

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ИНСТИТУТ ГЕОХИМИИ  
ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НАЦИОНАЛЬНОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК УКРАИНЫ»

На правах рукописи

**ШКАПЕНКО ВИКТОРИЯ ВИКТОРОВНА**

УДК 550.4+550.43+550.47

**ГЕОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БИОТРАНСФОРМАЦИИ  
НЕПОЛЯРНЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ И СОЕДИНЕНИЙ ТЯЖЕЛЫХ  
МЕТАЛЛОВ В ДОННЫХ ОСАДКАХ**

Специальность 04.00.02 – геохимия

Диссертация на соискание научной степени  
кандидата геологических наук

Научный руководитель  
Горлицкий Борис Александрович  
доктор геолого-минералогических наук

Киев – 2016

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
РАЗДЕЛ 1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ВЛИЯНИИ НЕФТЕПРОДУКТОВ И ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ .....	11
1.1. Тяжелые металлы в донных осадках.....	13
1.2. Микроорганизмы и тяжелые металлы .....	23
1.3. Тяжелые металлы в нефти.....	26
1.4. Углеводороды в донных осадках.....	28
1.5. Биодеградация углеводородов .....	29
1.6. Выводы раздела 1 .....	34
РАЗДЕЛ 2. ОБЪЕКТЫ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	36
РАЗДЕЛ 3. ДОННЫЕ ОСАДКИ ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЫ ЧЕРНОГО МОРЯ (СЕВАСТОПОЛЬСКАЯ БУХТА, ПРИБРЕЖНАЯ ЗОНА КАРАДАГСКОГО ЗАПОВЕДНИКА).....	39
3.1. Донные осадки иловой фракции прибрежной зоны.....	39
3.2. Тяжелые металлы в донных осадках.....	53
3.3. Микроорганизмы в донных осадках Севастопольской бухты...	58
3.4 Выводы раздела 3.....	64
РАЗДЕЛ 4. ТРАНСФОРМАЦИЯ НЕПОЛЯРНЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ В ПРОЦЕССЕ ИНФИЛЬТРАЦИИ.....	65
4.1 Выводы раздела 4.....	78
РАЗДЕЛ 5. БИОХИМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ТРАНСФОРМАЦИИ НЕПОЛЯРНЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ .....	79
5.1. Исследование влияние глинистых минералов на рост и развитие углеводородокисляющих микроорганизмов.....	79
5.2. Моделирование трансформации неполярных углеводородов под действием консорциума углеводородокисляющих микроорганизмов.....	86
5.3. Моделирование гумификации углеводородов.....	95

5.4. Сорбция тяжелых металлов в процессе биодеструкции углеводородов в присутствии солей аммония.....	103
5.5 Выводы раздела 5.....	108
РАЗДЕЛ 6. РАЗРАБОТКА БИОМИНЕРАЛЬНОЙ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ОЧИСТКИ ТВЕРДЫХ ПОВЕРХНОСТЕЙ ОТ НЕФТЕПРОДУКТОВ.....	109
6.1 Выводы раздела 6.....	122
ВЫВОДЫ.....	123
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	126
Приложение 1 «Патент».....	138

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Загрязнение геологической среды нефтью и нефтепродуктами является одной из самых острых экологических проблем на сегодняшний день не только в Украине, но и во всем мире. Нефть и нефтепродукты попадают в окружающую среду на всех этапах обращения с ними от добычи и переработки, до транспортировки, хранения и использования. При попадании нефти в окружающую среду происходит не только загрязнение поверхностного слоя, но и более глубоких слоев геологической среды, что приводит к загрязнению грунтовых вод, донных осадков и других жизненно важных объектов жизнедеятельности человека. Нефтепродукты способны мигрировать в виде взвеси, коллоидных растворов, эмульсии, в газообразном состоянии, а также сорбироваться на частицах грунта и аккумулироваться в донных осадках.

Углеводороды, как в свободном состоянии, так и адсорбированные на твердых поверхностях под действием кислорода разрушаются за счет внедрения атома кислорода в углеводородную цепь. Попавшие в донные осадки, как в виде стоков, так и непосредственно осевшие из воды, они трансформируются как под действием микроорганизмов, так и растворимого в воде кислорода, в другие виды органических соединений, и соответственно, вызывают перераспределение тяжелых металлов накапливающихся в илах.

Попадание нефти в поверхностные воды морских акваторий приводит не только к загрязнению водной толщи и донных отложений, но и граничащих с ними слоев геологической среды, что создает угрозу безопасности жизнедеятельности человека.

В настоящее время нет однозначных критериев о взаимосвязи природы органического вещества и тяжелых металлов. Процессы трансформации нефтяных загрязнений, аккумулирующихся в илах под действием микроорганизмов, во многом являются невыясненными. В общем случае в теплых водах и при достаточном количестве кислорода процесс

трансформации нефтяных загрязнений, как правило, заканчивается их минерализацией с образованием диоксида углерода и воды, и требует продолжительного времени. Обычно для полной минерализации требуется не менее пяти лет. В условиях прибрежной зоны северного Причерноморья, этот процесс протекает в течение нескольких лет с образованием большого количества промежуточных сложных органических соединений, таких как кислоты, альдегиды, спирты, которые, взаимодействуя с тяжелыми металлами, могут вызывать как их поглощение нерастворимой частью органического вещества донных осадков, так и способствовать миграции тяжелых металлов в воду. Существенное влияние на этот процесс оказывают микроорганизмы, которые в зависимости от состава органического вещества могут перераспределять тяжелые металлы как между твердой фазой (минеральная фаза+органическое вещество), так и водной фазой. Этот процесс чрезвычайно сложный, многие факторы не выяснены и требуют проведения комплекса научных исследований. Учитывая высказанное, выяснение трансформации углеводородов в донных осадках и влияние на этот процесс глинистых компонентов и микроорганизмов, в настоящее время является актуальной задачей в экологии илов северного Причерноморья.

**Связь работы с научными программами, планами, темами.** Работа выполнялась в соответствии с планами научно-исследовательских работ Государственного учреждения «Институт геохимии окружающей среды» Национальной академии наук Украины: «Разработка моделей ресурсно-эколого-экономической оптимизации обращения с отходами производства и потребления» (2008-2010) государственный регистрационный номер темы 0111U002210; «Обоснование оптимальных направлений обращения с отходами производства и потребления в разных регионах Украины с учетом особенностей их хозяйственного развития и ландшафтно-геохимических факторов» (2011-2015) государственный регистрационный номер темы 0111U002570.

## **Цель и задачи исследования.**

Целью диссертационной работы является определение механизма биотрансформации углеводородов и геохимических особенностей сорбции тяжелых металлов в донных осадках.

Для достижения цели решались такие задачи:

1. По литературным данным рассмотрено и проанализировано загрязнение донных осадков прибрежной зоны Черного моря нефтепродуктами и тяжелыми металлами и пути их поступления; трансформация углеводородов под действием микроорганизмов и взаимосвязь этого процесса с тяжелыми металлами и другими факторами;
2. Исследован минеральный, химический и микробиологический состав иловой фракции донных осадков загрязненных нефтепродуктами на примере прибрежной зоны Севастопольской бухты и Карадагского заповедника;
3. Исследована трансформация неполярных углеводородов вследствие инфильтрации через слой почвогрунтов на примере грунтов нефтебазы «Борисполь» и исследовать изменение микробиологического состава почвогрунтов вследствие инфильтрации керосина;
4. В лабораторных условиях проведено биохимическое моделирование:
  - а) влияния глинистых минералов на рост и развитие микроорганизмов биодеструкторов нефтепродуктов;
  - б) трансформации неполярных углеводородов под действием биодеструкторов в условиях имитирующих донные осадки;
  - в) влияния ионов аммония на биотрансформацию нефтепродуктов;
  - г) сорбции тяжелых металлов биоминеральной композицией;
5. Разработана биоминеральная композиция и способ ее применения для удаления нефтемасляных загрязнений с поверхности твердых материалов.

