

Стимуляция аборигенных анаэробных микроорганизмов для восстановления геологической среды, загрязненной нефтепродуктами

И. В. ТРУСЕЙ^{1, 2}, Ю. Л. ГУРЕВИЧ², В. П. ЛАДЫГИНА², С. В. ФАДЕЕВ³, Ю. П. ЛАНКИН²

¹Красноярский государственный педагогический университет им. В. П. Астафьева
660049, Красноярск, ул. Ады Лебедевой, 89
E-mail: trusey@list.ru

²Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН»
660036, Красноярск, Академгородок, 50

³ООО Минусинская гидрогеологическая партия
662621, Красноярский край, Минусинский р-н, с. Селиваниха, ул. Заречная, 3г

Статья поступила 16.01.2020

После доработки 18.06.2020

Принята к печати 12.08.2020

АННОТАЦИЯ

Проведена оценка изменения численности анаэробных микроорганизмов (денитрифицирующие, сульфат- и железоредуцирующие) по числу КОЕ в грунтах и грунтовых водах, загрязненных нефтепродуктами, при проведении биоремедиационных мероприятий. Выявлено, что в исследуемой геологической среде численность психрофильных анаэробных микроорганизмов на порядок выше, чем соответствующих эколого-трофических мезофильных групп. Чувствительность психрофильных микроорганизмов к внесению соединений, содержащих азот, фосфор и калий, существенно выше. При внесении минеральных элементов питания в зону загрязнения численность психрофильных микроорганизмов изменялась значительнее как в положительную, так и в отрицательную сторону. При обработке грунтов зоны аэрации численность анаэробных микроорганизмов снизилась, а аэробных углеводородоокисляющих и аммонифицирующих микроорганизмов увеличилась на один порядок и составила 10^6 КОЕ/г и 10^6 – 10^7 КОЕ/г соответственно. При внесении удобрений в грунтовые воды численность анаэробных микроорганизмов увеличивалась на 1–4 порядка, численность денитрифицирующих достигала 10^5 КОЕ/мл, сульфатредуцирующих – 10^3 – 10^4 КОЕ/мл, железоредуцирующих – 10^2 – 10^3 КОЕ/мл. Обнаружено, что в грунтовых водах одновременно с увеличением численности изменялись химические показатели, свидетельствующие об интенсификации разложения нефтепродуктов. В частности, наблюдали увеличение концентрации ионов аммония и нитрата, обусловленное разложением нефтепродуктов, нитрификацией и денитрификацией, а также изменение концентрации ионов гидрокарбоната и сульфата, обусловленное сульфатредукцией.

Ключевые слова: биоремедиация, грунтовые воды, нефтепродукты, психрофильные микроорганизмы, денитрифицирующие, сульфатредуцирующие, железоредуцирующие.

Загрязнение геологической среды углеводородной деятельностью человека, начиная с добычи нефти и заканчивая транспорти-

ровкой и хранением нефтепродуктов [Delin et al., 1998; Хаустов и Редина, 2012]. Для восстановления природных объектов, загрязненных углеводородами, наиболее экологичными и экономичными признаны методы биоремедиации [Fjordbøge, 2011]. В случае восстановления загрязненной геологической среды эти методы приобретают особую важность, поскольку удалить нефтепродукты из грунтов и грунтовых вод, используя только механические и физико-химические методы, невозможно.

В основе биоремедиации лежит стимулирование роста аборигенных и интродуцируемых в зону загрязнения в виде биопрепаратов микроорганизмов, являющихся деструкторами углеводородов. На участках с длительным сроком углеводородного загрязнения аборигенная микрофлора, как правило, представлена разнообразием деструкторов, способных к биодegradации широкого спектра загрязняющих веществ [Жуков и др., 2006; Брянская и др., 2014; Филатов и др., 2019]. Скорость биодegradации зависит от компонентного состава и концентрации загрязнителя, а также условий среды [Mohajeri et al., 2017]. Сырая нефть окисляется быстрее, чем ее тяжелые фракции (нефтепродукты). Высокие концентрации загрязнителя, особенно если они содержат токсичные компоненты, ингибируют рост микрофлоры.

Для стимуляции микроорганизмов-деструкторов в загрязненные зоны вносят минеральные элементы питания, главным образом источники N-, P- и K-элементов, недостаток которых тормозит процессы восстановления нарушенной среды [Sarkar et al., 2016]. Концентрация вносимых биогенных элементов должна быть сбалансированной с концентрацией органического загрязнителя. На практике выполнить это условие проблематично. Так, оптимальным соотношением C : N : P для биоремедиации почвы, загрязненной нефтью, ряд авторов считают 100 : 10 : 1 [Hazen, 2010; Woliska, Borkowski, 2012]. В других исследованиях задаваемая доля N-, P-соединений значительно выше [Фахрутдинов и др., 2003; El-Gendy, Farah, 2011]. В аэробных условиях на окисление 1 г нефти микроорганизмами требуется 40–80 мг азота и 4–8 мг фосфора [Фахрутдинов и др., 2003]. В то же время в работе [Терещенко, 2007] показано, что максимальным величинам численности микро-

организмов в нефтезагрязненной почве соответствовали более низкие стартовые дозы удобрений (150 кг/га). Для подземных экосистем и анаэробных процессов биодegradации загрязнений оценки потребностей в биогенных элементах исследованы слабо. В связи с чем подбор доз минеральных элементов и оценка эффективности биостимуляции для данных экосистем актуальны.

