



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/26 (2021.02); B09C 1/10 (2021.02)

(21)(22) Заявка: 2020134701, 21.10.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.10.2020

Дата регистрации:
20.09.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 21.10.2020

(45) Опубликовано: 20.09.2021 Бюл. № 26

Адрес для переписки:

677007, г. Якутск, ул. Автодорожная, 20, ИПНГ
СО РАН, Федоровой А.Ф.

(72) Автор(ы):

Ерофеевская Лариса Анатольевна (RU),
Глянцева Юлия Станиславовна (RU),
Лифшиц Сара Хаимовна (RU),
Чалая Ольга Николаевна (RU),
Зуева Ираида Николаевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Федеральный
исследовательский центр "Якутский научный
центр Сибирского отделения Российской
академии наук" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2128703 C1, 10.04.1999. RU
2013111507 A1, 20.09.2014. RU 2565549 C2,
20.10.2015. RU 2311237 C1, 27.11.2007. БЕЛИК
Е.С., Оценка эффективности биосорбента в
технологии биологической очистке воды и
почвы от нефтепродуктов, Вестник ПНИПУ.
Прикладная экология. Урбанистика, 2017 4(28),
с. 104-114. СМОЛЬНИКОВА В.В. и др.,
Особенности биомедиаии (см. прод.)

(54) Способ очистки почв криолитозоны от нефтезагрязнений

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к способам очистки почв криолитозоны от нефтезагрязнений. Способ очистки почв криолитозоны от нефтезагрязнений предусматривает выделение накопительной культуры аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов из мерзлотной почвы, взятой с места загрязнения. Осуществляют наработку накопительной культуры до достижения максимальной концентрации микробных клеток

в накопительной культуре и иммобилизуют на мерзлотной почве, отобранной с нефтезагрязненного участка с последующим высушиванием в естественных условиях «in situ» и внесением в почву, в количестве, достаточном для эффективной деградации нефтезагрязнений. Изобретение позволяет повысить степень очистки почв криолитозоны от нефтезагрязнений. 3 ил., 1 табл., 2 пр.

(56) (продолжение):

нефтезагрязненных почв, Известия Самарского научного центра РАН, 2011, т. 13 1(5), с. 1219-1224. ЕЖЕЛЕВ З.С. Свойства и режимы рекультивированных после разливов нефти почв Усинского района республики Коми, Дисс на соискание уч. степ. КБН, Москва, 2015, с. 29-39.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12N 1/26 (2021.02); B09C 1/10 (2021.02)

(21)(22) Application: **2020134701, 21.10.2020**

(24) Effective date for property rights:
21.10.2020

Registration date:
20.09.2021

Priority:
(22) Date of filing: **21.10.2020**

(45) Date of publication: **20.09.2021** Bull. № 26

Mail address:
**677007, g. Yakutsk, ul. Avtodorozhnaya, 20, IPNG
SO RAN, Fedorovoj A.F.**

(72) Inventor(s):

**Erofeevskaya Larisa Anatolevna (RU),
Glyaznetsova Yuliya Stanislavovna (RU),
Lifshits Sara Khaimovna (RU),
Chalaya Olga Nikolaevna (RU),
Zueva Iraida Nikolaevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
uchrezhdenie nauki Federalnyj issledovatel'skij
tsentr "Yakutskij nauchnyj tsentr Sibirskogo
otdeleniya Rossijskoj akademii nauk" (RU)**

(54) **METHOD FOR PURIFYING THE CRYOLITHIC ZONE SOILS FROM PETROLEUM POLLUTION**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, in particular, to methods for purification of the cryolithic zone soils from petroleum pollution. The method for purification of the cryolithic zone soils from petroleum pollution involves isolation of a cumulative culture of native petroleum destructor microorganisms from cryogenic soil taken from the site of pollution. The cumulative culture is developed until the maximum concentration of microbial cells is reached in the

cumulative culture and immobilised on the cryogenic soil taken from the petroleum-polluted site, followed by drying in natural conditions "in situ" and introducing into the soil in an amount sufficient for effective degradation of petroleum pollution.

EFFECT: provides a possibility to increase the degree of purification of the cryolithic zone soils from petroleum pollution.

1 cl, 3 dwg, 1 tbl, 2 ex

RU 2 755 687 C1

RU 2 755 687 C1

Изобретение относится к охране окружающей среды, в частности к способам очистки почв криолитозоны от нефтезагрязнений.

Способ включает внесение в нефтезагрязненную почву накопительной культуры аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов,

5 предварительно выделенных из взятой с места загрязнения почвы, наработанных до достижения максимальной концентрации микробных клеток в накопительной культуре, отличающийся тем, что полученную накопительную культуру аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов, минуя стадию выделения чистой культуры, иммобилизуют на нефтезагрязненную мерзлотную почву, отобранную с места
10 загрязнения, при следующем соотношении компонентов, мас. %: накопительная культура аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов - 10; мерзлотная нефтезагрязненная почва - 90, после чего полученные почвенные гранулы с микроорганизмами высушивают контактным способом в естественных условиях «ш лий» и вносят в нефтезагрязненную мерзлотную почву в количестве, достаточном для эффективной деградации
15 нефтезагрязнения.

Способ легко доступен для исполнения, не требует осуществления дорогостоящих и трудоемких операций, позволяет достичь сравнительно высокого коэффициента деструкции нефтезагрязнения в мерзлотной почве, в условиях криолитозоны за счет активации аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов, полученных при их
20 наработке, иммобилизации на почвенные гранулы и введении в нефтезагрязненную почву, откуда они и были выделены.

Актуальность.

В условиях криолитозоны проблема восстановления природных экосистем, загрязненных нефтью и нефтепродуктами стоит очень остро (1. Ерофеевская Л.А.
25 Микробиологическая продуктивность нефтезагрязненных почвенных экосистем в условиях криолитозоны // Биологические проблемы криолитозоны: Материалы Всероссийской конференции, посвященной 60-летию со дня образования Института биологических проблем криолитозоны СО РАН (30 июля- 05 августа 2012 г., г. Якутск). - Якутск: Сфера, 2012. - С. 61-62).

