненных нефтью почв отличается от естественной. Так широкое распространение приобретают нефтедеструкторы способные выживать в изменившихся условиях [23].

Микроорганизмы-нефтедеструкторы имеют два важных механизма которые ускоряют процессы расщепления молекул и делают усвоение нефти более легким [13]:

1. Способность к образованию сложных ферментов – оксидоредуктаз для осуществления процесса окисления;
2. Выработка биосурфактантов (рисунок 1.3) – веществ аналогичных синтетическим поверхностно-активным веществам, которые повышают биодоступность нефти, уменьшая поверхностное натяжение фаз, что делает разложение быстрым.

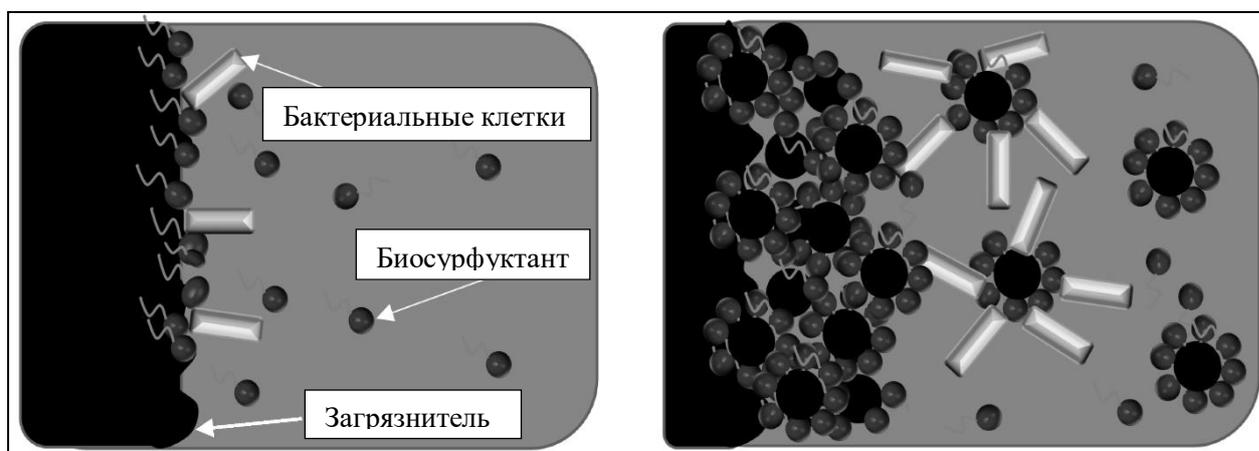


Рисунок 1.3 – Механизм действия биосурфактантов для повышения биодоступности углеводородов

Также стоит отметить, что смешанные культуры осуществляют более эффективную биодegradацию нефти, чем монокультуры [26]. На скорость деструкции во многом влияет состав нефти. Как уже было упомянуто, нефть представляет собой смесь различных углеводородов, которые отличаются своей биодоступностью: алифатические углеводороды более доступны, ароматические – менее.

Важным условием активации бактерий-нефтедеструкторов является создание благоприятных температурных условий.

Низкая скорость биоразложения может быть следствием холодного климата, поэтому для высоких широт в течении определенного времени года биологическая деструкция может быть затруднена и неэффективна без применения дополнительных технологий, обеспечивающих комфортные температурные условия. Например, применение тепловых одеял может увеличить температуру почвы и благоприятно сказаться на метаболической активности бактерий. Высокие температуры также имеют тенденцию замедлять биоремедиацию, так как могут приводить к эффекту стерилизации почв [19].

Весомые отклонение значений экологических факторов от оптимальных для живых организмов становится причиной угнетения их роста и развития. Поэтому важно это учитывать, чтобы создать для них благоприятные условия. Так микроорганизмы-нефтедеструкторы в зависимости от их предпочтения к определенным температурным диапазонам распределяются на три категории (рисунок 1.4) [6].

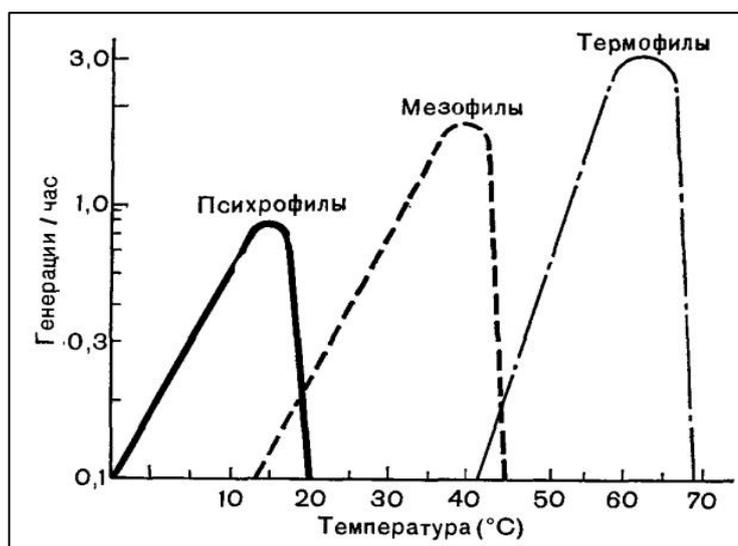


Рисунок 1.4 – Зависимость скорости роста психрофильных, мезофильных и термофильных микроорганизмов от показателя температур

Для роста и развития различных групп микроорганизмов термо-, мезо- или психрофилов требуются различные оптимумы температур. Их работа будет во многом зависеть от климатических условий района, а также характеристик почв. Поэтому скорость биоразложения может изменяться в рамках от нескольких месяцев – если условия для микроорганизмов благоприятные, до нескольких десятков лет – в случае суровых условий климата, почв и нехватки питательных веществ [4].

Термофильные бактерии будут малоэффективны на территории Ленинградской области из-за того, что они нуждаются в более высоких температурах, представляющим интерес является изучение применения микроорганизмов-мезофилов для биоремедиации почв, растущих при температурах от 20 до 40°C, которые могут ускорять процессы самовосстановления почв исследуемых территорий в летнее время, когда для них представляется наиболее оптимальный температурный диапазон.

Глава 2 Объекты исследования и методики проведения практической части

Экспериментальная часть работы была посвящена исследованию жизнедеятельности мезофильных бактерий почвогрунтов г. Пушкина, работы проводились в лаборатории сектора экологической микробиологии ФГБНУ АФИ под руководством Галушко Александра Сергеевича. Данная тема является предметом изучения лаборатории на протяжении многих лет, что обеспечивает большой потенциал к исследованию.

2.1 Объект исследования и природные условия района

Для территории Ленинградской области характерен климат морского и континентального типа с умеренно теплыми временами года. Преобладающим типом почв для области являются подзолистые, ближе к северной части характерны поверхностно-подзолистые почвы и маломощные подзолы, для южной – дерново-подзолистые. Для процесса оподзоливания в области существуют следующие предпосылки: промывной тип водного режима – преобладание количества выпадающих осадков над их испарением, а также обедненность растительного опада основаниями, закисленность почв [15].