**Объект исследования** – геохимические процессы биотрансформации неполярных углеводородов и сорбция тяжелых металлов в иловой фракции донных осадков.

**Предмет исследования** – иловая фракция донных осадков прибрежной зоны Черноморского побережья загрязненная нефтепродуктами.

**Научная новизна полученных результатов** заключается в следующем:

1. Впервые показано, что в иловой части донных осадков Севастопольской бухты, загрязненных нефтепродуктами, более 80% органических веществ представлены гумусом, который образовался вследствие процессов биогеохимического превращения нефтяных углеводородов.

2. Впервые установлено, что существенная часть тяжелых металлов (около 40%) в донных осадках находится в виде нерастворимых гуминоподобных полимеров, образовавшихся вследствие биогеохимических преобразований неполярных углеводородов. Около 30% тяжелых металлов находятся в виде низкомолекулярных соединений, до 20% - сорбировано на высокодисперсных минералах.

3. Впервые показано, что неполярные углеводороды в присутствии глинистых минералов и нефтеокисляющих микроорганизмов преобразуются в кислородсодержащие органические соединения. При этом происходит преобразование углеводородов в сложные гуминоподобные полимеры, которые при взаимодействии с активными центрами минеральных наночастиц донных осадков, увеличивают активную поверхность частиц, образуют новые активные центры, что способствует повышению их сорбционных свойств относительно тяжелых металлов.

**Практическое значение полученных результатов** состоит в том, что знания о формах нахождения тяжелых металлов и нефтепродуктов в донных осадках могут использоваться для прогнозирования загрязнения геологического и граничащих с ним сред (водных толщ, атмосферного воздуха) в прибрежных зонах морских акваторий.

На основании полученных результатов разработан способ очистки минеральных и искусственных поверхностей от нефтепродуктов, который защищен патентом Украины №107757 от 24.06.2016.

**Личный вклад соискателя.** Непосредственное участие автора в отборе образцов совместно с сотрудниками Института биологии южных морей и Карадагского природного заповедника. Анализ их минерального органического и микробиологического состава. Разработка биохимической модели трансформации нефтепродуктов под действием нефтеокисляющих бактерий и выявление роли минеральной фазы и ионов аммония на этот процесс.

Непосредственное участие автора в разработке способа очистки твердых минеральных поверхностей. Написание и оформление патента «Способ очистки минеральных и искусственных поверхностей от нефтепродуктов». Научные и научно-практические положения, которые выносятся на защиту и выводы получены лично автором. Автором рекомендовано использование солей содержащих аммоний для ускорения процессов разрушения углеводородов.

**Апробация результатов исследований.** Результаты работы докладывались и обсуждались на 7 конференциях: VII Международная научно-практическая конференция «Экологическая безопасность проблемы и пути решения», (Украина, Алушта 12-16 сентября 2011); Всеукраинская научно-практическая конференция «Экология городов и рекреационных зон». ІНВАЦ, (Украина, Одесса 31мая-01июня 2012); VI Международная молодежная научная конференция «Довкілля-XXI» (Украина Днепропетровск, 10-11 октября 2012); II Международная конференция «Современные ресурсосберегающие технологии. Проблемы и перспективы» Одесский национальный институт им. Мечникова, (Украина, Одесса 1-5 октября 2012); VIII Международная научно-практическая конференция «Экологическая безопасность проблемы и пути решения», (Украина, Алушта 10 – 14 сентября 2012); XIV Международная научная конференция «Львовские химические чтения – 2013», (Украина, Львов - 26-29 мая 2013);

Международная научная конференция «Современные проблемы литологии осадочных бассейнов Украины и смежных территорий» Институт геологических наук, (Украина, Киев 6-10 октября 2014).

**Публикация результатов исследования.**

По материалам диссертационной работы опубликовано 14 научных работ, среди которых 5 публикаций в профессиональных изданиях, 1 статья в издании Украины, которое включено в международные научометрические базы; 7 тезисов докладов на международных научно-практических конференциях; патент Украины №107757 от 24.06.2016 «Спосіб очистки твердих мінеральних та штучних поверхонь від нафтопродуктів» Лисиченко Г.В., Шкапенко В.В., Кадошников В.М., Мусич О.Г.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, 6 разделов, общих выводов, списка использованных источников включающих 140 наименований на 13 страницах, 1 приложения на 1 странице. Работа содержит 50 рисунков, 16 таблиц. Общий объем диссертационной работы изложен на 138 страницах печатного текста, из них основного текста 114 страниц.

**Соискатель выражает благодарность:**

Институту «Геохимии минералогии и рудообразования им. Н.П. Семененко» НАН Украины за помощь при проведении аналитических и физико-химических исследований.

Институту геологических наук НАН Украины и лично Парамоновой Н.К. за любезное предоставление образцов и совместное проведение исследований.

Карадагскую научную станцию им. Т.И. Вяземского – Карадагский природный заповедник за организацию отбора образцов и совместные исследования.

Сотрудников «ГУ Институт геохимии окружающей среды» НАН Украины - Писанскую И.Р. за проведение ИК-исследований; Мусич Е.Г. за

содействие в проведении микробиологических исследований; Кузенко С.В.за проведение измерений, Желяк Е.А. за всестороннюю техническую поддержку.

Особую благодарность автор выражает Кадошникову В.М. за всесторонне содействие, бесценные советы на всех этапах проведения экспериментальных и аналитических исследований.

## РАЗДЕЛ 1

### ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ВЛИЯНИИ НЕФТЕПРОДУКТОВ И ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ОС.

Одной из наиболее острых современных проблем является загрязнение окружающей природной среды нефтепродуктами и тяжелыми металлами. В связи с ежегодным повышением мирового потребления энергии, увеличиваются и масштабы загрязнения. Нефтегазовая энергетика и другие многочисленные производства оказывают многофакторное воздействие на окружающую среду в виде газообразных выбросов в атмосферу, сбросов сточных вод в водоемы, большого объема водопотребления, изменения ландшафтов, развития негативных геологических процессов. Наблюдается устойчивая тенденция повышения отрицательного антропогенного воздействия на водную среду в результате загрязнения нефтепродуктами и тяжелыми металлами.

В Украине существует большое количество районов с повышенными предельно допустимыми концентрациями нефтепродуктов и тяжелых металлов не только в воде и донных осадках, но и в грунтах (аэродромов, нефтебаз, нефтехранилищ, нефтеперерабатывающих заводов, нефтяных скважин, автостоянок, автозаправок).

Нефть, как природное соединение, вероятно, может включаться в метаболические процессы морских экосистем, отражая участие морских организмов в процессе биогенного переноса и самоочищения моря.

Определено несколько основных факторов негативного воздействия нефти на окружающую среду: образование микробных токсичных продуктов и летучих органических веществ, образующихся при разложении нефти, появление фитотоксичных грибов и конкуренции за элементы минерального питания между микрофлорой, разрушающей углеводороды и растениями, снижение концентрации кислорода. Воссоздание исходных биогеоценозов при таких серьезных сдвигах в системе почва-растение возможно лишь при

совместном применении микробиологических и агротехнологических приемов. [1].

Попавшая в почву нефть, в основном, концентрируется в верхнем дерново-подзолистом горизонте и переходит в негидролизуемый осадок в виде нерастворимых фракций, препятствующих доступу кислорода и воды в почву [2]. Помимо изменения физико-химических условий среды обитания почвенной микрофлоры, кардинальным образом изменяются условия её питания. Микрозональность существования микроорганизмов, в микробных сообществах почв незагрязненных ландшафтов, под влиянием нефти исчезает. Таким образом, при нефтяном загрязнении формируется классический пример «монокультурного развития сообщества» почвенной микрофлоры с отрицательными последствиями для растительного сообщества [3].