30 Трудности реабилитации мерзлотных почв после нефтеразливов связаны с низкими температурами почвенного субстрата, застойным увлажнением, присутствием близко залегающей многолетней мерзлоты, слабым преобразованием органической и минеральной частей, недостатком питательных веществ, коротким вегетационным периодом и низкой активностью микробных популяций в почвенных экосистемах
35 криолитозоны (2. Ерофеевская Л.А., Глязнецова Ю.С., Зуева И.Н. и др. Способы очищения мерзлотных почв от нефти и нефтепродуктов // Сб. докл. Междунар. науч.-практ. конф. «Предупреждение и ликвидация чрезвычайных ситуаций в Арктике». Якутск, 2011. - С. 40-42; 3. Ерофеевская Л.А., Глязнецова Ю.С., Чалая О.Н. Использование дернообразующих растений в биоремедиации нефтезагрязненных
40 мерзлотных почв // Успехи современного естествознания. 2012. №11-1. - С. 128-129).

Все это сдерживает процессы естественного восстановления окружающей среды (ОС), загрязненной нефтяными углеводородами (УВ) и приводит к тому, что «деструкция нефти и ее производных в условиях севера может продолжаться до 50 лет и более» (4. Оборин А.А., Калачникрва И.Г., Масливец Т.А. и др. // Восстановление
45 нефтезагрязненных почвенных экосистем. М.: Наука, 1988. - С. 140-159).

В настоящее время наиболее перспективным методом для очистки нефтезагрязненных почв, как в экономическом, так и в экологическом плане является биотехнологический подход, основанный на использовании различных групп микроорганизмов,

отличающихся повышенной способностью к биодegradации компонентов нефти и нефтепродуктов (НП) (5. Логинов О.Н. биотехнологические методы очистки окружающей среды от техногенных загрязнений. - Уфа: Реактив, 2000. - 100 с.).

Следует подчеркнуть, что при разработке эффективных способов очистки почв необходимо изучение процессов трансформации нефтяных УВ в естественных условиях (6. Рогозина Е.А., Калимуллина Г.М. Балансовая сторона и динамика утилизации микроорганизмами нефтяного загрязнения почвы // Нефтегазовая геология. Теория и практика. [Электронный ресурс]. 2009 (4). URL: http://www.ngtp.ru/7/19_2009.pdf (дата обращения 15.12.2019); 7. Путилина В.С., Юганова Т.И. Изменение состава нефтяного загрязнения при фильтрации через зону аэрации // Геоэкология. Инженерная геология. Гидрогеология. Геоэкология. 2018. №1. С. 42-50.).

Это позволит более качественно оценить процессы биодegradации нефтезагрязнения при выполнении восстановительных мероприятий на техногенно-нарушенных землях, поскольку «в природных условиях влияние таких факторов, как вклад нативного органического вещества почв; а также возможное наложение вторичных загрязнений может снивелировать эффект собственно биодegradационных изменений в составе нефтезагрязнения и таким образом привести к заниженной оценке эффективности нефтедеструкторов» (8. Глянцева Ю.С., Зуева И.Н., Чалая О.Н., Лифшиц С.Х. Вопросы экологического мониторинга и реабилитации нефтезагрязненных почв арктической зоны Якутии // Арктика и Север, 2012. - С. 1-12).

Уровень техники.

Известен способ очистки почв от загрязнений нефтью и НП, в котором используют консорциум нефтеокисляющих микроорганизмов *Pseudomonasputida* ПИ Ко-1, *Pseudomonas fluorescens* ПИ-896, *Micrococcus* sp. ПИ Ку-1, *Burkholderia caryophylli* Jap-3, *Serratia odorifera* Jap-1 при весовом соотношении от 3-12 мас. % каждого микроорганизма, при этом совместно с суспензией биопрепарата в загрязненную среду вводят ризоторфин в количестве 30-120 г/м², где ризоторфин - земледобрительный препарат азотфиксирующих микроорганизмов (9. Патент RU 2191643. Способ очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами. С1, В09С 1/10, С12N 1/20, С12N 1/20, С12R1: 01. Заявка: 2001119562/13, 09.07.2001. Опубликовано: 27.10.2002. Заявитель: Закрытое акционерное общество "Полиинформ". Авторы: Саксон В.М., Кузнецов С.А., Бойкова И.В., Новикова И.И. Патентообладатель: Закрытое акционерное общество "Полиинформ").

Недостатком является то, что при приготовлении рабочей суспензии микроорганизмов температура поддерживается на уровне 18-22°C, т.е. микроорганизмы, входящие в состав консорциума, неспособны к дegradации НП при пониженных температурах.

Известен способ очистки почв и грунтов, загрязненных нефтью и НП, с использованием ассоциации нефтеокисляющих микроорганизмов - *Rhodococcus seruthropolis* ИЭГМ 708 и *Rhodococcus rubber* ИЭГМ 327 и биосурфактанта - *Rhodococcus*, отличающийся тем, что производят первоначальную обработку сильнозагрязненной почвы/грунта до достижения уровня остаточных нефтепродуктов 5-10 вес. % и последующее добавление органического разрыхлителя, олеофильный биопрепарат вносят в количестве не менее 10 л на 0,5-1,0 м³ почвы/грунта по меньшей мере один раз в неделю в течение первого месяца и в дальнейшем по меньшей мере один раз в месяц до окончания цикла биоремедиации в сочетании с периодическим рыхлением и увлажнением и дополнительно производят фиторемедиацию - засев многолетними травами (10. Патент RU 2193464. Способ биоремедиации почв и грунтов, загрязненных

нефтью и нефтепродуктами. C1, B09C 1/10, C12N 1/26, C12N 1/26, C12R:01. Заявка: 2001130686/13, 14.11.2001. Опубликовано: 27.11.2002. Заявители: Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Общество с ограниченной ответственностью "ПермНИПИнефть". Авторы: Ившина И.Б., Костарев С.М., Куюкина М.С., Закшевская Л.В. Патентообладатели: Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Общество с ограниченной ответственностью "ПермНИПИнефть").