В связи с тем, что территория области обширна и разнообразна по природным условиям выделяют несколько районов (рисунок 2.1) [15]:

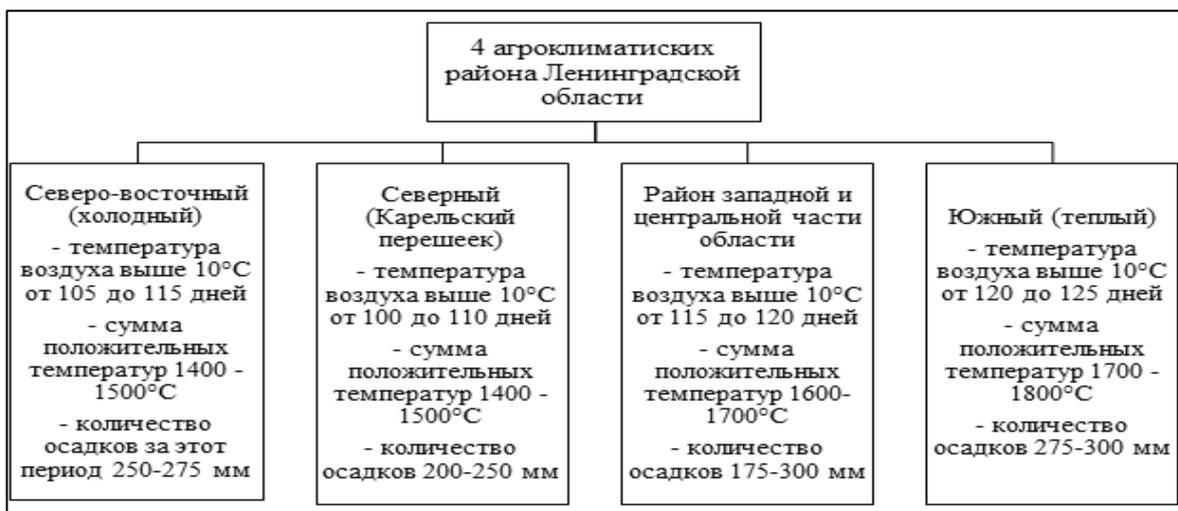
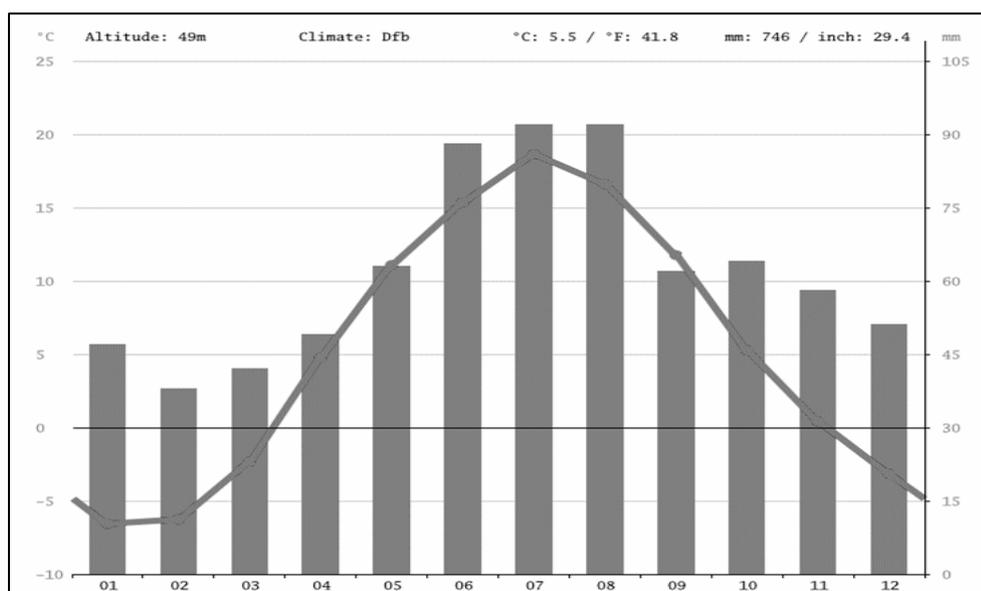


Рисунок 2.1– Агроклиматические районы Ленинградской области

Из вышесказанного видно, что для области характерна неоднородность в почвенно-климатическом плане, поэтому для подробного изучения была взята территория г. Пушкина, с характерными условиями для южного района и района западной и центральной части.

Объект исследования: образцы почв, подверженных нефтяному загрязнению взятые на территории города Пушкина вблизи железной дороги.

Для Пушкина ход годовой температуры представлен на рисунке 2.2 [22]:



*где столбики – количество осадков, мм; линия – ход температур, °C

Рисунок 2.2 – График годового хода температур г. Пушкин

Средняя температура в течение года составляет 5.5 °С. Из графика можно заключить, что амплитуда самого холодного и самого теплого месяца (соответственно 18.6 и 6.6 °С) составляет 6°С. Годовое количество осадков в среднем составляет 746 мм [22].

Так как интервал температур для мезофильных нефтеразрушающих бактерий – наиболее распространенной группы микроорганизмов – составляет от 18 и до 40, можно говорить о том, что в данном районе будут присутствовать исследуемые нефтедеструкторы, но благоприятные условия для них будут сохраняться в летний период.

В соответствии с «Методическими рекомендациями по выявлению деградированных и загрязненных земель» (1995) [1] почвогрунты для непосредственных исследований были отобраны с территории прилегающей к линейному объекту – железной дороге. С помощью визуальной оценки был выбран загрязненный участок размером 1м², методом конверта из пяти точек внутри квадрата отбирались пробы с глубины не более 5 см с последующим смешиванием для получения средней пробы [11], затем была произведена привязка мест отбора проб к географическим координатам (таблица 2.1).

Таблица 2.1 – Коды и координаты мест отбора проб почвогрунтов и их характеристика

Место отбора	Номер	Координаты места отбора	pH	Содержание нефтепродуктов, г/кг	Уровень загрязнения*	Характеристика образца
Г. Пушкин (П)	П 1	59.734778, 30.423944	6,3	5,5	Очень высокий	Загрязненный грунт с полотна железной дороги
	П 5	59.735111, 30.423667	5,7	19,1	Очень высокий	
	П 6	59.735139, 30.423639	6,7	1,5	Низкий	
	П 4	59.735056, 30.423722	5,8	3,5	Высокий	

*В таблице 2.1 указан уровень загрязнения, который оценивался в соответствии с Письмом Министерства охраны окружающей среды и природных ресурсов РФ [2]. Выделяют следующие уровни:

1. Допустимый – до 1 г/кг
2. Низкий – от 1 до 2 г/кг
3. Средний – от 2 до 3 г/кг
4. Высокий – от 3 до 5 г/кг
5. Очень высокий – > более 5 г/кг

С помощью программы Quantum GIS географические координаты мест отбора проб были преобразованы в графическое отображение на карте города Пушкин (рисунок 2.3).



Рисунок 2.3 – Расположение мест отбора проб на карте г. Пушкина

2.2 Антропогенное воздействие на окружающую среду в месте отбора проб

Территория, на которой производился отбор проб, подвержена значительному антропогенному воздействию, так как в данном месте пролегает железнодорожный путь.

Если взять во внимание тот факт, что по территории Санкт Петербурга и Ленинградской области пролегает 2733,5 км сети железнодорожных путей, а объем перевозок занимает второе место в стране, то проблема загрязнения прилегающих территорий становится актуальной и требует поиска решений по минимизации отрицательного воздействия [21].

При транспортировке нефти существуют немалые риски загрязнения окружающей среды. Это может произойти в следующих случаях:

1. Смыв атмосферными осадками или при мойки поверхности вагонов накопившихся нефтепродуктов;
2. Потери содержимого цистерн в результате негерметичности оборудования;
3. Выделение нефтепродуктов, обеспечивающих работу поездов – топливо, смазочные материалы;
4. Аварийные разливы.