Помимо негативного воздействия на окружающую среду нефтяного загрязнения, существенное негативное влияние оказывают тяжелые и токсичные металлы.

Тяжелые металлы относятся к наиболее широко распространенным поллютантам водной и почвенной среды [4,5].

Они составляют значительную долю загрязнителей окружающей среды и по токсичности занимают второе место после пестицидов. Однажды попав в биогеохимический цикл, они крайне редко и медленно покидают его. [6,7].

Тяжелые металлы даже в ничтожных концентрациях ядовиты, однако свое токсическое действие они проявляют только в виде ионов.

Загрязнение природной среды ионами тяжелых металлов представляет большую опасность для биосферы. Помимо непосредственного токсического действия на живые и растительные организмы, тяжелые металлы имеют тенденцию к накоплению в пищевых цепях, что усиливает их опасность для человека. Попадая в водоемы, они длительное время находятся в наиболее опасной ионной форме, и даже переходя в связанное состояние (коллоидную

форму, донные осадки или другие малорастворимые соединения) продолжают представлять потенциальную угрозу.

Тяжелые металлы обладают способностью накапливаться в живых организмах, включаясь в метаболический цикл, образовывать высокотоксичные металлорганические соединения, изменять формы нахождения при переходе от одной природной среды в другую. Тяжелые металлы вызывают у человека серьезные физиологические нарушения, токсикоз, аллергию, онкологические заболевания, отрицательно влияют на зародыш и генетическую наследственность.

Среди тяжелых металлов приоритетными загрязнителями считаются свинец, кадмий, цинк, главным образом потому, что техногенное их накопление в окружающей среде идет высокими темпами. Эта группа веществ обладает большим сродством к физиологически важным органическим соединениям [8]. Такие элементы как ртуть, свинец, кадмий, медь, относят к «критической группе» веществ-индикаторов стресса окружающей среды.

Таким образом, загрязнение почв и донных осадков органическими и минеральными металлотоксикантами оказывает негативное влияние на ОС.

### **1.1. Тяжелые металлы в донных осадках.**

Особенностью тяжелых металлов в донных осадках является их способность легко аккумулироваться во взвешенных частицах и, депонируясь, создавать ситуацию хронического загрязнения водной толщи и донных отложений. [9].

Тяжелые металлы поступая в водоемы, включаются в круговорот веществ и подвергаются различным превращениям. Неорганические соединения связываются буферной системой воды и переходят в слаборастворимые гидроксиды, карбонаты, сульфиды и фосфаты, а также образуют металлоорганические комплексы, адсорбируются донными осадками. [10].

Труднорастворимые соединения тяжелых металлов, попадающие в состав донных отложений, могут быть вторичным источником загрязнения водоема. С изменением кислотности, окислительно-восстановительного потенциала, условий протекания процессов разложения органического вещества и других факторов может нарушиться равновесие между содержанием ионов тяжелых металлов в донных отложениях и в воде, что создает возможность для частичного растворения труднорастворимых соединений. От 20 до 50% соединений тяжелых металлов, входящих в состав донных отложений, достаточно легко могут перейти в растворенное состояние[11, 12, 13].

Сорбция тяжелых металлов донными отложениями зависит от особенностей их состава и содержания органических веществ. В частности, 5-10% свинца в донных отложениях связано с органическими веществами, особенно с гуминовыми кислотами. Тяжелые металлы в водных экосистемах концентрируются в придонных осадках и в биоте, тогда как в самой воде они остаются в сравнительно небольших концентрациях. [14].

Самоочищение от ионов тяжелых металлов происходит за счет целого ряда процессов: соосаждения с гидроокисями перечисленных выше металлов, сорбции ионов органическими коллоидами, и наконец, за счет образования сложных металлоорганических комплексов с гуминовыми кислотами. [15].

Характерной особенностью режима тяжелых металлов в водоемах замедленного стока, является направленность большинства внутриводоемных процессов на образование их труднорастворимых соединений и на их седиментацию [16].

Степень экологического воздействия тяжелых металлов определяется, в первую очередь, формами их нахождения.

Для понимания процессов миграции и аккумуляции тяжелых металлов важно учитывать и разграничивать источник их поступления в окружающую среду. Выделяют естественные и техногенные источники тяжелых металлов. Формирование илов донных осадков в значительной мере происходит за счет привнесения высокодисперсной части минералов грунтов, которая содержит тяжелые металлы [17, 18, 19, 20].

Естественным источником поступления тяжелых металлов в почвы являются горные породы (осадочные, магматические, метаморфические), на продуктах выветривания которых, сформировался почвенный покров. Осадочные породы, воды океана, живое вещество являются вторичным резервуаром, содержащим тяжелые металлы. Насыщенность разных горных пород тяжелыми металлами существенно различается, хотя в сравнении с другими химическими элементами их содержание в горных породах невелико. Кроме горных пород, естественными источниками тяжелых металлов для основных компонентов биосферы являются термальные воды и рассолы (Sr, As, Pb, V, Se, Cu и др.), космическая и метеоритная пыль, вулканические газы, вулканические извержения [21, 22].

Техногенное поступление тяжелых металлов в биосферу связано с разнообразными источниками. К важнейшим из них относятся:

1. Карьеры и шахты по добыче полиметаллических руд
2. Предприятия цветной и черной металлургии
3. Электростанции, сжигающие уголь
4. Сжигание различных отходов
5. Металлообрабатывающие предприятия
6. Автотранспорт

В дополнение к техногенным источникам тяжелых металлов, загрязняющих почву через атмосферу, часть их поступает в почвенный покров с удобрениями, пестицидами, осадками сточных вод, отходами промышленности и бытовым мусором. [23, 24]

Вещества могут поступать как в растворенной форме, так и в виде

взвешенных частиц (коллоидов, глинистого и обломочного материала). Количество поступающих соединений зависит от множества факторов и, в первую очередь, от наличия на водосборе локальных источников загрязнения, промышленных предприятий и населенных пунктов, степени сельскохозяйственной освоенности территории.

После поступления в окружающую среду они подвергаются различным превращениям с изменением валентности и растворимости. Например, металлургические предприятия, тепло- и электростанции выбрасывают тяжелые металлы преимущественно в нерастворимой форме, однако в ходе атмосферного переноса происходит постепенное их выщелачивание из минеральной (алюмосиликатной) матрицы аэрозольных частиц и переход в ионную, водорастворимую форму.

Аккумуляцию металлов в осадках контролируют и осуществляют пять основных процессов: адсорбционное поглощение мелкодисперсными частицами; седиментация дискретных металлсодержащих взвешенных веществ; соосаждение металлов с гидроксидами железа и марганца; ассоциация с органическим веществом; инкорпорация в кристаллической решетке [13, 19, 21].

Практически в каждом водоеме возможен свой механизм фиксации. Однако интенсивность каждого из перечисленных выше процессов определяется морфометрическими и гидрологическими характеристиками и гидрохимическим режимом водоема. Общая направленность процессов миграции металлов сверху вниз характерна для всех водоемов замедленного стока и определяет их общую тенденцию к самоочищению водных масс от вносимых в них любым путем соединений тяжелых металлов [12, 20].

Адсорбция минеральными веществами является наиболее эффективным способом уменьшения концентрации металлов в речных водах, причем основную роль играют взвешенные частицы. Донные отложения - чрезвычайно сложная сорбционная система, поскольку включает огромное количество минеральных и органических соединений, способных

сорбировать ионы и соединения тяжелых металлов, причем часто конкурирующих между собой за связывание металлов [24].