Недостатком вышеописанного способа является использование твердо-жидкофазного биореактора и аэрируемых почвенных площадок в качестве первоначальной обработки сильнозагрязненной почвы. Такой метод снижения уровня загрязнения трудоемок и не применим при масштабных авариях и разливах нефти и НП.

Известен способ очистки нефтяного дистиллята, полученного микробиологической депарафинизацией нефти от продуктов метаболизма реагентной обработкой. В качестве реагентов используют ионообменные высокомолекулярные соединения, а перемешивание осуществляют в псевдо сжиженном слое ферромагнитной насадки воздействием неоднородного вращающегося электромагнитного поля (11. Авторское свидетельство SU N 1474099. Способ очистки нефтяного дистиллята. A1, B03C 1/00, C02F 1/48, C02F 103:34. Заявка: 4062401, 22.04.1986. Опубликовано: 23.04.1989. Заявитель: Всесоюзный научно-исследовательский институт белковых веществ. Авторы: Ксенофонтов Б.С., Алентьева Е.С., Шкоп Я.Я., Козлова Л.И., Твердова О.Н., Бахметьева И.И., Михайлов И.А.).

Недостатком данного способа очистки нефтяного дистиллята является применение дорогостоящих ионообменных соединений, а также сложного оборудования.

Известен способ очистки почвы, природных и сточных вод с использованием биопрепаратов, в частности консорциума углеводородокисляющих микроорганизмов "Деворойл" (консорциум углеводородокисляющих микроорганизмов *Rhodococcus maris*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Yarrowia lipolytica*), включающий хранение или доставку изготовленных биопрепаратов к загрязненной территории или акватории, подготовку биопрепаратов к использованию и внесение их в очищаемую среду. Этот способ предусматривает при хранении суспензии микроорганизмов использование NaCl, биологически активных веществ (витамины) и осмопротекторов (бетаин) (12. Патент RU 2114071. Способ очистки почвы, природных и сточных вод с использованием биопрепаратов. C1, C02F 3/34, B09 C1/10, C12N 1/20, C12N 1/26, C12Q 1/02. Заявка: 97107716/13, 22.05.1997. Опубликовано: 27.06.1998. Заявитель: Борзенков И.А. Авторы: Борзенков И.А., Беляев С.С., Ибатуллин Р.Р., Поспелов М.Б., Свитнев А.И. Патентообладатель: Борзенков И.А.).

Недостатком является то, что, формой применения штаммов здесь является смесь лиофильно высушенных культур, что приводит к использованию энергоемких процессов изготовления биопрепарата и удорожанию процесса очистки.

Кроме того, полученные, в результате селекции или методами генной инженерии штаммы углеводородокисляющих микроорганизмов, входящие в состав препаратов, при внесении на нефтезагрязненные участки не всегда выдерживают конкуренции с местной микрофлорой, в результате чего последняя быстро подавляет искусственно созданные штаммы, и интенсивность биодеструкции оказывается ниже ожидаемой; способ не адаптирован к очищаемой среде, а именно к конкретному составу микрофлоры каждого очищаемого участка.

Известен способ для очистки почвы от нефтяных загрязнений, заключающийся в обработке загрязненной почвы составом, содержащим нефтеокисляющие

микроорганизмы, комплексное удобрение и адсорбент, где в качестве нефтеокисляющих микроорганизмов используют бактериальные препараты «Путидойл», «Деворойл» и «Дестройл», а в качестве адсорбента используют древесную стружку, для деструкции которой в состав вводят дополнительно целлюлозоразрушающие бактерии, а также карбонат магния или кальция для нейтрализации избыточного количества кислот, образующихся при разложении древесных стружек (13. Патент RU №2112610. Состав для очистки почвы от нефтяных загрязнений и способ очистки почвы от нефтяных загрязнений. С1, МПК В09/С 1/10, С02F 3/34, С12N 1/26. Заявка №96111201/13. Заявлено: 06.06.1996. Опубликовано: 16.06.1998, Бюллетень №10. Авторы: Александров А.В., Ахметшина С.М., Гараев И.Х., Гарейшина А.З., Камардин Н.Б. Заявитель и патентообладатель: Гараев И.Х.).

Недостатком известного способа является сложность состава, медленная биodeградация древесной стружки, отсутствие некоторых компонентов, входящих в состав, в продаже, кроме того, биопрепарат «Путидойл» оказывает угнетающее действие на естественный микробный ценоз, что ограничивает известное решение для применения в условиях открытой экосистемы (14. Новиков Ю.В., Комзолова Н.В. Исследования бактериального препарата Путидойл, предназначенного для очистки водоемов от нефти. Водное хозяйство, 1992, №2. - С. 121-123)

Известен способ очистки мерзлотных почв от нефти спорообразующими бактериями *Bacillus subtilis*, заключающийся в обработке почвы, загрязненной нефтью, суспензией штамма бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма-7/2к», что позволяет за 3 месяца летнего периода снизить концентрацию нефти до 0,48% (15. Патент RU 2446900. Способ очистки мерзлотных почв от нефти спорообразующими бактериями *Bacillus subtilis*. С2. В09С 1/10 (2006.01). Заявка: 2010129158/13, 13.07.2010. Опубликовано: 10.04.2012. Авторы: Неустроев М.П., Тарабукина Н.П., Неустроев М.М., Сазонов Н.Н., Парникова С.И., Степанова А.М. Патентообладатель: Государственное научное учреждение Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Россельхозакадемии).