Почвогрунты, находящиеся в непосредственной близости к транспортным путям, имеют отличный от естественных почв состав и свойства: как правило, они переуплотнены из-за постоянного воздействия транспорта, а также загрязнены вследствие локальных разливов или утечек топлива и перевозимых грузов – нефтью и нефтепродуктами. Попадание нефти изменяет воздушный, водный режим, нарушает естественную экосистему и изменяет структуру биоценозов. Что требует обширного комплекса работ по восстановлению территорий.

2.3 Методики получения накопительных культур мезофильных бактерий-нефтедеструкторов

Цель: обнаружение в исследуемых пробах почвогрунтов г. Пушкина мезофильных микроорганизмов, способных разрушать нефть, и культивирование их накопительных культур с целью дальнейшего исследования их для биоремедиации.

Под термином накопительные культуры понимают совокупность выращенных микроорганизмов с преобладанием одной физиологической группы [10].

В данной работе главным условием была температура. Так у мезофилов, которые рассматриваются в данной работе оптимум температур лежит в промежутке от 25 до 37°. Поэтому для поддержания и стимуляции роста, их помещают в термостат с постоянной температурой и в условиях затемнения.

Для выращивания бактерий была приготовлена питательная среда, в которой находились все необходимые минеральные вещества для их развития, в качестве источника углерода была добавлена нефть.

В работе была использована жидкая среда Ворошиловой-Диановой, которая состоит из следующих составляющих [7]:

$\text{NH}_4\text{Cl} - 1,0 \text{ г/л,}$	$\text{MgSO}_4 - 0,2 \text{ г/л,}$
$\text{K}_2\text{HPO}_4 - 1,0 \text{ г/л,}$	$\text{CaCl}_2 - 0,02, \text{ г/л,}$
$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1,0 \text{ г/л,}$	$\text{NaCl} - 1,0 \text{ г/л.}$

Следующим этапом было измерение активной кислотности среды: большая часть бактерий эффективны при рН, близком к 7,0. Исключения не составляют и нефтедеструкторы, поэтому при подготовке среды необходимо довести рН до нужного значения. Суть методики заключается в измерении рН электрометрическим методом при помощи рН-метра и при необходимости добавление щелочи [10]. В данном случае для повышения рН с 6,55 до 7,2 был использован раствор щелочи NaOH.

Для исключения попадания посторонних микроорганизмов, среда была помещена в автоклав (ВК – 75) – прибор для стерилизации – на 30 минут при температуре 121°C и давлении в 1 атмосферу.

Каждая из трех проб почвогрунтов была добавлена в среду Ворошиловой-Даниловой в соотношении 0,1 г почвы на 5 мл среды. Были приготовлены по три пробирки с каждой пробой, каждая третья из которых – контрольная – для сравнения изменений и исходного состояния. В результате получилось 9 пробирок с исследуемым материалом.

Нефть сырую (ГОСТ 9965-62, Черкасский завод химреактивов) вносили после высева культуры в количестве 10 мл/л во все пробирки, кроме контрольных. После чего все образцы были убраны для культивирования в термостате (ВТ 120) при постоянной температуре 28°C.

С целью хранения и обеспечения условий роста определенных микроорганизмов производился их периодический пересев в стерильную питательную среду [10].

После визуального осмотра и количественного измерения оптической плотности среды на приборе – денситометр DEN-1В, который определяет концентрацию клеток микроорганизмов в среде с фиксированной длиной волны $\lambda = 565 \pm 15$ нм, отбирались пробы с хорошо заметным ростом и производился пересев на такую же среду с нефтью в соотношении 0,5 мл культуральной жидкости на 5 мл среды. После чего исходные пробирки убрались в холодильник.

Для микроскопирования выделенных бактерий, из лучших повторностей было отобрано 0,5 мл среды с микроорганизмами в микроцентрифужные пробирки конической формы – Эппендорф – объемом 1,5 мл. Затем пробы были подвержены центрифугированию на приборе Sigma 1-13 в течение 5 минут для разделения микроорганизмов и среды с нефтью, после чего последняя была удалена, а к пробам добавлено по 100 мкл свежей среды ВД. Получившиеся растворы были перемешаны на приборе Vortex V-1-plus для равномерного распределения содержимого в толще среды.

Взятие капли жидкой среды с микроорганизмами производилось помощью бактериологической петли, после чего они были помещены на предметное стекло и закрыты покровным стеклом получившийся препарат был приготовлен по методу «раздавленная капля» [10]. Препараты были рассмотрены на микроскопе Axiostar plus (рисунок 2.4):



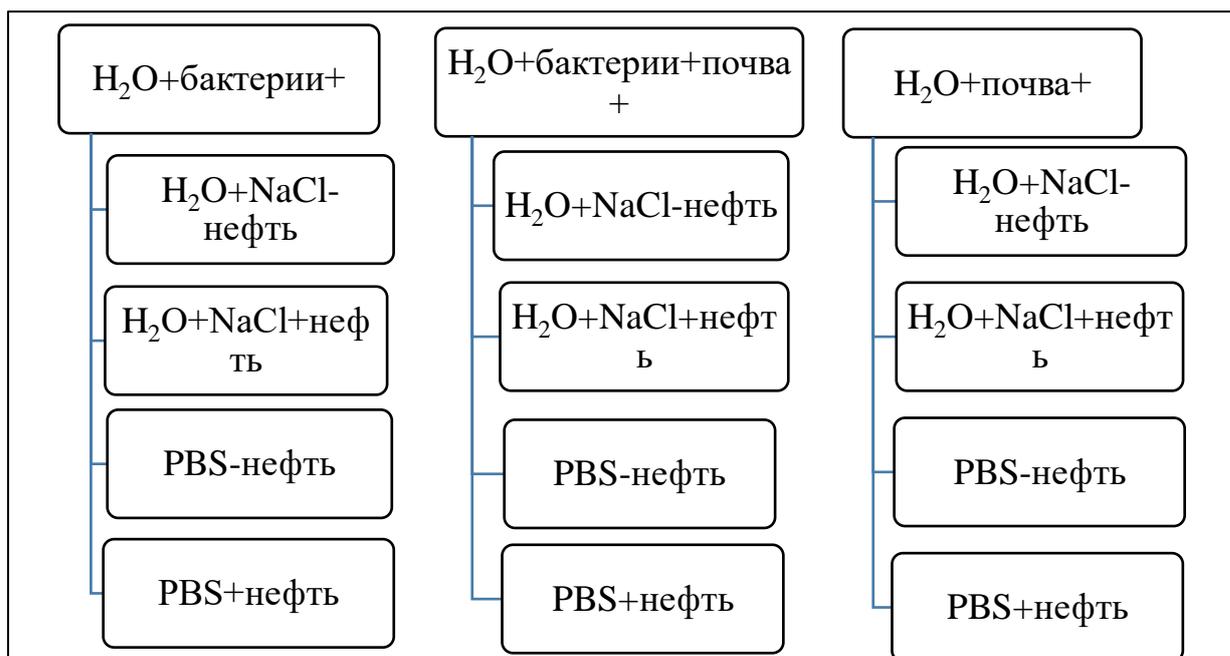
Рисунок 2.4 – Микроскоп Axiostar plus

2.4 Методики и схема эксперимента по оценке эффективности работы выделенных накопительных культур микроорганизмов

После получения материала для исследования – культур необходимых бактерий – с ними был поставлен эксперимент.