Общая последовательность, в которой располагаются природные сорбенты по их способности аккумулировать тяжелые металлы, такова: гидрат оксида марганца > гуминовые кислоты > гидрат оксида железа III > глинистые минералы [25].

Важным классом природных сорбентов являются органические вещества. Донные отложения водоемов замедленного стока, особенно высоко продуктивных, содержат значительные количества органики разного состава и свойств, способных удержать металлы в осадках. Частично это труднорастворимые вещества, осаждающиеся вместе со связанными с ними металлами, как, например соединение металлов с липидами. Эти комплексы после отмирания клеток хорошо сохраняются и, попадая в илы, обогащают их металлами. Наибольшую роль в связывании металлов играют гуминовые кислоты - конечный продукт распада органических остатков [26]. Связывая в комплексы тяжелые металлы в донных отложениях, гуминовые кислоты являются важнейшим фактором уменьшения их подвижности.

Высокомолекулярные органические вещества, подобные гумусу, могут также сорбироваться минеральной фазой осадков и, связывая затем металлы, выступать в роли "посредников" в процессе сорбции металлов. В работе [27] предложен следующий ряд металлов расположенный по силе абсорбции их твердым органическим веществом  $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Pb^{2+} > Zn^{2+}$ . Последним в ряду природных сорбентов представлены глины - коллоидная фракция (наночастицы) донных отложений.

Глины - это силикаты алюминия и магния со слоистоподобной структурой [28].

Взаимодействие их с металлами осуществляется в результате ионного обмена. Прочность связывания металлов глинами гораздо слабее, чем другими природными сорбентами. Глины, карбонаты и другие минералы

являются ядром для отложения оксидов железа и марганца. Поэтому фазу глинистых минералов рассматривают как механический субстрат, на котором осаждаются органические вещества и вторичные минералы [29].

Микроэлементы могут поступать в донные отложения не только сверху (из водной толщи), но и снизу, из глубинных слоев самих осадков. В глубоководных илах в восстановительных условиях это приведет к обогащению ими водных масс, в окислительных - к образованию трудно растворимых оксидов, что благоприятствует процессам самоочищения водных масс от соединений тяжелых металлов [30]. Распределение металлов, не участвующих в окислительно-восстановительных процессах, зависит, главным образом, от их поглощения организмами и сорбцией на абиотическом сестоне. Порядок сорбции металлов на природном иле и отдельных сорбентах (оксиды марганца, глины, гуминовые кислоты) таков:  $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$  [29].

Одним из важных факторов, влияющих на поглощение металлов осадками, является величина рН. Так, в отношении цинка увеличение рН выше 8.0 способствует переходу его растворенных форм в трудно растворимые гидролизованные. При более низких значениях рН, когда образование гидроксокомплексов и гидроксидов металлов выражено слабо (5.0 - 8.0), изменение рН влияет, главным образом, на поглотительную способность донных отложений. Закисление водной толщи озер вызывает уменьшение концентраций металлов по направлению к поверхности донных отложений (особенно таких мобильных как Cd, Zn, Ni, Cu). В результате, во-первых, происходит снижение скорости седиментации элементов вследствие уменьшенной адсорбции химических компонентов на осаждающихся частицах и, во-вторых, десорбции (растворения) соединений металлов из уже осажденного материала [31]. По относительному содержанию во взвесях, тяжелые металлы убывают в следующем порядке: Fe > Mn > Pb > Ni > Co > Cu > Zn > Cd. Такая последовательность объясняется высоким сродством

ионов  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  к глинистым лигандам. Сорбция на поверхности взвешенных частиц обеспечивается физической адсорбцией, катионным обменом, а также химической адсорбцией, характеризующейся образованием химических ассоциатов между ионами металлов и поверхностью частиц. Наибольшей сорбционной емкостью характеризуются взвешенные вещества с размером частиц от 0.05 мм и менее, которые в условиях высоких скоростей длительное время находятся в русловом потоке и играют определенную роль в межфазовом распределении тяжелых металлов в системе вода - взвешенное вещество. Максимальное содержание тяжелых металлов характерно для мелкодисперсных илистых образований, залегающих, как правило, в глубоководных зонах [32].

Содержания тяжелых металлов в различных гранулометрических фракциях донных отложений показало, что с уменьшением их размера происходит рост концентрации практически всех металлов. Наибольшую опасность представляют донные отложения с размером фракции < 0.05 мм. При изменении гидрологических условий водной среды они могут вовлекаться в речной поток и переносится на значительные расстояния. По мере перехода от песков к глинистым илам в среднем растет содержание металлов: Mn - в 10 раз, Cd - в 8, Co, Cu, Pb и Zn в 2-5 раз [33].

По данным Мур Дж. [34] можно выделить соединения, в форме которых тяжелые металлы локализуются в донных отложениях.

Кадмий - максимум содержания его отмечен в ассоциации с гидроксидами железа и марганца, не обнаружено связи с органическим веществом и карбонатами.

Кобальт - в целом характеризуется низким содержанием, а иногда и полным отсутствием мобильных форм, может находиться в нерастворимой форме.

Медь - в илах распределяется со следующей закономерностью: от 45% до 65% безвозвратно захороняется, 25-52% ассоциировано с органическим веществом, 2-15% - с гидроксидами, 3% - мобильные формы.

Свинец - характеризуется низким содержанием мобильных форм (0.6-10.9%). Основные же запасы распределяются между труднодоступными (40- 75%) и совершенно недоступными (26-48%) для гидробионтов формами.

Цинк - содержание мобильных форм составляет 3%. Основные запасы - 50-72% ассоциированы с оксидами железа и марганца.

В северном Причерноморье Украины основная часть тяжелых металлов поступает в акваторию в составе терригенного вещества. Закономерности его поступления обусловлены не только географическими и ландшафтными особенностями, но и геологическим строением района накопления. Концентрация меди в водной среде шельфовой зоны Черного моря определяется, главным образом, значительной геохимической подвижностью элемента. [35] Распределение меди в акватории имеет значительные сезонные колебания, которые обусловлены двумя главными факторами: интенсивным поступлением меди с речными водами и активной асимиляцией биотой. С речным стоком в весенние месяцы в акваторию поступает более 2/3 годового количества меди. Это приводит к тому, что весной очаги значительного повышения меди локализованы в тех частях акватории, которые граничат с устьевыми участками Днепро-Бугского лимана (до 20 мкг/л), Днестровского лимана (более 8 мкг/л), Дуная (превышает 10 мкг/л). По данным [36] средняя концентрация составляет 7,85 мкг/л в поверхностном слое вод и 6,18 мкг/л в придонном. Значительная роль планктона подтверждается тем, что содержание в планктонных формах меди в осадке может достигать 10-50% [37] Значительные локальные повышения содержания меди в воде, непосредственно связанные с прибрежными антропогенными источниками также, в большинстве своем имеют сезонный характер. Высокое содержание меди на участках моря, граничащих с

сельскохозяйственными площадями суши, является следствием использования ядохимикатов и удобрений [38]. Концентрация меди в донных отложениях шельфа связана, главным образом, с количеством терригенного вещества в осадках. В значительной мере это обусловлено наличием геохимических барьеров, что, в первую очередь относится к участку авандельты Дуная и дунайского взморья. [39]. Содержание меди во всех типах осадков увеличивается соответственно возрастанию примеси пелита и уменьшается при увеличении содержания  $\text{CaCO}_3$  [40]. Активная ассимиляция меди бентосными организмами приводит к ее накоплению в зонах развития раковинных отложений. Благодаря микробиологической активности сульфатредуцирующих бактерий в осадках, может происходить трехкратное обогащение медью органического вещества относительно исходного осадка. [41].