Биодegradация нефтепродуктов в геологической среде также ограничена низкой температурой (+4 ... +7 °C) и окислительно-восстановительным потенциалом среды. Например, за 13 лет деструкция сырой нефти в грунтовых водах составила 46 % [Delin et al., 1998]. Если самоочищение имеет экспоненциальный характер, тогда удаление 80–90 % загрязнения произойдет за 34 и 49 лет соответственно. В условиях низких температур возрастает вклад в восстановление нарушенной среды психрофильных эколого-трофических групп микроорганизмов, которые активны в разных диапазонах окислительно-восстановительного потенциала.

Цель настоящего исследования – оценка численности по числу КОЕ психрофильных и мезофильных анаэробных микроорганизмов (денитрифицирующих, сульфатредуцирующих, железоредуцирующих) и возможности стимуляции их роста для восстановления геологической среды, загрязненной нефтепродуктами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовали геологическую среду (грунты зон аэрации и насыщения, грунтовые воды) в районе хранилища нефтепродуктов на территории Абаканской ТЭЦ (Хакасия) (рис. 1). Грунты сложены из гравийно-галечных, супесчаных пород, на поверхности которых имеется техногенный слой (0,5 м). Грунтовые воды относятся к сульфатно-гидрокарбонатному типу, их уровень изменяется в пределах 4–7 м, температура – +4 ... +8 °C. Грунты загрязнены смесью мазута, дизельного топлива, технологических масел. На начало исследования (2002 г.) на поверхности грунтовых вод наблюдалась линза нефтепродуктов мощностью 0,2–0,5 м. Биостимуляция включала внесение минеральных солей в виде удобрений в грунты зоны аэрации (на поверхность

пептонный агар (1,35 %), KNO_3 (0,5 %) и индикатор (бромтимолблау). Для учета железоредуцирующих бактерий использовали среду: NaHCO_3 (0,25 %), KCl (0,01 %), NH_4Cl (0,15 %), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,06 %), $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,01 %), цитрат Fe^{3+} (0,5 %). Для учета сульфатредукторов – среду Баарса (г/л): NH_4Cl – 1,0; KH_2PO_4 – 0,5; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; лактат Na (70 %) – 3,5; вода водопроводная.

Химический анализ грунтовой воды проводили по стандартным методикам на фотометре КФК-3. Содержание нефтепродуктов определяли флуориметрически (Флуорат-02-2М). Для анализа изменений данных гидрохимического состава грунтовых вод использовали нейронную сеть, реализованную в виде пакета расширения Microsoft Excel [Lankin et al., 2006]. Сеть обучалась на основе алгоритма двойственного функционирования для выявления динамики изменения содержания в воде ионов сульфата и гидрокарбоната, которые характерны для процесса сульфатредукции.

В исследуемых грунтах были обнаружены мезофильные и психрофильные денитрификаторы, железо- и сульфатредуцирующие бактерии. Распределение численности бактерий в грунте по исследуемым горизонтам зоны аэрации приведено в табл. 2. До внесения минеральных элементов питания численность психрофильных бактерий анаэробной группы зависела от глубины отбора проб. Зона роста мезофильных денитрификаторов приурочена к горизонтам 2 (1,0–1,2 м) и 3 (1,9–2,3 м), железоредуцирующих – 3 (1,9–2,3 м) и 4 (2,9–3,2 м), а сульфатредуцирующих – 5 (3,9–4,2 м) и 6 (4,9–5,1 м). Зоны роста психрофильных анаэробных групп бактерий смещены по глубине и приурочены к горизонтам 3–4, 3–5 и 6 соответственно. Такое распределение зон активного роста этих эколого-трофических групп соответствует зависимости процессов денитрификации, восстановления железа и сульфатредукции от окислительно-восста-

Т а б л и ц а 2
Число КОЕ анаэробных микроорганизмов в грунтах, загрязненных нефтепродуктами, при внесении биогенных элементов