Цель: исследование эффективности работы выделенных накопительных культур для биологической деградации нефти в присутствии отобранных почв.

Структура эксперимента заключалась в следующем: в основные пробы были помещены бактерии с влажной почвой, для контроля же были сделаны пробы двух вариантов – только с бактериями, и только с почвой, чтобы можно было произвести сравнения. Также было приготовлено два вида сред, каждая из которых была в варианте с нефтью и без. Все комбинации были повторены в двух повторностях. Ниже представлена схема эксперимента (рисунок 2.5).



*где PBS – фосфатный буферный раствор (Phosphate-buffered saline), H₂O+NaCl - водный раствор

Рисунок 2.5 – Схема комбинаций вариантов экспериментальных проб

Из данной схемы видно, что получилось 12 флаконов, что в двух повторностях составило 24, дублирование делается в целях достижения большей точности, избежания некорректных результатов.

Почвенные навески массой 0,2 г были взяты с помощью весов MW – 150 T CAS (рисунок 2.6).



Рисунок 2.6 – Взятие навески почвогрунта

Почвенные навески согласно схеме эксперимента были добавлены в 16 флаконов, в 8 из которых была добавлена нефть. Нефть также была добавлена в 8 флаконов без почвы. После чего все флаконы были закрыты и простерилизованы в автоклаве в течение 30 мин при 1 атмосфере и температуре 121°C для исключения всех посторонних микроорганизмов.

Состав питательных сред:

1. H₂O водный раствор: H₂O+NaCl – 5,0 г/л, pH = 6,0. В первом случае среда представляла собой воду с добавлением соли NaCl, таким образом в среду не добавлялся буфер, чтобы не изменять естественную кислотность почв, pH среды не доводилась до нужного значения и составила 6,00. Соль была добавлена для того, чтобы уравновесить концентрации растворенных солей вне и внутри микроорганизмов, в случае отсутствия солей бактерии могли бы погибнуть из-за возникшего осмоса и движения раствора внутрь их организма.

2. Фосфатный буферный раствор (Phosphate-buffered saline) PBS: NaCl – 5,0 г/л, Na₂HPO₄ – 3,5 г/л, KH₂PO₄ – 1,5 г/л, NH₄Cl – 0,25 г/л, pH = 7,2 – 7.4. Во втором случае была приготовлена среда, pH которой доводили до оптимального для большинства микроорганизмов, также был добавлен буфер NH₄Cl – при

таком варианте кислотность среды будет постоянной, вне зависимости от естественного рН почвогрунтов.

Среды, как и в предыдущем случае, были простерилизована методом автоклавирования в течение 30 мин при 1 атмосфере и температуре 121°C.

Приготовление суспензии с микроорганизмами.

На денситометре была измерена оптическая плотность полученных культур, исходя из данных были выбраны три культуры для дальнейшего исследования.

Из трех культур с наибольшей оптической плотностью, что отражало наибольшую концентрацию биомассы, находящихся в одинаковом объеме, было отобрано по 1 мл среды с микроорганизмами и перемешано в пробирке Эппендорф объемом 5 мл. Так было создано смешанное сообщество микроорганизмов. Таким образом было приготовлено две таких смеси для вариантов двух сред.

Для удаления предыдущей среды – Ворошиловой-Диановой, в которой были выращены культуры, использовалась следующая методика. Из пробирки 5 мл было взято 1 мл жидкости, затем бактерии были отделены от среды с помощью центрифугирования в течении 10 минут, после этого жидкая среда с нефтью были удалены, а процесс повторен еще 2 раза для оставшихся 2 мл. В результате удалось выделить микроорганизмов из 3 мл смеси культуральных сред.

Осадок в виде клеток бактерий все еще содержал остатки предыдущей питательной среды, для удаления которой была произведена их отмывка: в зависимости от варианта в пробирку была залита одна из приготовленных сред, затем клетки с помощью прибора Vortex V-1-plus были перемешаны и распределены по всему объему среды и процесс с разделением сред и удаления жидкой фазы был повторен. После чего из отделенных бактерий были приготовлены два варианта суспензий.

Получившиеся суспензии были инокулированы по 0,3 мл с помощью шприца в 16 флаконов с экспериментами, согласно схеме. После чего флаконы были убраны в термостат. На этом создание условий для эксперимента завершилось.

Следующим этапом эксперимента было измерение с помощью газового хроматографа (рисунок 2.7) показателей углекислого газа – как индикатора активности жизнедеятельности микроорганизмов-нефтедеструкторов.



Рисунок 2.7 – Прибор-хроматограф «Кристалл- 2000М»

В ходе работ был применен метод хроматографии – метод разделения смесей веществ или частиц, основанный на различии в скоростях их перемещения в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз [8].

Сами измерения были произведены на хроматографе «Кристалл- 2000М», который имел в своем составе колонку с сорбентом – трубку, в объеме которой осуществляется хроматографическое разделение смеси вещества [8].

В результате измерения получилась хроматограмма – функция концентрации исследуемого компонента [8], в данном случае углекислого газа, на выходе из колонки.

Принцип анализа углекислого газа в пробах состоял в следующем: шприцом из флаконов отбирались пробы воздуха по 0,5 мл и вводились в начало колонки. Такие компоненты воздушной смеси, как кислород и азот, не задерживались в колонке и давали быстрый результат на выходе в виде высокого пика на хроматограмме, следующим пиком, который появлялся позже первого, так как компонент в большей степени был задержан сорбентом, был пик, отражающий содержание углекислого газа.

Данные представляли – высоту пика CO_2 при измерении на газовом хроматографе в условных единицах, которые с помощью поправочного коэффициента равного 0,0007 были пересчитаны в «объемные %».

Глава 3 Результаты практической части и выводы

3.1 Описание результатов получения культур бактерий-нефтедеструкторов

Оценка жизнедеятельности бактерий давалась согласно следующим критериям:

1. Прозрачность среды – рост микроорганизмов оценивался с помощью измерения оптической плотности жидкой среды, значения которой отражали концентрацию бактерий в объеме;
2. Визуальная оценка роста в среде, состояние нефтяной пленки, степень ее разложения;
3. Образование осадка на дне из клеток микроорганизмов.

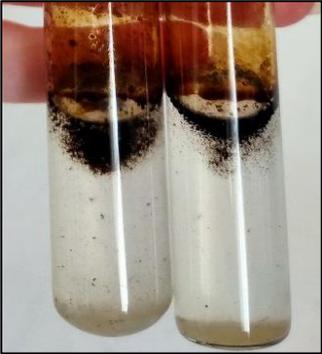
Было произведено 4 посева микроорганизмов, для получения наиболее чистых и обильных количеств необходимых бактерий. Перед каждым посевом все пробы количественно и качественно описывались и выбирались наилучшие – с визуально заметным разложением пленки нефти и с наибольшим значением оптической плотности при $\lambda = 565 \pm 15$ нм (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Результаты оптической плотности посевов