Содержание никеля в прибрежных морских незагрязненных водах в среднем составляет 1,8 мкг/л, но под антропогенным влиянием его содержание может увеличиваться до 2,5-15 мкг/л [42]. Для акватории прибрежной зоны главным источником поступления никеля является речной сток. В морской воде основная часть никеля, в отличие от речных вод, находится в виде раствора. Частичное его извлечение из воды осуществляется в процессе поглощения планктоном, который 500-кратно концентрирует элемент. [41]. Интенсивность миграции никеля в воде ниже интенсивности его биологического круговорота в 10 раз [43]. В биогеохимических циклах принимают участие и взвешенные твердые частицы [42]. Распределение никеля в донных отложениях акватории контролируют несколько основных факторов. Значительная связь со взвешенным веществом (80% от валового содержания [40]), где основной процесс обогащения никелем взвеси – сорбционное связывание [43]. Благодаря активным адсорбционным процессам и незначительной геохимической подвижности никель способен накапливаться в донных

отложениях в непосредственной близости от основных источников поступления [44]. Согласно исследованиям [42], накопление никеля в донных отложениях, особенно прибрежной зоны, коррелирует с активностью промышленных и бытовых источников загрязнения.

Цинк в морской взвеси тяготеет к терригенной составляющей [35], максимальной концентрации свойственна гранулометрическая фракция 0,001 мм [45]. Цинк является «универсальным загрязнителем», входящим в состав терригенных потоков почти всех источников. Он по общему объему превосходит поступление других металлов. Хорошо прослеживается сезонная динамика, подчеркивающая антропогенное происхождение цинка – в вегетационный период отмечается максимальное его содержание [46].

Механизм поглощения многозарядных катионов в донных осадках может быть рассмотрен на примере кобальта. Повышенные концентрации кобальта приурочены к прибрежным районам. Основными процессами, обуславливающими межфазовое перераспределение кобальта на границе река-море являются: выпадение основного количества взвешенного кобальта в осадок, переход части сорбированной на взвеси формы в раствор и активное извлечение биосом из взвеси [46] (интенсивность миграции кобальта ниже его биологического круговорота в 10 раз [47]). Согласно данным [46] по фоновому содержанию в донных осадках кобальт значительно отличается от других тяжелых металлов – концентрация элемента почти не зависит от вещественно-генетических типов вмещающих донных отложений.

Ванадий отличается низкой миграционной способностью, что является причиной приуроченности повышенных концентраций растворимой его формы к прибрежным районам моря. Фоновые концентрации ванадия соответствуют особенностям переноса, при котором значительная часть ванадия мигрирует в составе взвеси и ассоциирована со взвешенными

частицами среднего размера. Таким образом, максимальные значения по фоновому содержанию отвечают в г/т: алевритам 99 и глинистым илам – 98, содержание ванадия в глинисто-карбонатных илах 68 – почти в два раза превышает концентрации в карбонатно-глинистых отложениях – 37. Минимальные концентрации ванадия наблюдаются в песках и ракушечниках (13-47 г/т соответственно), хотя по некоторым данным [36], ванадию свойственна высокая степень аккумуляции раковинами моллюсков [46].

Таким образом, процессы накопления микроэлементов и тяжелых металлов в донных отложениях водоемов обусловлены многочисленными факторами. Их интенсивность зависит от химического и гранулометрического состава отложений, их типа, окислительно-восстановительных условий, pH среды, мощности осадков, а также сезона и метеоусловий. При этом для каждого водоема может быть свойственен свой механизм аккумуляции микроэлементов при сочетании некоторых перечисленных факторов.

## **1.2. Микроорганизмы и тяжелые металлы.**

Тяжелые металлы опасны тем, что они обладают способностью накапливаться в живых организмах, вмешиваться в метаболический цикл, образуя высокотоксичные металлокомплексы, содержащие органические соединения. Они быстро изменяют свою химическую форму при переходе из одной природной среды в другую, не подвергаясь биохимическому разложению. Еще у тяжелых металлов особое химическое свойство, присущее только им. Они катализируют многочисленные химические реакции, протекающие в любой сфере: окислительно-восстановительную, гидратацию, дегидратацию, циклизацию и изомеризацию, метилирование и деметилирование, возникновение двойных и тройных связей и многие др. [48].

Микроорганизмы проявляют устойчивость фактически ко всем тяжелым металлам. Благодаря способности быстро адаптироваться к условиям существования, они могут служить индикаторами изменений в окружающей среде. [49].

Токсичность тяжелых металлов по отношению к микроорганизмам зависит от таких факторов окружающей среды как pH, ионная сила, природа и концентрация катионов и анионов, а также наличия органических соединений, которые способны взаимодействовать с металлами и влиять на их биологическую доступность.

При взаимодействии тяжелых металлов и микроорганизмов необходимо учитывать изменения различных биохимических, физиологических, генетических и других особенностей микроорганизмов при их контакте с металлами в условиях чистой культуры. При исследовании аккумуляции тяжелых металлов микроорганизмами установлены способы проникновения и места локализации их в клетках, влияние физиологических параметров культуры и внешних условий на накопление металлов микроорганизмами. [50, 51].

Токсическое действие металлов на микроорганизмы проявляется в ингибировании их метаболизма, в изменениях кинетики роста и морфологии[52]. В качестве механизмов, обеспечивающих устойчивость микроорганизмов к воздействию тяжелых металлов, отмечают биологическую трансформацию и частичную детоксикацию некоторых из них [50].

Воздействие тяжелых металлов сказывается, прежде всего, на микроводорослях и цианобактериях. Они наравне с гетеротрофными микроорганизмами способны аккумулировать тяжелые металлы из воды и донных отложений. Соли серебра, ртути, кадмия, никеля, меди, кобальта нарушают барьерные свойства цитоплазматических мембран (ЦПМ) клеток, что, в свою очередь приводит к уменьшению трансмембранныго потенциала. Под действием ионов серебра, ртути изменяются электрофизические

свойства цитоплазматической мембранны и цитоплазмы клеток. Ванадий, содержащийся в большом количестве во всех нефтях и концентрирующийся в тяжелой фракции, оседающей в донных осадках, используется зелеными, бурыми и желто-зелеными водорослями. Он также содержится в нитрогеназах некоторых почвенных бактерий, хотя и не является необходимым элементом для развития большинства прокариотов. Наиболее активными биоаккумуляторами ванадия являются бактерии рода *Pseudomonas*, а также ряд цианобактерий. Такие свойства бактерий как способность к адаптации и быстрому размножению способствуют распространению микроорганизмов, устойчивых к тяжелым металлам в донных осадках. Наибольшей устойчивостью к металлам обладают бактерии, выделенные в местах, содержащих промышленные загрязнения, и в месторождениях соответствующих металлов. Особенно перспективным представляется использование темноокрашенных меланинсинтезирующих бактерий рода *Serratia* и *Pseudomonas* в роли индикаторов загрязнения среды. [53].

Большая часть тяжелых металлов необходима в микродозах для нормального функционирования живых систем. Однако при их передозировке наблюдаются нарушения жизнедеятельности всех живых организмов. Соединения ТМ не участвуют в нормальном обмене веществ, и их постепенное накопление ведет к различным заболеваниям.

По известной биологической классификации химических элементов тяжелые металлы принадлежат к группам микро- и ультрамикроэлементов. Cu, Zn, Mo, Co, Mn, Ni. Существуют и другие биологические классификации тяжелых металлов, основанные на их биохимическом поведении и физиологической роли, степени токсичности для живых организмов, степени биологического поглощения и др. [23]

Согласно классификации Дж. Вуда [54] к очень токсичным отнесены следующие химические элементы: Be, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Te, Rb, Ag, Cd, Au, Hg, Pb, Sb, Bi, Pt.