Температурная группа	Эколого-трофическая группа	Численность, 10^3 КОЕ/г					
		0,05–0,2	1,0–1,2	1,9–2,3	2,9–3,2	3,9–4,2	4,9–5,1
		Глубина горизонта, м					
		1	2	3	4	5	6
До обработки							
Мезофильные	Денитрификаторы	16,20	48,00	47,30	41,00	25,50	15,70
	Железоредукторы	0,43	0,37	2,10	2,56	0,26	0,26
	Сульфатредукторы	0,04	0,04	0,47	0,97	4,08	7,84
Психрофильные	Денитрификаторы	10,30	2,13	99,80	97,40	45,90	3,66
	Железоредукторы	0,04	0,16	0,99	0,97	0,97	0,31
	Сульфатредукторы	н.о.	0,04	0,47	0,21	0,31	4,70
После обработки							
Мезофильные	Денитрификаторы	1,04	–	0,26	0,30	0,46	11,50
	Железоредукторы	1,64	–	0,10	0,09	0,07	н.о.
	Сульфатредукторы	0,08	–	0,03	0,04	0,09	0,09
Психрофильные	Денитрификаторы	1,04	–	0,26	н.о.	н.о.	0,16
	Железоредукторы	+	–	+	+	+	+
	Сульфатредукторы	0,10	–	0,21	0,06	0,11	0,42

П р и м е ч а н и е. н.о. – не обнаружено; + – наличие роста, прочерк – не определяли.

новительного потенциала среды [Franzmann et al., 2002; Паничева и др., 2012].

При внесении раствора удобрений на поверхность загрязненного участка численность (по числу КОЕ) анаэробных бактерий в грунтах зоны аэрации снизилась на 1–2 порядка. Более значительное снижение численности зафиксировано среди психрофильных форм, численность денитрификаторов снизилась до $10\text{--}10^2$ КОЕ/г, в некоторых образцах их вообще не обнаружили, так же как и железоредуцирующих. Численность сульфатредуцирующих бактерий немного снизилась, но порядок не изменился (10^2 КОЕ/г, $p \geq 0,05$). В отличие от анаэробных микроорганизмов, численность аэробных – аммонифицирующих и углеводородокисляющих – после обработки в грунтах зоны аэрации увеличилась на порядок ($p < 0,05$). Численность психрофильных аммонификаторов достигла $10^6\text{--}10^7$ КОЕ/г, а мезофильных и психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов – 10^6 КОЕ/г.

В грунтовых водах при внесении минеральных солей наблюдали увеличение численности практически всех исследуемых групп микроорганизмов. Титр КОЕ аэробных углеводородокисляющих микроорганизмов вырос на 1–2

порядка (до 10^7 КОЕ/мл), аммонифицирующих – на 2–3 порядка (до 10^8 КОЕ/мл) [Трусей и др., 2017]. Обращает на себя внимание отсутствие мезофильных денитрификаторов, в то время как психрофильные обнаружены во всех образцах воды (табл. 3). При внесении минеральных элементов их численность увеличилась на 1–4 порядка и достигла 10^5 КОЕ/мл. Увеличение численности денитрификаторов на 1–2 порядка также отмечали в образцах воды из скважин, в которые удобрения не вносили (напр., скв. 589, см. табл. 3). Численность сульфатредуцирующих бактерий варьировала в пределах $10\text{--}10^3$ КОЕ/мл. После обработки в отдельных скважинах она увеличилась на 1–2 порядка. Относительно низкая численность железоредуцирующих бактерий в грунтовых водах ($10^2\text{--}10^3$ КОЕ/мл) не изменилась после внесения удобрений ($p \geq 0,05$) (данные не приведены).

Одновременно с увеличением численности микроорганизмов наблюдали противофазное изменение содержания аммония и нитрата в грунтовых водах [Трусей и др., 2017]. Особенно четко это было выражено на границе загрязненной области – в скв. 237. Через 5 месяцев после внесения биогенных элементов

Т а б л и ц а 3
Число КОЕ денитрифицирующих и сульфатредуцирующих бактерий в грунтовой воде

Температурная группа	Номер скважины	2005 июнь	2005 октябрь	2006 май	2006 октябрь	2007 март	2010 август
Денитрифицирующие, КОЕ·10 ³							
Мезофильные	159	н.о.*	45,00	0,07	95,00	–	0,09
	237	н.о.	200,00	0,15	1,50	0,11	н.о.
	589	н.о.	–	0,06	0,14	0,07	0,06
	588*	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	–	н.о.
Психрофильные	159	0,01	3,05	350,00	40,00	–	0,09
	237	0,20	2,50	0,07	2,50	н.о.	–
	589	0,09	–	0,45	0,95	н.о.	0,09
	588*	–	–	–	–	н.о.	–
Сульфатредуцирующие, КОЕ·10 ²							
Мезофильные	159	15,00	15,00	0,30	4,50	–	–
	237	1,10	1,10	0,30	0,40	0,60	1,15
	238	0,70	–	1,10	3,00	0,60	0,75
	239	11,50	–	–	–	7,00	2,00
	589	1,10	–	0,30	0,90	0,90	1,60

П р и м е ч а н и е. н. о. – не обнаружено, прочерк – не определяли, * – скважина за пределами загрязненного участка.