Дата		17.02.22		24.02.22		03.02.22		10.03.22
П1	П1-1	1,14	П1-2.1	0,65	П1-2.1.1	0,43	П1-2.1.1.1	1,12
	П1-2	1,11	П1-2.2	0,66	П1-2.1.2	0,48	П1-2.1.1.2	0,8
П5	П5-1	0,64	П5-1.1	0,34	П5-1.2.1	0,64	П5-1.2.1.1	0,58
	П5-2	0,25	П5-1.2	0,61	П5-1.2.2	0,33	П5-1.2.1.2	0,32
			П5-2	4,41	П5-2.1	1,08	П5-2.1.1	0,58
					П5-2.2	0,72	П5-2.1.2	0,63
П6	П6-1	0,78	П6-2.1	0,56	П6-2.1.1	1,21	П6-2.1.1.1	0,41
	П6-2	1,17	П6-2.2	0,52	П6-2.1.2	0,54	П6-2.1.1.2	0,45

Конечный результат выглядел следующим образом (таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Описание характеристик среды с микроорганизмами и нефтью в пробирках с посевом

Номер пробы	Визуальные наблюдения	Фото	Оптическая плотность среды (после встряхивания) 24.03.22
П1-2.1.1.1	Белесый осадок, в пленке толстые сгустки, рост в пленке, хорошо заметное разложение нефти		2,24
П1-2.1.1.2	Белесый осадок, рост в пленке и под ней, в толще - продукты разложения		1,08
П5-2.1.1	Образование белесой пленки, нет сплошной пленки из нефти, осадок, крупинки нефти		0,40
П5-2.1.2	Образование белесой пленки, нет сплошной пленки из нефти, осадок, крупинки		0,38
П5-1.2.1.1	Небольшой осадок, заметен рост в пленке		0,39
П5-1.2.1.2	Небольшой осадок, заметен рост в пленке и толще среды, белесая пленка – продукт разложения		0,55
П6-2.1.1.1	Осадок, заметен рост в пленке, разложение пленки нефти		0,24
П6-2.1.1.2	Осадок, хорошо заметное разложение пленки, рост заметен		0,28

Перед микроскопированием бактерии были выделены из среды посредством центрифугирования (рисунок 3.1).

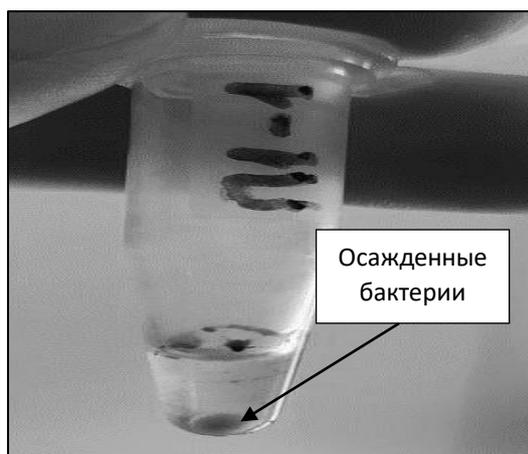


Рисунок 3.1 – Пробирка с разделенными средой и бактериями

На фото представлена микропробирка после разделения сред, все бактерии в данном случае собраны в осадке для легкого отделения питательной среды, содержащей нефть, которая могла помешать визуальным наблюдениям через микроскоп. Результаты микроскопирования показаны на рисунках 3.2, 3.3, 3.4, 3.5.