Тяжелые металлы разделяются на три класса:

1. As, Be, Cd, Hg, Se, Pd, Zn.
2. Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Sb.
3. V, W, Mn, Sr.

Некоторые тяжёлые металлы (Co, Cu, Ni, Zn и др.) в малых дозах могут играть необходимую роль в жизни микроорганизмов. В больших концентрациях они оказывают токсическое влияние [55]. Другие тяжёлые металлы (Cd, Pb, Hg и др.) не являются жизненно необходимыми и выступают в роли стрессовых факторов, воздействуя на различные физиологические функции и генетический аппарат микроорганизмов. Важным звеном в процессах переноса и биологической трансформации этих поллютантов являются микроорганизмы. [56].

Основная опасность для биологических объектов водоемов заключается в биоаккумулировании тяжелых металлов на клеточной стенке бактерий. [57].

Таким образом, изучение процессов биотрансформации неполярных углеводородов в донных осадках содержащих тяжелых металлов является не полностью выясненным и требует дальнейших исследований.

### **1.3 Тяжелые металлы в нефти.**

В состав нефти и пластовых вод нефтяных месторождений входят тяжелые металлы, которые представляют собой химические элементы с атомной единицей массы более 50. В золе нефтей обнаружены Fe, Mn, Cr, Co, Ni, V, Mo, Cu, Zn, Pb, Hg, Sn и др., среди которых выделяются элементы (V, Ni, Zn и др.), попавшие в нефть из живых организмов в далеком геологическом прошлом. При этом V и Ni в некоторых видах тяжелой нефти имеют концентрации, достаточные для их промышленного извлечения [58]. В большинстве нефтей содержание ванадия выше содержания никеля

отношение их постоянно для целого ряда нефей и битумов и зависит, в какой-то мере, от происхождения нефти [59, 60].

Основная масса ванадия сконцентрирована в асфальтенах и смолах, растворимых в спирто-бензоле, а никеля – асфальтенах и петролейно-эфирных маслах. В исследованных нефтях ванадий и никель-порфириновые комплексы в большом количестве концентрируются в спиртобензольных смолах, затем в асфальтенах и в значительном количестве в петролейно-эфирных маслах [60].

Металлорганические соединения ванадия, никеля, железа, меди, цинка и других металлов, содержащиеся в нефтях, в основном сосредоточены в гудроне, хотя некоторая часть их летучи и при перегонке переходит в масляные дистилляты. Содержание металлов в тяжелых дистиллятах составляет 0,01% от содержания их в остатке перегонки. Основная часть металлов связана со смолами и асфальтенами. При выделении из гудроносмолисто-асфальтеновой части 80% и более металлов выделяется вместе со смолисто-асфальтеновыми веществами. Значительная часть металлов находится в нефтях в виде металлопорфининовых комплексов. Содержание металлорганических соединений в нефтях с высоким содержанием гетероатомных соединений, смол и асфальтенов значительно – на два-три порядка выше, чем в малосернистых нефтях с низким содержанием смолисто-асфальтеновых веществ [61]. Ванадий и никель – являются главными из зольных элементов нефей и образуют комплексные соединения с органическими компонентами нефей [62].

К настоящему времени накоплено много данных о содержании металлов в различных нефтях [59, 63].

Содержание ванадия, никеля, меди, марганца и кобальта наиболее тесно связано с содержанием смол и асфальтенов и поэтому нефти, богатые смолами, также обогащены и микроэлементами. Отсюда можно заключить, что эти элементы ассоциированы с высокомолекулярными соединениями

нефти [64]. В асфальтенах концентрируется основное количество солей, золообразующих компонентов, соединений металлов, значительная часть азот-, кислород- и серосодержащих соединений. В асфальтенах, выделенных из остатков «Ромашкинской» нефти, содержится 58,5 % от всего ванадия и 54,0% от всего никеля. В асфальтенах «Самотлорской» нефти содержание ванадия составляет 0,0325-0,0549 %, «Хаудагской» нефти - 0,155%. В состав асфальтенов входят порфирины, которые являются наиболее химически активной их частью [65].

#### **1.4 Углеводороды в донных осадках.**

Донные отложения являются более информативным объектом исследований, чем вода. Это, обусловлено тем, что химический состав донных отложений, в отличие от водной среды, несет информацию об общем состоянии экосистемы, о природной и техногенной составляющей загрязнения в течение длительного периода времени.

Вследствие высокого коэффициента накопления токсикантов спектр обнаруживаемых в донных отложениях компонентов гораздо шире, что является более информативным, чем в воде, и позволяет отслеживать динамику накопления большего числа поллютантов. Вместе с тем, интерпретация состава и качества донных отложений затруднена вследствие того, что не изучены зависимость степени накопления токсикантов от гранулометрического состава донных осадков, а также разнообразие и неоднородность состава донных отложений не только в разных водных объектах, но и на отдельных участках одного водоема или водотока. Также отсутствуют утвержденные нормативы содержания контролируемых веществ (аналогичных ПДК для воды) для донных отложений.

Основная часть нефтепродуктов поступает в водоемы с промышленными и сточными водами в виде эмульсий, при разрушении

которых легкие фракции всплывают на поверхность и испаряются, а тяжелые опускаются на дно [66].

При авариях более 1000 т на небольших глубинах нефтепродукты довольно быстро достигают дна. В осадках умеренного климата последствия нефтяных разливов могут прослеживаться более 9 мес. В арктических условиях нефть сохраняется значительно дольше [67].

Деградация углеводородов происходит под действием химических и биохимических процессов особенно интенсивно в летнее время и приводит к увеличению смолистых компонентов. Даже в районах с постоянным поступлением нефтепродуктов углеводороды в донных осадках имеют нефтяной состав лишь в зимне-весенний период.

Физико-химические свойства (рН, Eh, натуральная влажность) и морфоструктура донных осадков (гранулометрический состав) определяют их способность к аккумуляции и преобразованию поступающих нефтяных загрязнений. Для Украины важным фактором, отражающим экологическое состояние северного Причерноморья, является системное изучение прибрежной зоны.

## **1.5 Биодеградация углеводородов.**

Основным механизмом биодеградации углеводородов в донных осадках является их разрушение под действием микроорганизмов. Микроорганизмы обладают таким метаболитическим аппаратом, который позволяет им использовать нефть и нефтепродукты как источник углерода и энергии.

Нефтепродукты – это комплексная смесь химических веществ. Каждый из них (бензин, авиатопливо, дизельное топливо, мазут и минеральные смолы) имеет свои индивидуальные физические, химические и биологические свойства [68].

Компоненты нефтепродуктов классифицируют по таким категориям: алифатические, алициклические, ароматические и полициклические ароматические углеводороды.

Алифатические углеводороды являются примером органических веществ, поддающихся биодеградации. Легче всего разрушаются алканы, дальше алкены и алкины [67, 69]. Компоненты, состоящие из прямых цепочек, легче деградируют, чем компоненты с разветвленной цепочкой. Биодеградация прямых цепей алканов происходит путем  $\beta$ -окисления. Во время этого процесса кислород присоединяется к концу углеводородной цепи, что приводит к образованию карбоксильной группы. От образованного соединения (жирной кислоты) отщепляется двухуглеродный фрагмент (ацетил). Этот процесс повторяется столько раз, сколько необходимо для расщепления целой молекулы. Прекращается  $\beta$ -окисление, когда доходит до разветвления в углеводородной молекуле.