Содержание аммония, нитрита и нитрата в грунтовых водах мазутного хозяйства ТЭЦ

Номер скважины	Формы азота	Дата отбора проб									
		29.04.2004	10.09.2004	29.04.2005	7.06.2005	26.09.2005	09.03.2006	21.04.2006	31.10.2006	29.03.2007	22.09.2007
Концентрация, мг/дм ³											
237	Аммоний	0,07	н.о.	–	10,00	н.о.	5,03	0,55	0,21	0,08	0,15
	Нитрит	н.о.	0,01	–	–	н.о.	55,43	10,95	н.о.	0,21	н.о.
	Нитрат	1,0	0,52	–	11,00	н.о.	6,90	23,42	9,71	1,11	2,22
159	Аммоний	5,14	2,04	2,55	5,00	0,45	53,42	52,29	40,50	52,29	4,42
	Нитрит	0,02	0,13	0,03	–	2,44	0,057	0,02	0,03	0,02	0,05
	Нитрат	0,44	2,52	0,34	7,80	81,10	0,57	0,82	1,54	0,88	0,83

П р и м е ч а н и е. н.о. – не обнаружено, прочерк – не измеряли.

Концентрация сульфата в грунтовых водах из наблюдательных скважин мазутного хозяйства ТЭЦ

Дата	Период исследования	Концентрация сульфата в наблюдательных скважинах, мг/дм ³							Среднее по скважинам
		159	160	237	238	239	589		
2004.04	До внесения удобрений	–	192,0	192,0	172,8	192,0	19,2	153,6 ± 93,9	
2004.09		87,8	9,6	28,8	259,2	–	41,9	85,4 ± 45,3	
2005.04	После первого внесения удобрений	–	–	48,0	355,2	220,8	0	156,0 ± 81,6	
2005.09		345,6	173,0	67,2	336,0	67,2	105,6	182,2 ± 135,0	
2006.03		28,8	0	6,2	374,4	0	38,4	74,6 ± 60,3	
2006.04		57,6	48,0	96,0	384,0	76,8	48,0	118,4 ± 53,7	
2006.10		115,2	–	144,0	144,0	144,0	124,8	134,4 ± 6,1	
2007.04	После второго внесения удобрений	–	67,0	96,0	163,2	86,4	48,0	92,1 ± 19,6	

П р и м е ч а н и е. Прочерк – не измеряли.

здесь зарегистрировано пиковое содержание нитритов – 55,4 мг/дм³ (табл. 4). Максимальные значения содержания нитрата (23,42 мг/дм³) наблюдали через 6 недель. В очаге загрязнения (область скв. 159) концентрация аммония в грунтовой воде увеличилась до 53,4 мг/дм³ и сохранялась в течение года. На периферии загрязненной области концентрация аммония колебалась в пределах 0,15–5,03 мг/дм³. Параллельно с этим происходило увеличение перманганатной окисляемости грунтовых вод с 0,11–6,00 до 1,60–11,68 мг О₂/дм³.

Содержание сульфата в загрязненных грунтовых водах изменялось от 355,2 до 41,2 мг/дм³ (табл. 5). В скважинах 239 и 160 концентрация сульфата в отдельные периоды снижалась до значений ниже порога обнаружения. Выявили, что концентрация сульфата в скв. 239 изменялась в противофазе с гидрокарбонатом. Это возможно при активной сульфатредукции в этой области (рис. 2).

Изменение содержания сульфата и гидрокарбоната в грунтовой воде проанализировали с помощью нейросети. Часть данных по концентрации ионов гидрокарбоната и сульфата в грунтовой воде из скв. 239 (2004–2007 гг.) использовали для обучения нейросети распознаванию процесса сульфатредукции. Вто-

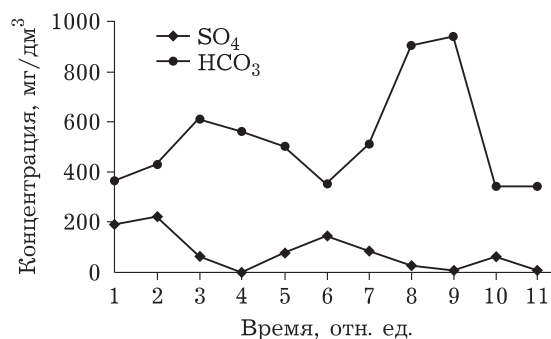


Рис. 2. Динамика концентраций сульфата и гидрокарбонат-иона в грунтовых водах скв. 239 в период с апреля 2004 г. по октябрь 2010 г.