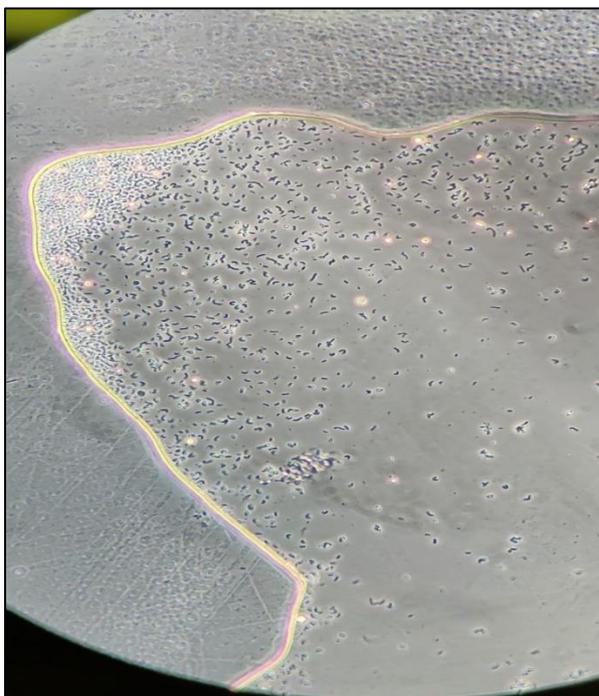


Рисунок 3.2 – Микроорганизмы-нефтедеструкторы в пробе П1-2.1.1.1

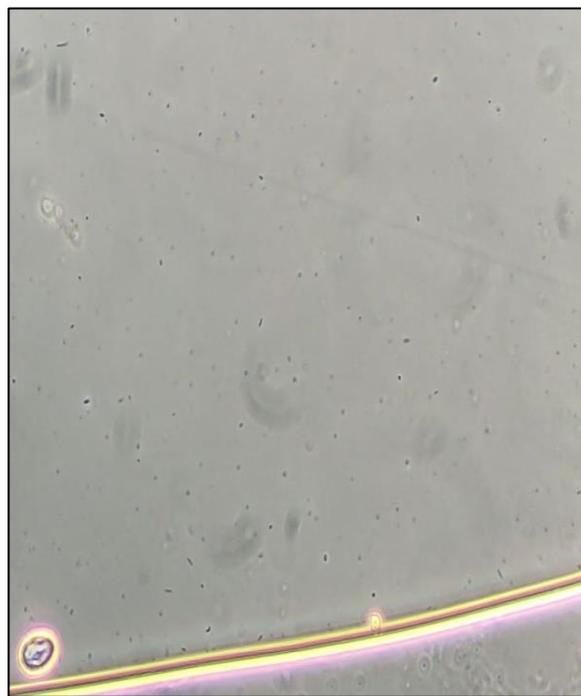


Рисунок 3.3– Микроорганизмы-нефтедеструкторы в пробе П5-1.2.1.1

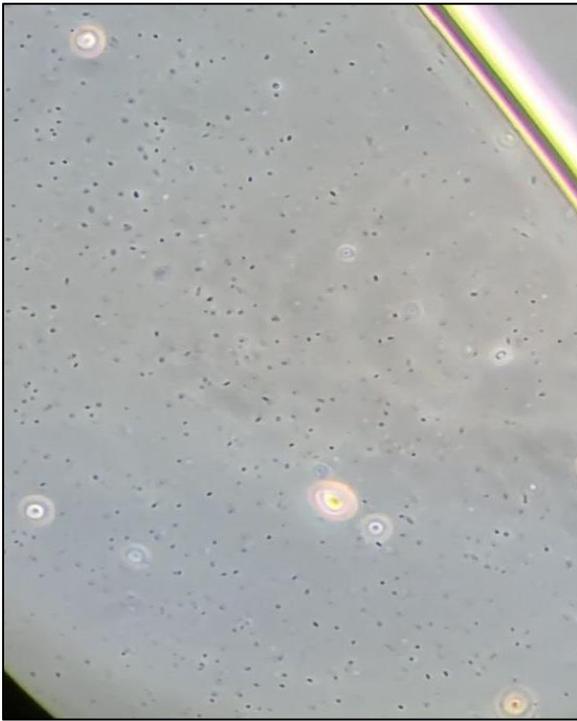


Рисунок 3.4 – Микроорганизмы-нефтедеструкторы в пробе П5-2.1.1

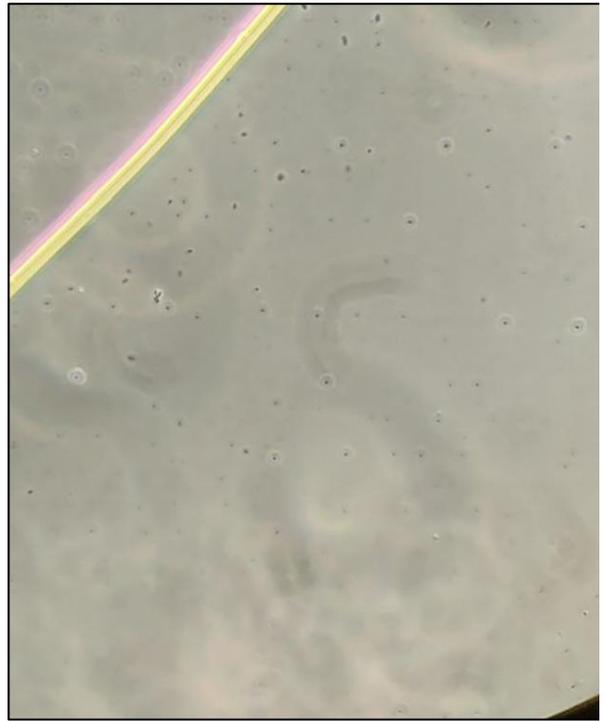


Рисунок 3.5 – Микроорганизмы-нефтедеструкторы в пробе П6-2.1.1.2

Анализируя изображения, можно говорить о том, что наибольшая концентрация микроорганизмов наблюдалась в пробе П1, наименьшая в пробе П6. Содержание нефтепродуктов в исходных пробах было следующим: П1 – 5,5 г/кг, П5 – 19,1 г/кг, П6 – 1,5 г/кг. В пробе П1 было сильное загрязнение нефтью, но меньше, чем в пробе П5, что по-видимому, обеспечило наиболее благоприятные условия для жизнедеятельности нефтеразлагающих бактерий. Можно предположить, что при сильном загрязнении, как в пробе П5, нефтедеструкторы испытывали трудности с ростом и развитием, что затруднило их размножение. В случае небольшого загрязнения – П6, значительного роста не отмечалось.

3.2 Описание результатов проведения эксперимента

Результат активности жизнедеятельности оценивался по количеству выделившегося углекислого газа, как продукта метаболизма бактерий.

В качестве материала была использована почва того же объекта исследования, но взятая из другой точки. Характеристика используемой пробы также представлена в таблице 2.1. В пробе П 4 содержание нефти оценивается в 3,5 г/кг, что говорит о высокой степени загрязнения.

Для приготовления суспензий с микроорганизмами пробы с выращенными культурами еще раз были качественно и количественно описаны (оптическая плотность измерялась при $\lambda = 565 \pm 15$ нм) и сравнены между собой для выделения наилучших. Описательная характеристика представлена в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Характеристика проб с целью отбора микроорганизмов для эксперимента

Номер пробы	Визуальные наблюдения	Фото	Оптическая плотность среды (после встряхивания) 21.04.22
П1-2.1.1.1	Есть осадок, среда мутная, в пленке толстые сгустки, рост в пленке, хорошо заметное разложение нефти		5,69
П1-2.1.1.1*	Есть осадок, хорошо заметное разложение нефти		0,96
П5-2.1.1	Есть осадок, присутствуют крупинки и пузырьки разложившейся нефти		0,61
П5-1.2.1.2	Есть осадок, хорошо заметное разложение нефти, присутствуют крупные, но в большинстве мелкие крупинки разрушенной нефти, среда замутнена		0,78
П6-2.1.1.1	Есть осадок, хорошо заметное разложение пленки нефти – при встряхивании равномерная взвесь продуктов разложения, рост заметен, среда замутнена		0,63

По морфологическим признакам, отражающим степень разложения нефти, а также по показателям оптической плотности образцов было отобрано три пробы: П1-2.1.1.1, П5-1.2.1.2 и П6-2.1.1.1.

После чего были приготовлены варианты суспензий, схема представлена на рисунке 3.6.

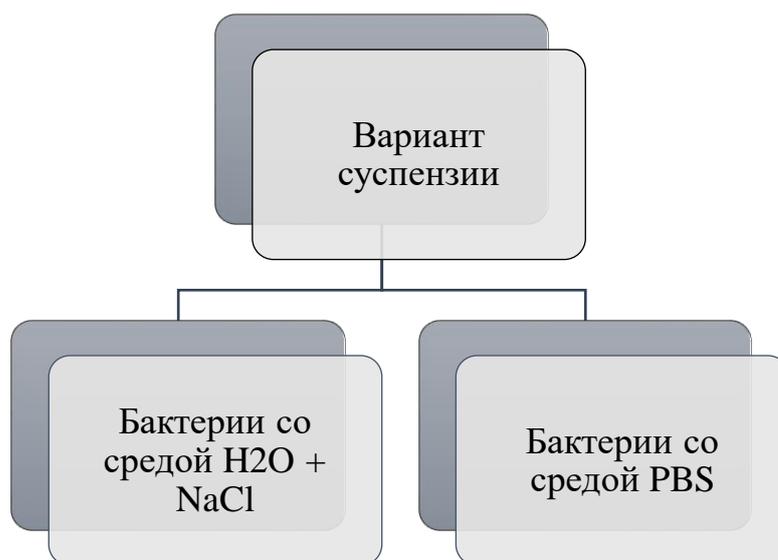


Рисунок 3.6 – Характеристика вариантов суспензий, инокулируемых в пробирки с экспериментами

После 5 дней инкубирования пробирок были получены данные, которые отразили высоту пика CO_2 при измерении на газовом хроматографе (таблица 3.4).

Таблица 3.4 – Содержание CO_2 (в объемных процентах)

Среда	+ Бактерии	+ Почва	+ Почва + Бактерии
H_2O -нефть	$0,152 \pm 0,014$	$1,363 \pm 0,146$	$1,617 \pm 0,172$
H_2O +нефть	$0,181 \pm 0,030$	$2,290 \pm 0,111$	$2,236 \pm 0,060$
PBS-нефть	$0,216 \pm 0,010$	$2,382 \pm 0,135$	$2,072 \pm 0,021$
PBS+нефть	$1,594 \pm 0,098$	$3,213 \pm 0,244$	$3,894 \pm 0,123$

Для дальнейшего анализа данные были преобразованы в графический вид (рисунок 3.7).