Биодеградация алканов наиболее эффективна у компонентов с десятью атомами углерода в цепи. Более короткие структуры имеют тенденцию проявлять повышенную токсичность для многих микроорганизмов. Наиболее короткие алканы (метан, этан, пропан и бутан) присутствуют как газы и могут быть использованы как первичные субстраты или кометаболиты деградации [70].

Ароматические углеводороды могут деградировать во время аэробных и анаэробных биологических процессов [69]. Для аэробной деградации характерно присоединение кислорода к бензольному кольцу, что в результате приводит к образованию кахетола [71]. Далее молекула кахетола расщепляется в орто- или мета-положении. Конечные продукты этого процесса используются клеткой в анаболических путях.

В таких ароматических соединениях, как бензонаты и фенолы, двойные связи бензольного кольца сначала восстанавливаются путем присоединения водорода к молекуле, после чего кольцо расщепляется и модифицируется, что приводит к образованию насыщенных жирных кислот или дикарбоновых

кислот. Фенолы могут также деградировать через присоединение карбоксильных групп к кольцу с дальнейшим восстановлением до циклогексана и расщеплением кольца. В ароматических соединениях с заменителями (крезоли и толуолы с арилметильными группами) эти группы могут вначале окисляться с образованием карбоксильных групп (кислород и молекулы воды) с дальнейшим расщеплением кольца [72]. Бензол –monoароматическое соединение, деградация которого в анаэробных условиях происходит чрезвычайно медленно [73].

Биодеградация ароматических углеводородов, которая происходит в анаэробных условиях, часто сопровождается денитрификацией, восстановлением сульфата или продуцированием метана [74]. Анаэробное преобразование бензола и толуола, при котором происходит продуцирование метана, может быть охарактеризовано, как ферментативный процесс, при котором происходит частичное окисление и частичное восстановление субстрата с образованием метана и диоксида углерода как конечных продуктов [75].

На процессы биодеградации значительное влияние могут оказывать тяжелые металлы в виде многозарядных катионов. Например, трехвалентное железо и оксид марганца могут быть альтернативными акцепторами электронов при соответствующих условиях дефицита кислорода [75].

Ключевым отличием между биодеградацией нефтепродуктов, разлитых в грунт и водную среду, состоит в их способности к распространению в присутствии соответствующих веществ, которые могут изменять физические и химические свойства нефтепродуктов и их чувствительность к деградации микроорганизмами [76].

На поверхности воды, разлитая нефть формирует пленку [77]. Нефть, разлившаяся на грунт, чаще перемещается вертикально в глубину грунта и реже формирует пятна за счет горизонтального растекания. Просачивание (инфилтрация) нефти в грунт препятствует испарению легких углеводородов, которые могут быть токсичными для микроорганизмов.

Твердые частицы грунта могут уменьшать токсичность компонентов нефтепродуктов, абсорбируя их. Хотя абсорбция и адсорбция углеводородов в гумусную субстанцию может обуславливать формирование стойких комплексов углеводородов с компонентами грунта.

Темпы разрушения микроорганизмами многих органических соединений в водной среде пропорциональны к концентрации этих компонентов. Скорость минерализации таких высокомолекулярных ароматических углеводородов, как нафталин и фенантрен, больше связана с их растворимостью в воде, чем с общей концентрацией этих соединений.

Микробиологическая деградация длинных ( $\geq C12$ ) алканов, для которых растворимость меньше 0,01 мг/л [78], происходит быстрее, чем темпы растворения этих углеводородов [79]. Скорость деградации таких углеводородов напрямую зависит от площади поверхности частиц этих углеводородов, с которой может прямо взаимодействовать микробная клетка – редуцент [80]. При образовании эмульсий этих углеводородов площадь поверхности существенно возрастает, повышая, таким образом, скорость биодеградации. Из этого следует, что темпы биодеградации многих углеводородов не зависят от их концентрации, в отличие от большинства органических соединений [81]. Концепцию максимальной или пороговой концентрации для микробиологической деградации углеводородов можно применять также к грунтовым экосистемам.

На биодеградацию нефтепродуктов влияет температура и pH среды [82]. Низкие температуры увеличивают вязкость нефти, уменьшают летучесть токсичных алканов с короткими цепями и увеличивают их растворимость в воде [83, 84].

Повышенные температуры (от 30 до 40°C) увеличивают скорость метаболизма углеводородов до максимума, но повышают токсическое действие углеводородов на мембранные клеток [85]. Устойчивы к таким условиям термофильные алканутилизирующие бактерии [86].

Выбросы углеводородов в водную среду, которая содержит низкую концентрацию неорганических веществ, часто приводит к повышению соотношения углерод/азот и/или соотношения углерод/фосфор в среде, что, в свою очередь, может не очень позитивно влиять на рост и деление микроорганизмов [87, 88]. Наличие достаточного количества азота и фосфора может быть лимитирующим фактором при биодеградации сырой нефти или бензина в грунте и грунтовых водах. Внесение необходимого количества фосфата мочевины, комбинированных азотно-фосфорно-калийных удобрений или солей аммония и солей ортофосфорной кислоты в грунт, может существенно усиливать биодеградацию этих нефтепродуктов [89, 90].

Таким образом, анализ изученных литературных источников показал, что нефтяные углеводороды, попавшие в донные осадки, под действием микроорганизмов разрушаются с образованием разнообразных органических веществ различной природы. На этот процесс существенное влияние оказывают высокодисперсные вещества, температура, pH и т.д. Образовавшиеся органические соединения, взаимодействуя с тяжелыми металлами, изменяют их миграционные свойства и в зависимости от условий окружающей среды могут, как накапливаться в осадках, так и мигрировать в окружающую среду с включением токсичных металлов в трофические цепи.

В настоящее время нет однозначного мнения о механизме трансформации углеводородов микроорганизмами в присутствии тяжелых металлов. Решение этой проблемы является актуальной как с научной точки зрения, так и с прикладной.

## 1.6. Выводы раздела 1

1. Тяжелые металлы, находящиеся в донных осадках, в зависимости от условий среды могут образовывать как нерастворимые, так и подвижные комплексные соединения, загрязняющие прибрежную акваторию и способствовать накоплению тяжелых металлов в бентосе.

2. Подвижные формы тяжелых металлов, поглощаясь микроорганизмами, могут существенным образом изменять их биологические свойства. В качестве механизмов, обеспечивающих устойчивость микроорганизмов к воздействию тяжелых металлов, отмечают биологическую трансформацию и частичную детоксикацию некоторых из них.

3. Существенное влияние на процессы биотрансформации оказывают тяжелые металлы, непосредственно находящиеся в нефтяных углеводородах. Металлорганические соединения ванадия, никеля, железа, меди, цинка и других металлов, содержащиеся в нефтях, в основном сосредоточены в гудроне, хотя некоторая часть их летучая и при перегонке переходит в масляные дистилляты. При биодеградации таких веществ тяжелые металлы, выделяясь из субстрата, могут оказывать общетоксическое действие.

4. Физико-химические свойства (рН, Eh, натуральная влажность) и морфоструктура донных осадков (гранулометрический состав) определяют их способность к аккумуляции и преобразованию поступающих нефтяных загрязнений.

5. Микроорганизмы обладают таким метаболитическим аппаратом, который позволяет им использовать нефть и нефтепродукты как источник углерода и энергии. Биодеградация прямых цепей алканов происходит путем присоединения кислорода к углеводородной цепи, что приводит к образованию карбоксильной группы с последующим разрывом длинной углеводородной цепи на углеводороды с короткой цепью, вплоть до образования метана. Кроме того под действием ферментов выделяемых микроорганизмами происходит разрыв высокоэнергетического ароматического

кольца  $C_6H_6$  с образованием углеводородов с короткой цепью. При повышенных температурах и избытке кислорода деградация углеводородов сопровождается их полной минерализацией с образованием воды и диоксида углерода. При низких температурах и недостатке кислорода как линейные, так и ароматические углеводороды могут трансформироваться в высокомолекулярные нетоксичные вещества составляющие основу гумуса. На этот процесс могут оказывать влияние поливалентные катионы (марганец и др.) способные подобно кислороду участвовать в окислительно-восстановительных реакциях и способствовать деградации углеводородов. Существенное влияние на процесс биодеградации оказывают соединения азота, которые в определенных термодинамических условиях способствуют трансформации нефтяных углеводородов в гуминоподобные полимеры.