Недостатком является то, что способ позволяет осуществлять деградацию свежего нефтезагрязнения, при постоянно контролируемых лабораторных условиях и не способен восстанавливать мерзлотные почвы, в реальных условиях нефтеразлива, в естественных почвенно-климатических условиях севера, характеризующихся резкими перепадами температур, прямым воздействием солнечных лучей, дефицитом минеральных элементов, коротким вегетационным периодом и другими естественно изменяющимися условиями окружающей среды. Кроме того, жидкая форма биопрепарата на основе суспензии штамма бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма-7/2к» без носителя для иммобилизации микроорганизмов имеет сравнительно короткий срок хранения биопрепарата в сравнении с препаратами на основе микроорганизмов, закрепленных на подложках или носителях (органических или минеральных), что позволяет внесенным в почвы микроорганизмам с минимальными потерями адаптироваться в условиях окружающей среды и максимально пролонгировать действие биопрепарата. Еще одним недостатком решения, служит технология наработки бактериальной суспензии и способа ее применения для очистки почв от нефтезагрязнения, требующая наличия конкретного штамма бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма-7/2к», что делает предлагаемое решение недоступным в случае экстренной ситуации, связанной с устранением аварийного разлива нефти, поскольку предлагаемый штамм бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма-7/2к» отсутствует в открытой продаже или в открытых закупках для организаций, занимающихся устранением нефтеразливов и восстановлением техногенно-нарушенных земель, что делает предлагаемый способ не

применимым на практике.

Известны способы очистки мерзлотных почв от нефтезагрязнений с применением углеводородокисляющих микроорганизмов, иммобилизованных на цеолит месторождения Хонгуруу (Западная Якутия) (16. Патент RU №2565549. Биопрепарат для биоремедиации нефтезагрязненных почв для природно-климатических условий Крайнего Севера. С2, МКП В09С 1/10, В01J 20/16, С09К 17/40, С12N 11/14, С12N 1/20, С12R 1/07, С12R 1/425; 2013155969/10. Заявлено: 17.12.2013. Опубликовано: 20.10.2015, бюллетень №29. Авторы: Ерофеевская Л.А., Глянцева Ю.С. Патентообладатели: ООО "Транснефть-Восток", ОАО "АК "Транснефть", ООО "НИИ Транснефть» (RU); 17. Заявка на изобретение №2013111507. Способ очистки мерзлотных почв и грунтов от загрязнений нефтью и нефтепродуктами МПК А, В09С 1/10, С12N 1/20 507/13(017033); заявлено 14.03.2013; опубликовано 20.09.2014, бюллетень №26. Авторы: Ерофеевская Л.А., Глянцева Ю.С, Новгородов П.Г., Чалая О.Н., Зуева И.Н., Лифшиц С.Х., Ефимов С.Е., Александров А.Р. Патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем нефти и газа Сибирского отделения Российской академии наук (RU)).

Недостатком известных решений является усложненная технология получения биопрепаратов, включающая стадии хранения штаммов, поддержания жизнеспособности рабочей коллекции микроорганизмов, раздельного культивирования и раздельной наработки биомассы бактерий, проверку их биохимических свойств перед наработкой биомассы и чистоты перед иммобилизацией на носитель, в качестве которого служит цеолит месторождения Хонгуруу (Западная Якутия), который также предварительно подготавливают методом механической обработки в дробильных установках и гидрофобизируют при высокой температуре.

Таким образом, на основе анализа известных способов очистки почв от нефтезагрязнений следует, что недостаток предлагаемых решений заключается в том, что для их осуществления применяются либо лиофильно высушенные культуры микроорганизмов, что снижает их жизнеспособность и эффективность уже в первые несколько часов после их интродукции в мерзлотные почвы; либо они имеют короткий срок хранения, что экономически не эффективно.

Экологически обоснованным способом очистки северных экосистем от нефтезагрязнений является биологический способ с применением аборигенных бактерий, жизнеспособных в конкретных условиях, выращенных на конкретных загрязненных субстратах, обладающих способностью разлагать нефтяные УВ, выделять соединения, ускоряющие рост растений (18. Шихранов О.Г., Глянцева Ю.С, Ерофеевская Л.А., Николаева А.В. Способы биоремедиации нефтезагрязненных почв для климатических условий Крайнего Севера и оценка их эффективности // Наука и технологии трубопроводного транспорта нефти и нефтепродуктов. №1 (17), 2015 - С. 90-97).

Наиболее близким техническим решением к заявляемому изобретению является способ очистки почвы от нефти и НП, заключающийся в обработке почвы культуральной жидкостью, содержащей микроорганизмы, предварительно выделенные из взятой с места загрязнения почвы, затем отобранные микроорганизмы раздельно нарабатывают в ферментерах до достижения максимальной концентрации клеток в культуральной жидкости и смешивают биомассу в соотношении, соответствующем соотношению изолятов в отобранной с места загрязнения пробе, после чего обрабатывают ею почву в количестве, достаточном для полного разрушения нефти и НП (19. Патент RU 2128703 способ очистки почвы от нефти и нефтепродуктов. С1, МПК В09С 001/10, С12N 001/26. Заявка 97114152/13. Дата подачи заявки: 18.08.1997.

Дата публикации 10.04.1999. Авторы: Вавер В.И., Власов С.А., Краснопевцева Н.В., Крашенинникова Т.К. Заявитель и патентообладатель: Научно-техническое объединение «ИТИН»).

Недостатком данного способа является недостаточная эффективность жидкой формы биопрепарата на основе суспензии клеток бактерий без носителя вследствие меньшей устойчивости свободных клеток во внешней среде по сравнению с иммобилизованными на носителе, что позволяет внесенной в почвы микрофлоре с минимальными потерями адаптироваться в условиях ОС и максимально пролонгировать действие микроорганизмов, внесенных на поверхность нефтезагрязненных почв в условиях резких перепадов температур, прямого воздействия солнечных лучей, дефицита минеральных элементов и короткого вегетационного периода в природно-климатических условиях Крайнего Севера.

Задачей настоящего изобретения является разработка эффективного способа очистки почв криолитозоны от нефтезагрязнений, не требующего осуществления дорогостоящих, трудоемких операций.

Это достигается внесением в нефтезагрязненную мерзлотную почву накопительной культуры аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов, предварительно выделенных из взятой с места загрязнения почвы, наработанных до достижения максимальной концентрации микробных клеток в накопительной культуре и иммобилизованных на мерзлотную почву нефтезагрязненного участка, после чего почвенные гранулы с иммобилизованными микроорганизмами высушиваются в естественных условиях «in situ» и вносятся в очищаемую почву под поверхностную обработку в необходимом количестве для активации биодеградации нефтезагрязнения.