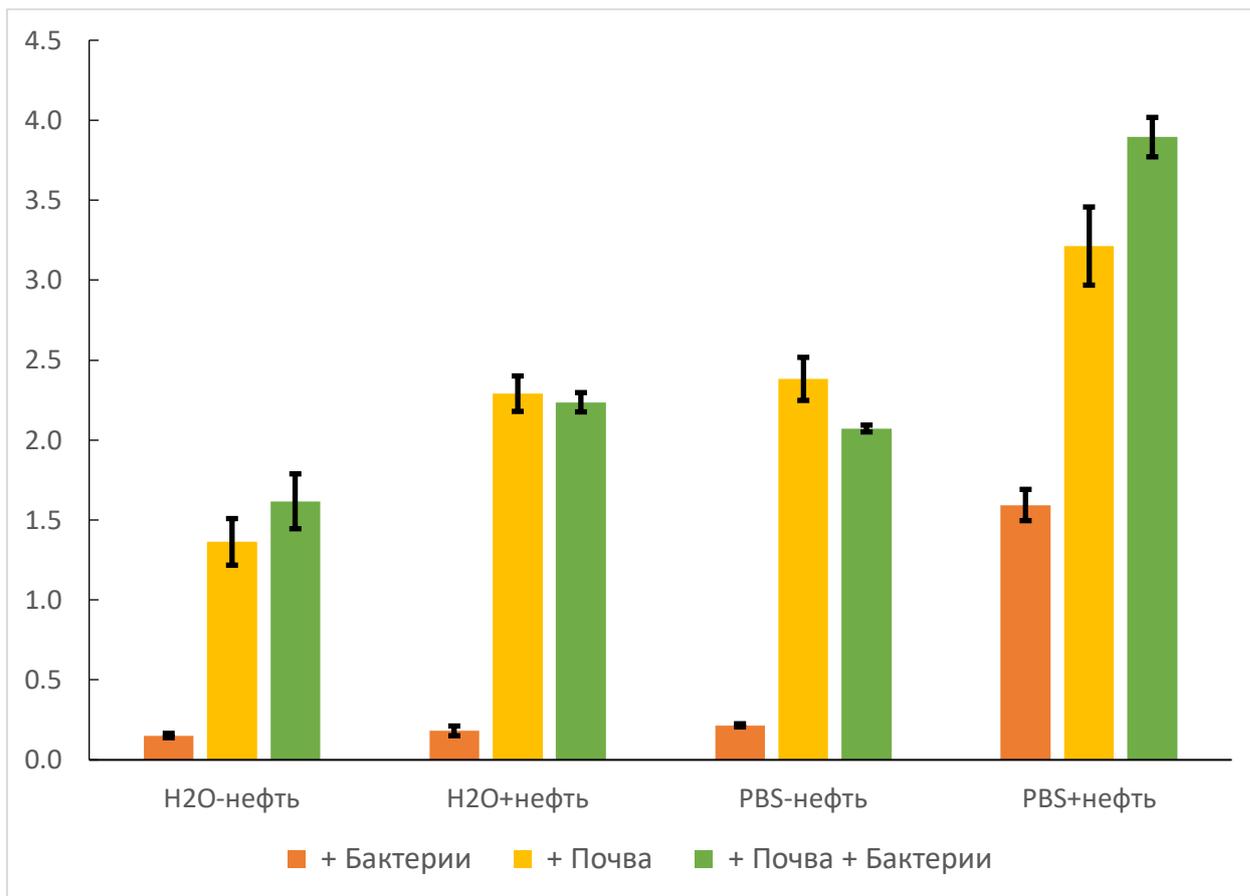


Рисунок 3.7 – Содержание CO_2 (в объемных процентах) в различных вариантах и комбинациях эксперимента

1. Первый вариант эксперимента представлял собой водную среду с добавлением соли NaCl , с естественным pH и без добавления нефти как субстрата для окисления.

1) + бактерии – выделение CO_2 оказалось небольшим, причина тому отсутствие органических веществ для бактериального окисления;

2) + почва – заметно большее выделение CO_2 , это можно объяснить присутствием и жизнедеятельностью аборигенной микрофлорой почвы, а также за счет десорбции запасенного в почве CO_2 ;

3) + почва + бактерии – количество CO_2 в пределах вариации измерения такое же, как и в предыдущем случае.

2. Вторым вариантом представлял собой ту же самую водную среду с добавлением соли NaCl, с естественным pH, но с добавлением нефти – субстрата для окисления.

1) + бактерии – внесенные бактерии не разрушали нефть, как видно из графика – объемный процент CO₂ низкий, причиной могла стать нехватка питательных веществ (азота, фосфора);

2) + почва – в данном случае высокое значение в объемного процента CO₂ были достигнуты за счет разрушения органического вещества «аборигенной микрофлорой», а также за счет десорбции запасенного в почве CO₂;

3) + почва + бактерии – значение в пределах погрешности равно предыдущему варианту без бактерий, из чего можно сделать вывод, что бактерии в данном случае не были эффективными.

3. В третьем случае была использована среда фосфатный буферный раствор, с постоянным pH = 7,2 – 7.4 и без добавления нефти.

1) + бактерии – бактерии также не работали из-за отсутствия органического вещества;

2) + почва – большее выделение CO₂, это можно объяснить присутствием и жизнедеятельностью аборигенной микрофлорой почвы, а также за счет десорбции запасенного в почве CO₂;

3) + почва + бактерии – количество CO₂ в пределах вариации измерения такое же, как и в предыдущем случае.

4. В последнем варианте был также фосфатный буферный раствор, с постоянным pH = 7,2 – 7.4, но с добавлением нефти.

1) + бактерии – заметна значительная разница в сравнении с предыдущими вариациями, содержание CO₂ (в объемных процентах) высокое из чего можно заключить, что для размножения бактерий данные условия оказались благоприятными;

2) + почва – еще большее увеличение CO_2 обусловлено разрушением нефти аборигенной микрофлорой, а также за счет десорбции запасенного в почве CO_2 ;

3) + почва + бактерии – самые высокие значения CO_2 были отмечены при разрушении нефти аборигенной микрофлорой совместно с внесенными бактериями.

Анализируя итоги эксперимента, можно говорить о том, что внесенные бактерии работали эффективно только в среде фосфатного буферного раствора, содержащий питательные вещества (азот, фосфор), а также с постоянным $\text{pH} = 7,2 - 7,4$, что оказалось оптимальными условиями для выделенных мезофильных бактерий. По-видимому, в почвах исследуемого района недостаточно питательных веществ, обеспечивающих эффективную работу выделенных нефтеструктуров.

Жизнедеятельность аборигенных микроорганизмов также была отмечена и подтверждена высокими значениями CO_2 – в данной почве также присутствуют другие бактерии, способные питаться и тем самым разрушать углеводороды. Из чего можно предположить, что потенциал к биоремедиации есть, поэтому необходимы дальнейшие исследования присутствующих микроорганизмов.

Но также при совместной работе выращенных в лаборатории нефтеструктуров и местной биоты очищение территорий от загрязнения нефтью будет происходить быстрее и эффективнее. Это подтверждают наибольшие значения концентрации углекислого газа, зафиксированные при их комбинированной работе.

Заключение

Таким образом, в данной работе были достигнуты следующие задачи:

1. Используя отечественные и зарубежные источники был сделан обзор имеющихся на данный момент знаний по теме биологического метода очищения и восстановления почв от нефтяного загрязнения с использованием микроорганизмов-нефтедеструкторов. Данный метод на практике может быть реализован разными способами: обработка почв «вне места» и обработка «на месте», которая в свою очередь может подразделяться на способ с применением специальных препаратов, содержащих бактерии, и на способ активизации естественных биоценозов.

Преимуществами рассматриваемого метода является его дешевизна, биологическая основа – близкое к естественному разрушение нефти и ее компонентов до безвредных веществ, а также возможность проводить работы на месте. Недостатками является то, что при высоких уровнях загрязнения данный метод не является эффективным, а также требует создания оптимальных условий для активной работы микроорганизмов, так как условия окружающей среды могут быть неблагоприятными для их жизни.

2. В практической части работы был получен опыт работы с микроорганизмами в лабораторных условиях, а именно, выращивание бактерий и постановка эксперимента с целью изучения их эффективности для восстановления почвогрунтов железной дороги г. Пушкина, загрязненных нефтью. Выделенные микроорганизмы были естественными популяциями для исследуемых образцов. В данном случае бактерии работали наилучшим образом в смоделированных в лаборатории условиях с достатком питательных веществ, оптимальной соленостью и рН среды, но испытывали трудности в условиях, приближенных к естественным. В модельных условиях, близким к природным, бактерии не проявили большой эффективности в разрушении нефти.