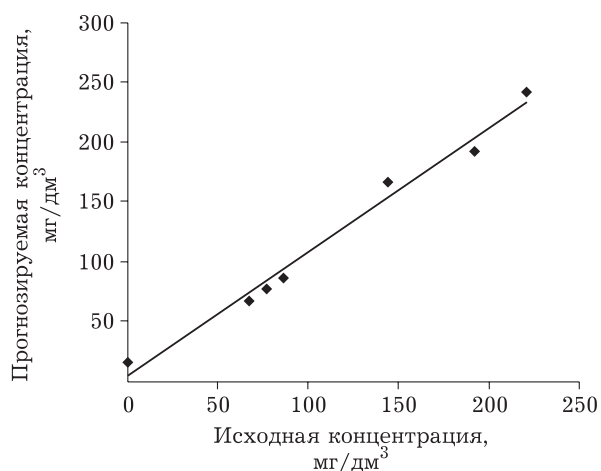


Рис. 3. Результаты обучения нейросети (по данным для наблюдательной скв. 239 за 2004–2007 гг.) для прогнозирования концентрации сульфата в грунтовых водах

рую часть данных за 2008–2010 гг. проверяли с помощью обученной нейросети. Близость контрольных точек к гипотенузе (прогнозируемая концентрация) подтверждает наличие взаимосвязи между изменением концентрации сульфата и гидрокарбоната в воде (рис. 3). Анализ массива данных по всем скважинам показал, что процесс сульфатредукции характерен не для всей зоны загрязнения и в рассматриваемый период наблюдений происходил только в области скважин 239 и 160.

Проведение биоремедиационных мероприятий привело к снижению концентрации нефтепродуктов в грунтовых водах на всем проблемном участке с 500–120 до 10–1,5 мг/дм³ [Трусей и др., 2017]. Как правило, в весенний период, когда уровень грунтовых вод низкий, содержание нефтепродуктов больше, чем осенью в период высокого уровня грунтовых вод. После наблюдаемого положительного эффекта восстановительные мероприятия на загрязненном участке продолжились. За период 2010–2018 гг. мощность линзы нефтепродуктов, расположенных на поверхности грунтовых вод, сократилась с 0,2–0,5 до 0,07 м.

ОБСУЖДЕНИЕ

В грунтах и грунтовых водах в условиях ограниченного поступления кислорода возрастает роль анаэробных процессов деградации нефтепродуктов. Их вклад в восстановление загрязненной среды достигает 60–80 %

[Essaid et al., 2011; Паничева и др., 2012; Хаустов, Редина, 2013]. Более того, в анаэробных условиях скорость разложения отдельных классов углеводородов (короткоцепочечных алифатических, ароматических) выше, чем в аэробных средах [Miller et al., 2019].

В загрязненных нефтепродуктами грунтах Абаканской ТЭЦ присутствуют как аэробные (углеводородоокисляющие и аммонифицирующие), так и анаэробные (денитрифицирующие, сульфатредуцирующие и железоредуцирующие) эколого-трофические группы микроорганизмов. Они представлены мезофильными и психрофильными температурными группами. При этом численность (определяемая по числу КОЕ) психрофильных микроорганизмов по отношению к аналогичной мезофильной эколого-трофической группе, как правило, на 1–2 порядка выше. Подобное соотношение психрофильных и мезофильных групп наблюдали и в других районах Средней Сибири [Трусей и др., 2009]. Распределение анаэробных групп микроорганизмов по глубине ассоциирует с изменением градиента окислительно-восстановительного потенциала [Franzmann et al., 2002; Паничева и др., 2012; Хаустов, Редина, 2013]. На глубине 1–2,3 м наблюдался максимум численности психрофильных денитрификаторов, 1,9–3,2 м – железоредуцирующих, 2,9–5,1 м – сульфатредуцирующих (см. табл. 2).

Динамика численности аэробных и анаэробных микроорганизмов в грунтах зоны аэрации при внесении элементов минерального питания отличается: у первых увеличилась на порядок, у вторых вместо ожидаемого увеличения снизилась (см. табл. 2). При этом наиболее значительные изменения численности происходили у психрофильных микроорганизмов. В частности, после обработки психрофильные денитрификаторы и железоредукторы на некоторых горизонтах зоны аэрации не обнаружены. Причина снижения числа КОЕ анаэробных бактерий не ясна. Возможно, это связано с селективной чувствительностью микроорганизмов разных эколого-трофических групп к изменяющимся условиям.

В грунтовых водах численность микроорганизмов, за исключением железоредуцирующих, после внесения биогенных элементов увеличилась на 1–4 порядка. Численность углеводородоокисляющих увеличи-

лась до 10^7 КОЕ/мл, аммонифицирующих – до 10^8 КОЕ/мл, денитрифицирующих – до 10^5 КОЕ/мл. При этом численность психрофильных увеличилась больше, чем мезофильных. В отличие от зоны аэрации в зону насыщения вносили нитратную форму азота. Ряд исследователей считают нитратную форму азота более эффективным элементом питания при биостимуляции [Zedelius et al., 2011; Sarkar et al., 2016]. Помимо этого нитрат служит акцептором электронов для денитрификаторов. Численность микроорганизмов также увеличилась в скважинах, в которые удобрения не вносили. Это говорит о диффузии и распространении внесенных элементов питания в толще подземных вод.