Способ доступен для исполнения, не требует осуществления дорогостоящих и трудоемких операций, позволяет достичь сравнительно высокого коэффициента деструкции нефтезагрязнения в мерзлотной почве, в условиях криолитозоны за счет активации аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов, полученных при их наработке, иммобилизации на почвенные гранулы загрязненного участка и введении в нефтезагрязненную почву, откуда они и были выделены.

Изобретение поясняется следующими примерами.

Пример 1.

Сначала методом культивирования на селективной минеральной среде с нефтью из природного сообщества микроорганизмов получают накопительную культуру аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов, которую без стадии выделения чистых культур смешивают с нефтезагрязненной мерзлотной почвой, отобранной с места загрязнения почвы, после чего, почвенные гранулы с иммобилизованными микроорганизмами высушивают в естественных условиях «in situ» и вносят в почву, которую необходимо очистить от нефтезагрязнения.

Культивирование накопительной культуры микроорганизмов на селективной минеральной среде с нефтью способствует развитию преимущественно нефтедеструкторов, благодаря созданию в среде условий, ограничивающих развитие сопутствующих микроорганизмов (20. Ерофеевская Л.А. Разработка способа очистки мерзлотных почв и грунтов от нефтезагрязнений в природно-климатических условиях Якутии: диссертация... кандидата биологических наук: 03.02.08 / Ерофеевская Лариса Анатольевна: [Место защиты: ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»], 2018. - 248 с. Дата публикации в реестре: 2020-03-03Т18:35:26Z).

Для получения накопительной культуры аборигенных микроорганизмов-

нефтедеструкторов готовят взвесь нефтезагрязненной мерзлотной почвы, отобранной с места загрязнения.

Для приготовления взвеси нефтезагрязненной почвы используют стерильную водопроводную воду и почву, из которой намерены получить накопительную культуру аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов для очистки нефтезагрязненной почвы.

В зависимости от предполагаемого объема работ, делают навеску нефтезагрязненной мерзлотной почвы и смешивают ее со стерильной водопроводной водой, в следующих соотношениях, например: 1 г почвы вносят в 10 мл воды; 10 г почвы - в 100 мл воды; 100 г почвы - в 1 л воды и т.д. в зависимости от требуемого объема.

Полученную почвенную взвесь тщательно перемешивают, отстаивают в течение 30 минут для оседания тяжелых почвенных частиц* на дно используемой емкости (пробирки, колбы).

После чего полученную взвесь используют для накопления аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов в элективной минеральной среде с нефтью следующего состава (г/л): KNO_3 - 4,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,8; NaCl - 1,0; K_2HPO_4 - 1,4; KH_2PO_4 - 0,6; вода - 1,0; нефть 1,0.

Для накопления аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов, полученную вышеописанным способом почвенную взвесь, вносят в емкость для культивирования и накопления микроорганизмов с предварительно подготовленной минеральной средой вышеописанного состава в соотношении 1:10, например, 1 мл полученной почвенной взвеси вносят в 10 мл минеральной среды с нефтью; 10 мл почвенной взвеси - в 100 мл среды; 100 мл почвенной взвеси - в 1 л среды и т.д. до требуемого объема.

Процесс накопления аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов в минеральной среде с нефтью протекает при комнатной температуре в течение 3-5 суток в условиях постоянной аэрации до достижения максимального количества микробных клеток (не менее $1 \cdot 10^9$ клеток на 1 см^3), которое контролируют ежедневно методом посева на мясопептонный агар (МПА) промышленного производства.

Через 3-5 суток от начала культивирования, в емкости для накопления микроорганизмов образуется мутная эмульсия биомассы нефтедеструкторов, при этом маслянистые пятна нефти исчезают, что свидетельствует о накоплении микроорганизмов, обладающих способностью использовать в качестве единственного источника питания нефтяные УВ.

Полученную накопительную культуру аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов, без стадии выделения чистой культуры смешивают с нефтезагрязненной мерзлотной почвой, отобранной с того участка, где планируется проведение восстановительных (биоремедиационных) работ, что позволяет накопительным культурам аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов получать дополнительный источник энергии из нефтяных компонентов загрязненного субстрата, откуда они и были выделены.

Для этого суспензию накопительной культуры аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов, полученную вышеописанным способом с концентрацией не менее $1 \cdot 10^9$ микробных клеток на 1 см^3 , минуя стадию выделения чистой культуры, перемешивают с нефтезагрязненной мерзлотной почвой в соотношении, масс. %: жидкой накопительной культуры аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов - 10; нефтезагрязненной мерзлотной почвы - 90; смесь высушивают контактным способом в естественных условиях «in situ» в течение 48-72 часов.

Полученный таким образом биопрепарат из накопительной культуры аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов, иммобилизованной на почвенные гранулы, вносят в почву «in situ», без передвижения почвенного слоя, под поверхностную обработку (вспашка, перекопка, рыхление) с помощью специальной техники (сеялки, навозоразбрасыватели и др.) при больших объемах работ или вручную, при помощи совка или лопаты, при не больших площадях нефтезагрязнений, из расчета 100 г на 1 кв.м. почвы, при глубине проникновения нефти до 10 см или 1 кг на 1 куб.м. загрязненного субстрата.

В случае, если почва для иммобилизации накопительной культуры аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов имеет очень высокую концентрацию нефтезагрязнения, ее рекомендуется предварительно очистить сорбентами или разбавить чистой почвой до концентрации остаточного содержания нефтезагрязнения 150,000-200,000 г/кг.

Очистка почв криолитозоны от нефтезагрязнения предлагаемым способом проста в исполнении, не требует внесения чужеродных элементов и веществ в нефтезагрязненную почву, экологически безопасна, поскольку не предполагает интродукции чужеродных микроорганизмов в почвенную экосистему, а накопительная культура из аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов, иммобилизованная на носитель, в качестве которого служит та же самая почва, из которой получена накопительная культура нефтедеструкторов и, которую будут очищать, способствует созданию в почве центров биодegradации нефтезагрязнения и активации аборигенных почвенных микроорганизмов, участвующих в самоочищении и самовосстановлении нарушенной почвенной экосистемы.