На работу бактерий может влиять множество факторов, например, в исследуемых техногенных почвах могло оказаться недостаточное содержание макроэлементов таких, как фосфор, азот, сера, и макроэлементов таких, как медь, никель. Климат Ленинградской области будет обеспечивать таких бактерий оптимальной температурой в летние месяцы, в остальное время их работа будет затруднена. Для успешной биоремедиации исследуемых почвогрунтов г. Пушкина возможно необходимо обеспечить дополнительную стимуляцию жизнедеятельности выделенных микроорганизмов с помощью добавки удобрений с питательными веществами. Для проверки данных предположений нужны дальнейшие исследования свойств и состава почв территорий Ленинградской области, в том числе определение содержания в них различных элементов.

3. Важным шагом применения бактерий для очистки территорий является разработка препаратов на основе микроорганизмов, которые будут возможно вносить на загрязненные площадки, а также создание для их эффективной работы необходимых условий. К числу последних относится: обеспечение почвенных организмов дополнительными питательными веществами, создание оптимального рН, для территорий Ленинградской области повышение рН почв, а также проведение работ в летнее время, когда температурный интервал будет оптимален для активной жизнедеятельности рассматриваемых бактерий.

Биологическое очищение почв является по своей сути наиболее близким к естественным процессам, не требует больших затрат энергии, труда и денежных средств, но стоит учитывать, что такой метод подойдет в большинстве для локальных разливов с небольшим уровнем загрязнения, как, например, для рассматриваемых в работе почвогрунтов железнодорожных путей.

Список использованной литературы

1. Методические рекомендации по выявлению деградированных и загрязненных земель от 15.02.1995г [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/902101153>. – (Дата обращения: 20.05.2022)
2. Письмо Министерства охраны окружающей среды и природных ресурсов РФ от 27.12.1993г. №04-25-61-5678 «О порядке определения размеров ущерба от загрязнения земель химическими веществами» [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/9033369>. – (Дата обращения: 20.05.2022)
3. Байчоров Р.А. Действие нефти и нефтепродуктов на свойства почв и продуктивность растений [Электронный ресурс] // E-Scio. – 2020. – 6 с. Режим доступа: <https://e-scio.ru/wp-content/uploads/2020/02/Байчоров-Р.-А.pdf> – (Дата обращения: 18.05.2022)
4. Бочарикова Е.А. Влияние нефтяного загрязнения на свойства серобурых почв Апшерона и серых лесных почв Башкирии: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1990. – 16 с.
5. Быкова М.В. Оценка нефтезагрязненности почв производственных объектов различных почвенно-климатических зон Российской Федерации / М.В.Быков, М.А.Пашкевич // Известия ТулГУ. Науки о Земле. – 2020. – Вып.1 . – С. 46-59
6. Волкова Е. Н. Поиск мезофильных нефтеразрушающих почвенных бактерий на месте несанкционированной свалки на окраине г. Санкт-Петербурга / Теория и практика современной аграрной науки: Сб. III национальной (всероссийской) научной конференции с международным участием (г. Новосибирск, 28 февраля 2020 г.): Т.1 / Новосиб. гос. аграр. ун-т. – Новосибирск: ИЦ НГАУ «Золотой колос», 2020. – 402-406с.
7. Ворошилова А.А., Дианова Е.В. Окисляющие нефть бактерии – показатели интенсивности биологического окисления нефти в природных условиях // Микробиология, 1952. – Т. 21. – №4. – С. 408-415

8. Даванков В.А. Хроматография. Основные понятия. Терминология: сб. научно-нормативной терминологии. Вып. 114. М.: Комитет по научной терминологии РАН, 1997. – 23 с.
9. Долматова Е.С. Микроорганизмы в почвенной нефтепереработке [Электронный ресурс] // VII Международная студенческая научная конференция – Владивосток, 2015. – 24 с. Режим доступа: <https://scienceforum.ru/2015/article/2015010201> – (Дата обращения: 15.05.2022)
10. Егорова Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии, 3-е изд., перераб. И доп. – М.: Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.
11. Журавлева А.С. Термофильные углеводородоокисляющие почвенные бактерии из контрастных природно-климатических зон: дис. ... канд. биол. наук, СПб., 2022. – 152 с.
12. Колесников С.И., Казеев К.Ш. и др. Влияние загрязнения нефтью и нефтепродуктами на биологическое состояние чернозема обыкновенного // Почвоведение. – 2006. – №5. – С. 616-620
13. Корольченко Д. А. Современные биоремедиационные технологии // Пожаровзрывобезопасность. – Т. 16. – №5. – 2007. – С. 75-78
14. Назаренко Е.Б., Гамсахурдия О.В. Биологическая рекультивация техногенных ландшафтов // Лесной вестник. – №4. – 2013. – С. 183-186
15. Пестряков В. К. Почвы Ленинградской области [Текст] / Под ред. канд. с.-х. наук В. К. Пестрякова. – Ленинград: Лениздат, 1973. – 344 с.
16. Привалова Н.М. Воздействие нефти и нефтепродуктов на окружающую среду // Научный журнал КубГАУ. – №125(01). – 2017. – 10 с.
17. Смольникова В.В., Емельянов С.А., Дементьев М.С. Воздействие углеводородов нефти на окружающую среду и способы очистки нефтезагрязненных субстратов // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2009. – С.1378-1380
18. Смольникова В.В., Дементьева Д.М., Дементьев М.С. Особенности биоремедиации нефтезагрязненных почв // Землепользование. – 2011. – С. 1219-1221

19. Ступин Д.Ю. Загрязнение почв и новейшие технологии их восстановления: Учебное пособие. – СПб: Издательство «Лань», 2009. – 432 с.
20. Янкевич М.И. Биоремедиация почв вчера, сегодня, завтра / М.И. Янкевич, В.В. Хадеева, В.П. Мурыгина // Биосфера. – 2015. – С. 199-208
21. Стратегия развития транспортной системы Санкт-Петербурга и Ленинградской области на период до 2030 года, Санкт-Петербург, – 2016 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://spbtrd.ru/documents/Стратегия_2016.pdf – (Дата обращения: 15.05.2022)
22. Климат г. Пушкина (Российская Федерация) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://ru.climate-data.org/азия/россииская-федерация/санкт-петербург/пушкин-8557/>. – (Дата обращения: 20.05.2022)
23. Anum Ali Ahmad, Tariq Shah, Qudratullah Kalwar, Ishaq Muhammad Remediation Methods of Crude Oil Contaminated Soil // World Journal of Agriculture and Soil Science – 2020. – P. 1-8
24. Commoner B. The Closing Circle: Nature, Man, and Technology N. Y.: Alfred A. Knopf, 1971. – 326 p.
25. Gilavand F., Marzban A., Ebrahimipour G., Karkhane M. Investigation of hydrocarbon bio removal by the indigenous bacteria isolated from crude oil contaminated soil // Journal of microbiology, biotechnology and food sciences. – 2015. - P. 212-215. DOI:10.15414/jmbfs.2015/16.5.3.212-215 – (Дата обращения: 16.05.2022)
26. Patel V., Kamlesh shah Petroleum Hydrocarbon pollution and its Biodegradation // International Journal of Chemtech Applications Vol. 2; Issue 3. – 2013. – P. 63-80