Численное преобладание и большая активность психрофильных эколого-трофических групп свидетельствуют о том, что в геологической среде в условиях умеренного климата Средней Сибири основная роль в биодеградации углеводородного загрязнителя принадлежит психрофильным микроорганизмам.

В грунтовых водах одновременно с увеличением численности аборигенных микроорганизмов изменялись гидрохимические показатели. Состав грунтовых вод тесно связан с жизнедеятельностью автохтонной микрофлоры. В результате роста микроорганизмов в нефтезагрязненных грунтовых водах происходят колебания концентрации растворенного кислорода, органического углерода, железа, гидрокарбоната и других веществ [Essaid et al., 2011; Хаустов, Редина, 2013; Qian et al., 2018]. В исследуемых грунтовых водах активность эколого-трофических групп микроорганизмов характеризовали изменения концентраций аммония, нитрита, нитрата, сульфата, а также перманганатной окисляемости.

Увеличение концентрации аммония вызвано разложением тяжелых фракций азотсодержащих нефтепродуктов. Его концентрация в очаге загрязнения возрастала до 50 мг/дм^3 и более. Высокие концентрации аммония в грунтовых водах сохранялись на протяжении 6–12 месяцев, пока не произошло снижение уровня загрязнения. На периферии загрязненной зоны изменение содержания аммония и нитрата носило противофазный характер [Трусей и др., 2017]. Это свидетельствует об идущих здесь процессах выделения аммонийного азота из нефтепродуктов, нитрифи-

кации и денитрификации. При этом процесс нитрификации, протекающий на периферии, препятствовал выносу аммония за пределы загрязненной зоны и приводил к повышению концентрации нитрата, который потребляли денитрификаторы.

Противофазный характер изменений содержания в грунтовой воде имели также сульфат и гидрокарбонат (см. рис. 2), что подтверждает сульфатредукцию, сопряженную с биоразложением нефтепродуктов. Взаимосвязь между содержанием сульфата и гидрокарбоната в грунтовых водах известна [Судариков, Нгуен Тат Тханг, 2015; Qian et al., 2018]. Заметим, что рост сульфатредуцирующих бактерий не стимулировали. В течение наблюдаемого периода в отдельных скважинах их численность увеличилась на 1–2 порядка. Необходимый для сульфатредукторов акцептор электронов (SO_4^-) содержится в грунтовых водах (сульфатно-гидрокарбонатный тип) и поступает из нижних водоносных горизонтов по разлому в районе скв. 239. Естественный приток сульфата поддерживает интенсивность сульфатредукции в загрязненной области. Концентрация сульфата в грунтовой воде варьирует в широких пределах. В скважинах 160, 239 и 589 периодически регистрировали полное исчерпание сульфата, что возможно только при достаточно высокой активности сульфатредуцирующих бактерий [Судариков, Нгуен Тат Тханг, 2015; Qian et al., 2018]. В скважинах 239 и 160 снижение содержания сульфата происходило в течение всего периода обработки. Данные скважины расположены в грунтах с повышенной плотностью и наименьшей скоростью фильтрации воды. Благодаря этому здесь сформировались зоны, благоприятные для роста сульфатредукторов. Анализ массива данных по всем наблюдательным скважинам с помощью нейросети показал, что в период 2004–2010 гг. сульфатредукция существенно влияла на состав грунтовой воды только в районе скважин 239 и 160.

Увеличение перманганатной окисляемости грунтовой воды связано с биоразложением нефтепродуктов до легкоокисляемых органических соединений. Органический углерод в грунтовых водах, загрязненных углеводородами, представлен полисахаридами, гуминовыми, фульво- и низкомолекулярными орга-

ническими кислотами [Cozzarelli et al., 1994; Essaid et al., 2011; Хаустов, Редина, 2013]. При естественном восстановлении грунтовых вод высокие концентрации органического углерода (>20 мг/л) могут сохраняться более 10 лет [Essaid et al., 2011]. В нашем случае повышенная перманганатная окисляемость наблюдалась практически в течение всего периода исследований (2009–2019 гг.).

Таким образом, представленные данные показывают, что при стимуляции аборигенной микрофлоры уровень загрязнения геологической среды существенно снижается (мощность линзы нефтепродуктов сократилась с 0,2–0,5 до 0,07 м). Внесение минеральных элементов питания должно быть согласовано с условиями конкретной ситуации. Индикаторами восстановительных процессов в грунтах служат увеличение численности аборигенных микроорганизмов разных эколого-трофических групп и изменение гидрохимических показателей грунтовых вод. При высоком уровне загрязнения подземной среды может происходить временное загрязнение грунтовых вод продуктами биохимической трансформации нефтепродуктов.