Эффективность разрабатываемого способа очистки почв криолитозоны от нефтезагрязнения подтверждается детальными научно-обоснованными геохимическими данными, доказывающими протекание процессов биодegradации нефтяного загрязнения по направленному изменению его химического состава.

Пример 2.

Экспериментальные работы по изучению эффективности способа очистки почв криолитозоны от нефтезагрязнения проводились на территории, расположенной в районе Крайнего Севера (Юго-Западная часть Республики Саха (Якутия)), загрязненной нефтью в результате аварийного разлива (21. Глянцева Ю.С., Чалая О.Н., Лифшиц С.Х., Зуева И.Н. Мониторинг состояния нефтезагрязненных почв криолитозоны // Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем. Том XXIX. - №4. - С. 111-128; 22. Зуева И.Н., Глянцева Ю.С., Чалая О.Н., Карелина О.С., Ефимов С.Е. Оценка нефтезагрязнения почвогрунтов на территории Талаканского нефтепромысла // Наука и образование. - №2. 2007. - С. 68-72).

Для этого на данной территории заложили экспериментальный участок, в мерзлотную почву которого вносили биопрепарат, полученный по примеру 1.

Тип почвы мерзлотно-таежная. Время экспозиции опыта - 1 год.

Пробы почв на участках отбирали перед -внесением биопрепарата, полученного по примеру 1 и через год после очистки согласно методическим рекомендациям [23. ГОСТ 17.4.4.02-84 Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. - М.: Стандартинформ, 2008. - 8 с.; 23. ГОСТ 17.4.3.01-83 Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб. - М.: ИПК Издательство стандартов, 2004. - 4 с.). Контролем служили пробы почв, отобранные из участка без внесения биопрепарата. Содержание нефти определяли по выходу почвенного битумоида - хлороформенного экстракта (ХЭ). Исходное содержание нефти на экспериментальном

участке до очистки составило 155,788 г/кг, а на контрольном участке 168,509 г/кг (таблица 1). В химической структуре экстракта исходных проб (до очистки) преобладали метильные и метиленовые углеводородные группы и связи (полосы поглощения (п.п.) 1460, 1380, 720 см^{-1}), ароматические углеводороды (п.п. 750, 810 и 1600 см^{-1}) при

5 незначительном участии карбонильных групп - п.п. 1700 см^{-1} (фигура 1, спектр 1).

После проведения биологической очистки произошли изменения в структурно-групповом составе ХЭ - вдвое увеличилось количество эфирных связей (рисунок 1), на что указывает относительный коэффициент поглощения D'_{1170} , практически на порядок

10 возросло количество карбонильных групп - D'_{1700} , и появился дополнительный максимум на 1740 см^{-1} , присутствующий обычно в ИК-спектрах экстрактов чистых фоновых почв. Изменение относительных коэффициентов поглощения структурных групп представлено на фиг. 2.

Согласно величинам исходного и конечного уровней нефтезагрязнения почвенных

15 проб коэффициент деструкции нефтезагрязнения за 1 год эксперимента на экспериментальном участке составил 77,4%, по сравнению с контрольным участком, где степень деструкции составила лишь 9,7%. (таблица 1).

В групповом составе исходной пробы углеводородные компоненты составляли 75,4-80,2%. По мере биодеградации нефтезагрязнения в составе ХЭ снизилось содержание

20 углеводородных компонентов и возросло асфальтово-смолистых (таблица 1).

Известно, что от физиологических особенностей каждого рода микроорганизмов зависит направленность процесса деструкции индивидуальных углеводородов и их смесей, обладающих различной степенью устойчивости к окислению (24. Рогозина Е.А. Геохимические изменения в составе нефтей при биодеградации // Разведка и охрана

25 недр. 2010. №4. С. 63-68). По данным хромато-масс-спектрометрии в исходном загрязнении в составе насыщенных УВ преобладают относительно низкомолекулярные n-алканы с максимумом распределения на $\text{nC}_{15,17}$. В составе алкановых УВ присутствуют структуры ряда 12- и 13-метилалканов. Такое распределение насыщенных УВ характерно

30 для состава талаканской нефти, которая послужила источником загрязнения почв исследуемой территории (таблица 1, фигура 3(1)).

После очистки в составе насыщенных УВ в 2,5 раза увеличилось соотношение изопреноиды/n-алканы. В работах (25. Качинский В.Л., Завгородняя Ю.А., Геннадиев А.Н. Углеводородное загрязнение аркотундровых почв острова Большой Ляховский (Новосибирские острова) // Почвоведение - 2014. - №2. С. 155-168; 26. Ибатулина И.З., Семенова Т.А., Яковлев А.С. Особенности биодеградации нефти в лугово-каштановых почвах Ставропольского края (Модельный эксперимент) // Почвоведение. - 2012. - №3. - С. 376-384.) отношение суммы изопреноидовпристана (Pr) и фитана (Ph) к сумме рядом эллиорирующихся алканов n-C_{17} и n-C_{18} называют коэффициентом биодеградации или

40 коэффициентом микробной деструкции. Ряд исследователей это соотношение используют для выявления степени «старения» и выветривания нефти и НП (27. Другов Ю.С., Зенкевич И.Г., Родин А.А. Газохроматографическая идентификация загрязнений воздуха, воды, почвы и биосред. - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2005. - 752 с.; 28. Рогозина Е.А. Геохимические изменения в составе нефтей при биодеградации // Разведка и охрана

45 недр. - 2010. - №4. - С. 63-68.). В данном примере после очистки коэффициент биодеградации - соотношение $\sum \text{Pr+Ph} / \sum \text{nC}_{17+\text{nC}_{18}}$, увеличился в 4,7 раза по сравнению с исходным загрязнением (до очистки) (таблица 1). Этот коэффициент имеет тенденцию к увеличению в процессе очистки, что свидетельствует об уменьшении доли n-алканов

в составе остаточной нефти. Уменьшилось содержание 12- и 13-метилалканов. На хроматограмме появился высокий нефтяной «горб» (фигура 3 (2)).