ЛИТЕРАТУРА

- Брянская А. В., Уварова Ю. Е., Слынько Н. М., Демидов Е. А., Розанов А. С., Пельтек С. Е. Теоретические и практические аспекты проблемы биологического окисления углеводов микроорганизмами // Вавилов. журн. генетики и селекции. 2014. Т. 18, № 4/2. С. 999–1012.
- Жуков Д. В., Мурыгина В. П., Калюжный С. В. Механизмы деградации углеводов нефти микроорганизмами // Успехи соврем. биологии. 2006. Т. 126, № 3. С. 285–296.
- Паничева Л. П., Моисеенко Т. И., Кремлева Т. И., Волкова С. С. Биохимическая трансформация нефтяных углеводородов в водах Западной Сибири // Вестн. Тюмен. гос. ун-та. 2012. № 12. С. 38–48.
- Практикум по микробиологии / под ред. проф. А. И. Нетрусова. М.: Академия, 2005. 600 с.
- Судариков С. М., Нгуен Тат Тханг. Роль подземных вод в образовании метана на угольном месторождении Маохе (Северный Вьетнам) // Зап. Горн. ин-та. 2015. Т. 212. С. 79–83.
- Терещенко Н. Н. Эколого-биологические факторы и механизмы ремедиации антропогенно-нарушенных почв: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Томск, 2007. 42 с.
- Трусей И. В., Гуревич Ю. Л., Ладыгина В. П., Ланкин Ю. П., Фадеев С. В. Анализ содержания ионов нитрата и аммония при биоремедиации грунтовой воды, загрязненной нефтепродуктами // Химия в интересах устойчивого развития. 2017. Т. 25, № 2. С. 205–211.
- Трусей И. В., Ладыгина В. П., Гуревич Ю. Л., Озерский А. Ю. Распределение микроорганизмов в загрязненном нефтепродуктами грунте зон аэрации и насыщения // Сиб. экол. журн. 2009. Т. 16, № 1. С. 29–35. [Trusei I. V., Ladygina V. P., Gurevich Yu. L., Ozerskii A. Yu. Distribution of microorganisms in the oil-polluted ground of vadose and saturation zones // Contemporary Problems of Ecology. 2009. Vol. 2, N 1. P. 22–26] doi: 10.1134/S 1995425509010044
- Фахрутдинов А. И., Алехин В. Г., Ямпольская Т. Д., Малышкина Л. А., Кортишко Т. И., Ситников А. В., Жирнова Т. А. Динамика микробиологических процессов при испытании биопрепаратов деструкции нефти в почвах // Биологические ресурсы и природопользование: сб. науч. тр. Сургут: Дефис, 2003. С. 140–147.
- Филатов Д. А., Овсянникова В. С., Шаршов К. А., Забелин В. А., Чуйкина Д. И. Пилотные испытания микробиологического метода утилизации отработанных нефтяных масел // Экология и пром-сть России. 2019. Т. 23, № 4. С. 25–29.
- Хаустов А. П., Редина М. М. Загрязнение геологической среды нефтепродуктами при их хранении // Энергия: экономика, техника, экология. 2012. № 6. С. 19–28.
- Хаустов А. П., Редина М. М. Трансформации нефтяных загрязнений геологической среды под влиянием живого вещества // Нефть. Газ. Новации. 2013. № 10. С. 22–30.
- Cozzarelli I. M., Baedecker M. J., Eganhouse R. P., Goerlitz D. F. The geochemical evolution of low-molecular-weight organic acids derived from the degradation of petroleum contaminants in groundwater // Geochim. Cosmochim. Acta. 1994. Vol. 58, N 2. P. 863–877.
- Delin G. N., Essaid H. I., Cozzarelli I. M., Lahvis M. H., Bekins B. A. Ground water contamination by crude oil near Bemidji, Minnesota U. S. Geological Survey, Fact Sheet. 1998. P. 084–098. doi: 10.3133/fs08498
- El-Gendy N. Sh., Farah J. Y. Kinetic modeling and error analysis for decontamination of different petroleum hydrocarbon components in biostimulation of oily soil microcosm // Soil and Sediment Contamination: An Int. J. 2011. Vol. 20, N 4. P. 432–446.
- Essaid H. I., Bekins B. A., Herkelrath W. N., Delin G. N. Crude oil at the Bemidji site: 25 years of monitoring, modeling, and understanding // Ground Water. 2011. Vol. 49, N 5. P. 706–726. doi: 10.1111/j.1745-6584.2009.00654.x
- Fjordbøge A. S. Source zone remediation by zero valent iron technologies. Kgs. Lyngby, Denmark: Technical University of Denmark (DTU). PhD Thesis. (2011) URL: <https://orbit.dtu.dk/files/5598912/Annika%20S%20Fjordb%C3%B8ge%20PhD-thesi%20WWW-Version.pdf> (дата обращения: 28.8.2019)
- Franzmann P., Robertson W., Zappia L., Davis G. The role of microbial populations in the containment of aromatic hydrocarbons in the subsurface // Biodegradation. 2002. Vol. 13. P. 65–78.
- Hazen T. C. Biostimulation. In: K. N. Timmis (eds). Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Berlin; Heidelberg: Springer, 2010. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_355
- Lankin Yu. P., Lobova T. I., Popova L. Yu. Assessment of the Human Impact on the Aquatic Ecosystem of Lake Shira using Neural Network Methods // Optical Memory and Neural Networks. 2006. Vol. 15, N 2. P. 65–73.