В результате проведения экспериментальных работ по восстановлению нефтезагрязненных почв с использованием полученного биопрепарата на основе накопительной культуры аборигенных УОМ, иммобилизованной на нефтезагрязненный субстрат (мерзлотную почву) очищаемого объекта, без стадии выделения УОМ, установлено уменьшение остаточного содержания нефтезагрязнения. Выявлены направленные изменения в составе нефтяных компонентов, выражающиеся в уменьшении количества длинных метиленовых цепей в химической структуре экстрактов и увеличении кислородсодержащих групп и связей, перераспределении насыщенных углеводородов, в значительном увеличении коэффициента биодegradации ($\text{Pr}+\text{Ph}/\text{nC}_{17}+\text{nC}_{18}$). Все это свидетельствует об активном протекании процессов биодegradации, обусловленной окислительной деструкцией нефтяных УВ.

Таким образом, предлагаемый способ очистки почв криолитозоны от нефтезагрязнений легко доступен для исполнения, не требует осуществления дорогостоящих и трудоемких операций, позволяет достичь сравнительно высокого коэффициента деструкции нефтезагрязнения в мерзлотной почве, в условиях криолитозоны, о чем свидетельствуют выше приведенные результаты геохимических исследований, доказывающие протекание процессов биодegradации нефтяного загрязнения по направленному изменению его химического состава.

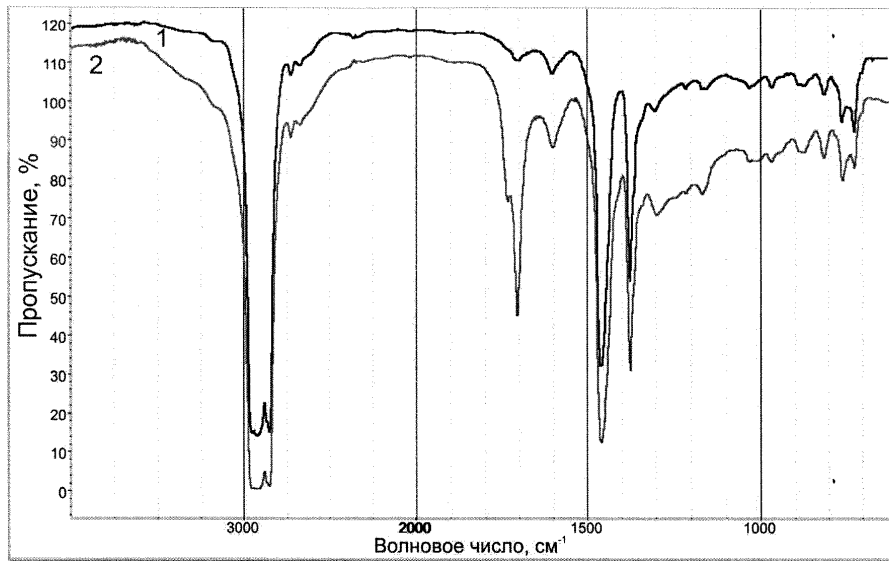
Таблица 1 – Результаты экспериментов по биологической очистке нефтезагрязненных мерзлотных почв

Характеристика экспериментального участка	Участок по биологической очистке		Контрольный участок (без очистки)	
	до очистки	после очистки	до очистки	после очистки
Уровень нефтезагрязнения, г/кг	155,7	35,151	168,509	152,128
Степень деструкции, %	77,4		9,7	
Групповой состав ХЭ, %:				
УВ	80,23	51,55	75,43	70,60
Бензольные смолы	3,70	10,11	10,37	12,28
Спирто-бензольные смолы	15,11	36,63	12,91	27,97
Сумма смол	18,81	46,73	23,28	27,97
Асфальтены	0,96	1,71	1,29	1,43
Групповой состав алкановых УВ, % на Σ идентифицированных алканов:				
$\Sigma \text{n.к.}-\text{nC}_{21}/\Sigma \text{nC}_{21}+\text{k.к.}$	1,49	1,29	1,23	1,33
Максимум n-алканов	$\text{nC}_{15,17}$	$\text{nC}_{15,17}$	$\text{nC}_{15,17}$	nC_{15}
Изопреноиды/n-алканы	0,34	0,89	0,38	0,36
Pr/nC_{17}	0,60	0,74	0,97	0,96
Ph/nC_{18}	1,26	5,95	1,57	1,56
$\Sigma \text{Pr}+\text{Ph}/\Sigma \text{nC}_{17}+\text{nC}_{18}$	0,89	4,17	1,23	1,23
Микробиологические характеристики				
Общая численность гетеротрофных бактерий, млн. КОЕ/г АСВ	309,0	792,4	98,1	442,3
Общая численность гетеротрофных грибов, млн. КОЕ/г АСВ	28,0	250,4	111,1	148,4
Общая численность актинобактерий, млн. КОЕ/г АСВ	-	1,2	0,1	1,0
ОМЧ, использующих органические формы азота, млн. КОЕ/г АСВ	-	529,4	82,2	300,4
ОМЧ, использующих минеральные формы азота, млн. КОЕ/г АСВ	-	163,3	21,2	92,3
Коэффициент минерализации органических соединений, усл.ед.	-	0,3	0,2	0,3
Азотфиксирующая активность, %	-	4,0	8,0	16,0
pH, усл.ед.	5,0	5,5	6,0	6,2
Относительная влажность, %	60,0	56,2	58,4	58,2

(57) Формула изобретения

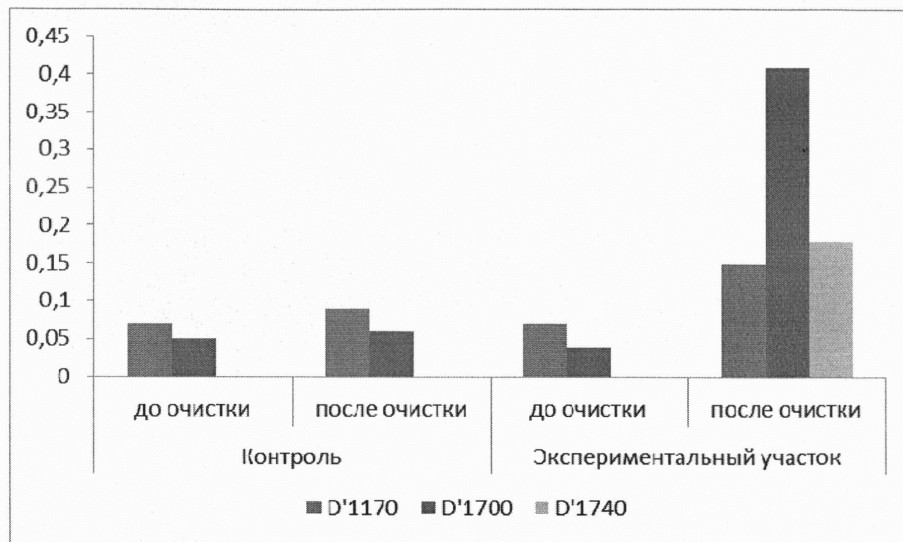
Способ очистки почв криолитозоны от нефтезагрязнений, предусматривающий выделение накопительной культуры аборигенных микроорганизмов - нефтеструктуров из мерзлотной почвы, взятой с места загрязнения, наработку накопительной культуры до достижения максимальной концентрации микробных клеток в накопительной культуре, иммобилизацию аборигенных микроорганизмов - нефтеструктуров на мерзлотную почву, отобранную с нефтезагрязненного участка, высушивание в естественных условиях «in situ» с последующим внесением полученных гранул в почву, в количестве, достаточном для эффективной дегradации нефтезагрязнений.

1

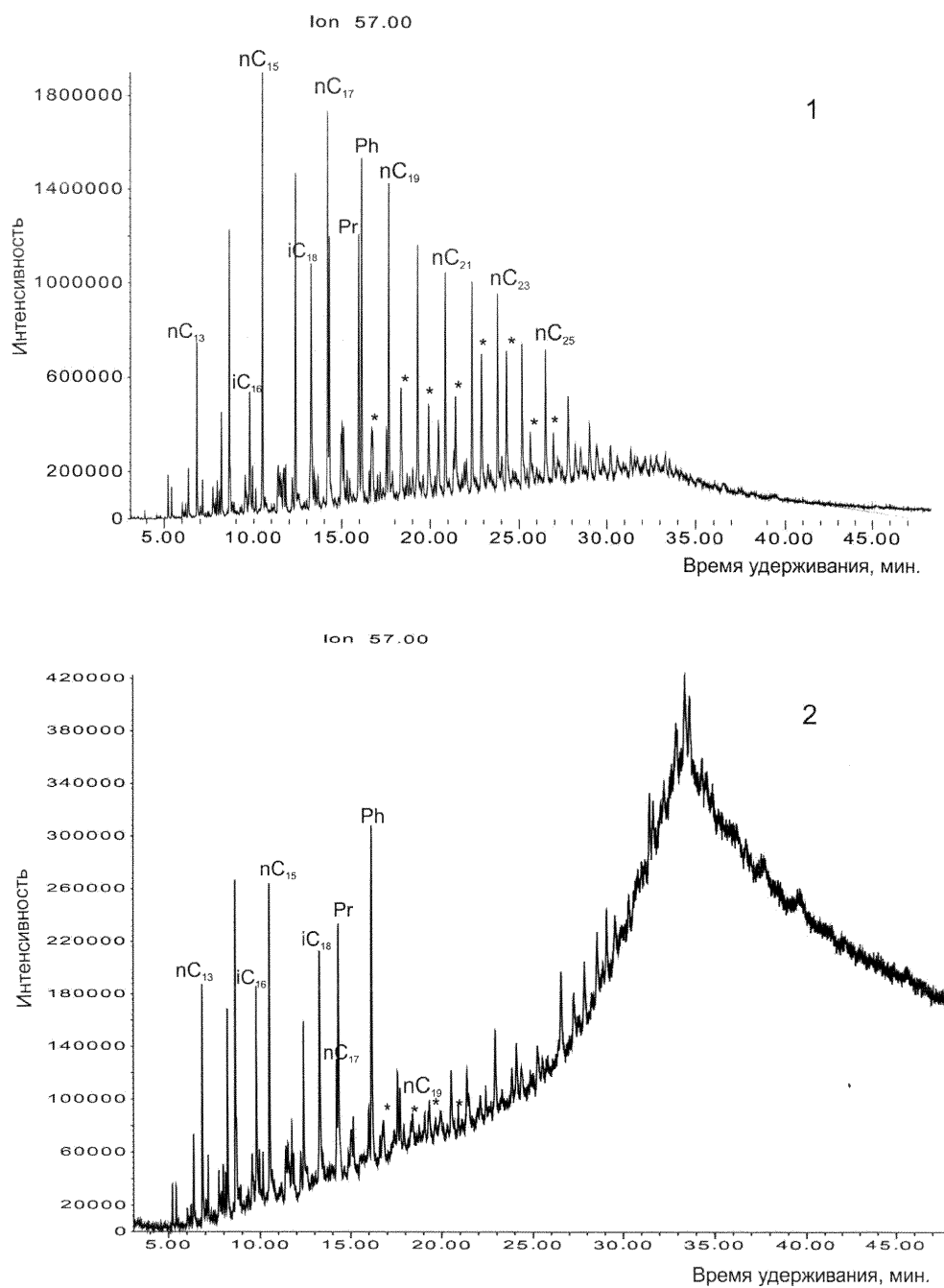


Фигура 1. ИК-спектры ХЭ проб почв, отобранных: на экспериментальном участке до биологической очистки (1); после очистки (2).

2



Фигура 2. Относительные коэффициенты поглощения кислородсодержащих групп в ИК-спектрах ХЭ. Условные обозначения: D'_{1170} – эфирные группы и связи C–O–C; D'_{1700} и D'_{1740} – карбонильные группы C=O.



Фигура 3. Масс-фрагментограммы (m/z 57) УВ ХЭ проб почв отобранных: на экспериментальном участке до биологической очистки (1); через год после очистки (2). Условные обозначения: nC_{13} - nC_{25} – *n*-алканы; *Pr* – *пристан*; *Ph* – *фитан*; * – 12- и 13-метилалканы