- Miller J. I., Techtmann S., Fortney J., Mahmoudi N., Joyner D., Liu J., Olesen S., Alm E., Fernandez A., Gardinali P., GaraJayeva N., Askerov F. S., Hazen T. C. Oil Hydrocarbon Degradation by Caspian Sea Microbial Communities // *Frontiers in Microbiol.* 2019. Vol. 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.00995
- Mohajeri L., Zahed M. A., Aziza H. A., Isac M. H. Assessment of Bioaugmentation and Biostimulation Efficiencies for Petroleum Contaminated Sediments // *Environmental Energy and Economic Res.* 2017. Vol. 1, N 1. P. 89–98. doi: 10.22097/eeer.2017.46459
- Qian H., Zhang Yu., Wang J., Si C., Chen Z. Characteristics of petroleum-contaminated groundwater during natural attenuation: a case study in northeast China // *Environ. Monit. Assess.* 2018. Vol. 190. P. 80. URL: <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6449-6> (дата обращения: 20.02.2020).
- Sarkar J., Kazy S. K., Gupta A., Dutta A., Mohapatra B., Roy A., Bera P., Mitra A., Sar P. Biostimulation of Indigenous Microbial Community for Bioremediation of Petroleum Refinery Sludge // *Front. Microbiol.* 2016. Vol. 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.01407
- Wolicka D., Borkowski A. Microorganisms and Crude Oil. Introduction to Enhanced Oil Recovery (EOR) Processes and Bioremediation of Oil-Contaminated Sites, Dr. Laura Romero-Zerón (Ed.): InTech. 2012. URL: http://cdn.intechopen.com/pdfs/37040/InTech-Microorganisms_and_crude_oil.pdf (дата обращения: 28.08.2019).
- Zedelius J., Rabus R., Grundmann O., Werner I., Brodtkorb D., Schreiber F., Ehrenreich P., Behrends A., Wilkes H., Kube M., Reinhardt R., Widdel F. Alkane degradation under anoxic conditions by a nitrate-reducing bacterium with possible involvement of the electron acceptor in substrate activation // *Environ. Microbiol.* 2011. Rep. 3. P. 125–135. doi: 10.1111/j.1758-2229.2010.00198.x

Stimulation of indigenous anaerobic microorganisms for bioremediation of the geological environment polluted with petroleum products

I. V. TRUSEI^{1, 2}, Yu. L. GUREVICH², V. P. LADYGINA², S. V. FADEEV³, Yu. P. LANKIN²

¹*Krasnoyarsk State Pedagogical University named after V. P. Astafiev
66004989, Krasnoyarsk, Ada Lebedeva str., 89
E-mail: trusey@list.ru*

²*Federal Research Center
“Krasnoyarsk Science Centre of the Siberian Branch of Russian Academy of Science”
660036, Krasnoyarsk, Academgorodok, 50*

³*JSC Minusinskaya Hydrogeological Party
662621, Krasnoyarsk Territory, Minusinsk District, Selivaniha, Zarechnaya srt., 3g*

Changes in the number of anaerobic microorganisms (denitrifying, sulfate and iron-reducing) in ground and groundwater polluted with oil products were investigated when bioremediation was carried out. It was shown that in the studied geological media the number of psychrophilic microorganisms of anaerobic groups (denitrifying, sulfate and iron-reducing, as assessed by the number of the colony-forming units on the respective cultivation media) was higher than the number mesophilic ones. When N, P, K-fertilizers were introduced into the contaminated zone, the number of psychrophilic microorganisms changed more significantly, both increasing and decreasing. When the ground in the aeration zone was treated, the number of anaerobes decreased, probably due to competitive displacement by aerobes. The number of hydrocarbon-oxidizing and ammonifying microorganisms increased by an order of magnitude and amounted to 10^6 CFU/g and 10^6 – 10^7 CFU/g, respectively. When fertilizers were added to groundwater, the number of anaerobic microorganisms increased by 1–4 orders of magnitude, the number of denitrifiers reached 10^5 CFU/ml, whereas the CFU number of sulfate- and iron-reducers was 10^3 – 10^4 and 10^2 – 10^3 CFU/ml, respectively. It was revealed that simultaneously with increase of the CFU numbers some chemical properties changed indicating intensified biodegradation of petroleum products. In particular, an antiphase changes in the ammonium and nitrate concentrations were observed due to the decomposition of petroleum products, nitrification and denitrification, as well as the concentration of bicarbonate and sulfate ions due to sulfate reduction.

Key words: bioremediation, groundwater, petroleum products, psychrophilic microorganisms, denitrifying, sulfate-reducing, iron-reducing.