## РАЗДЕЛ 2

### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Образцы придонных илов отбирались в районе Севастопольской бухты у «Памятника Затопленным кораблям» в двух точках. Образец №1 отобран на северной стороне у входа в бухту в 50м от берега на глубине 20 м. Образец №2 отобран на расстоянии 100м от памятника вглубь бухты на глубине 50м. Образцы представляли собой вязкую легкоподвижную суспензию со слабым «специфическим» запахом. Содержание твердой фазы составляло 60-70%. Из отобранной части был выделен осадок, который выпаривался при температуре, не превышающей 60-70С<sup>0</sup>. Из этого образца был приготовлен аналитический препарат.

Также были отобраны донные осадки, вблизи прибрежной зоны Карадагского заповедника от мыса «Мальчин» до бухты «Биостанция», за период 2009-2013 гг. Образцы представлены крупнозернистым песком, состоящим преимущественно из кальцита кварца, аморфных форм кремнезема и полевых шпатов с незначительной примесью глинистых минералов, представленных гидрослюдой, каолинитом, монтмориллонитом, содержащим незначительное количество нефтепродуктов.

В качестве биодеструкторов нефтяных загрязнений использовались препараты «Эконадин» и «Эконадин-2» (ТУ У 37.2-30171732-001:2008). Эти препараты представляют собой порошок коричневого цвета, дисперсный либо с волокнистыми включениями, плавучий, гидрофобный. Препараты приготовлены на основе бактерий-деструкторов и измельченного торфа. Эти биодеструкторы предназначены для удаления нефтепродуктов с поверхности грунтов и воды. Препарат выпускается организацией НВП «ЭКОНАД» Украина, 65026 Одесса. Препарат биодеструктор «Родекс-Т» (ТУ У30165603.004-2001), содержит ассоциацию нефтеокисляющих микроорганизмов. Препарат предназначен для биодеградации сырой нефти и нефтепродуктов при загрязнении ими почв, водоемов акваторий, внутренних

поверхностей резервуаров. Производитель ЧП «БТУ-Центр» Украина 24321, Винницкая область г. Ладыжин.

Также использовались микроорганизмы *Cladosporium cladosporioides* (штамм F 162) и *Thielavia terrestris* (штамм 238).

В качестве нефтепродукта использовался образец нефти из Глинско-Розбышевского месторождения ЦППНИГ, с. Качаново, Полтавская обл. Данная нефть имеет плотность  $0,85\text{г}/\text{см}^3$ , принадлежит к легким нефтям, и содержит 30% легких фракций с низким (менее 0,8%) содержанием ароматических компонентов (смол и асфальтенов).

В качестве исходного вещества, как компонента нефтепродукта использовалось очищенное трансформаторное масло (Т-1500 ГОСТ 982-80), не содержащее ароматических углеводородов.

В качестве минеральной фазы, имитирующей глинистые компоненты почвы, использовалась бентонитовая глина из месторождения ООО ДАШБЕНТ (Черкасская область, Украина), которая более чем на 85% представлена щелочноземельным монтмориллонитом. Помимо него в глинистой фракции присутствует палыгорскит и высокодисперсная гидрослюдя (иллит). Песчаная фракция представлена в основном кристаллами кварца и кальцита. Кроме того, в незначительном количестве присутствуют акцессорные минералы и аморфные гидроксиды железа и марганца. Также в высокодисперсной части глины обнаружены аморфные сферолиты размером до 100 мкм, которые представлены аморфной формой кремнезема, железа, титана. Общее количество неглинистых минералов не превышает 10%.

Минеральный состав отобранных образцов оценивался по данным рентгеновского фазового анализа выполненного на рентгеновском дифрактометре ДРОН УМ с использованием медного антикатода.

Содержание органического вещества в образцах оценивалось по количеству органического углерода, который определялся по методу Тюрина [91].

Для выделения нефтяных углеводородов (НУ) использовался хлороформный метод, который заключается в том, что сухой остаток донных отложений экстрагируется хлороформом в экстракторе «Сокслета», при температуре  $50\text{-}60^{\circ}\text{C}$  в течение 5-6 часов. При этом в результате экстракции в колбе приемнике экстрактора концентрировались углеводороды, растворимые в хлороформе (хлороформная фракция). После завершения экстракции образец донных осадков высушивался до постоянной массы при температуре  $105^{\circ}\text{C}$ . Содержание нефтяных углеводородов оценивалось по их количеству в хлороформном экстракте. Количество углеводородов в хлороформном экстракте определялось в сухом остатке по количеству Сорг после полного удаления хлороформа.

Количество нефтепродуктов оценивалось на анализаторе «МИКРАН»

Для определения гуминовых кислот в донных отложениях использовалась методика согласно требованиям ISO 10694 [91]. Зная содержание органических веществ в исходном образце и после экстракции, вычисляли количество гуминовых кислот (ГК).

Природу органических веществ в илах оценивали по данным ИК-спектроскопии. Исследования выполнялись на спектрофотометре UR-20, по стандартной методике.

Содержание тяжелых металлов в твердой фазе определялось по данным спектрального эмиссионного анализа. Измерения выполнялись на спектрометре СТ-1 из кратера угольного электрода. А в жидкой фазе атомно-абсорбционным методом на спектрометре A-8500.

Оптические измерения образцов проводили на поляризационном микроскопе МИН-5.

## РАЗДЕЛ 3

### ДОННЫЕ ОСАДКИ ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЫ ЧЕРНОГО МОРЯ (СЕВАСТОПОЛЬСКАЯ БУХТА, ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЫ КАРАДАГСКОГО ЗАПОВЕДНИКА).

#### **3.1. Донные осадки иловой фракции прибрежной зоны.**

Накопление тяжёлых металлов в донных осадках, особенно в верхнем слое, обуславливается возникновением устойчивых техногенных аномалий с соответствующими им ареалами экологического риска для бентосных сообществ и районами вероятного вторичного загрязнения [92].

Абсолютные значения концентраций металлов изменяются в очень широких диапазонах и зоны повышенных концентраций не всегда определяются близостью к источнику загрязнения, в результате чего весьма сложно определить уровень загрязнения, и связанную с ним величину фактора риска для биологических сообществ. В районах влияния города Севастополя концентрации Cu, Co, Cr, V, Ti в донных осадках превышают их естественно-природное содержание [93], а никеля – в бухте Казачья, что указывает на наличие источников антропогенного загрязнения, характеризующихся различными количественным и качественным составом, дискретностью поступления и местоположением.

Для изучения трансформации и накопления нефтепродуктов и тяжелых металлов в донных осадках, были отобраны донные отложения прибрежной зоны Черного моря. Образцы отбирались в районе Севастопольской бухты и прибрежной зоны Карадагского природного заповедника. Выбор Севастопольской бухты был обусловлен тем, что многолетняя эксплуатация судов в ее акватории связана с неоднократными разливами и сбросами нефтесодержащих веществ в воду. Углеводороды, попавшие в воду, частично разлагаются микроорганизмами, а частично, сорбируясь на минеральных частицах, оседают на дно и накапливаются в виде неразрушенных

углеводородов. В некоторых наиболее загрязненных участках, содержание нефтяных углеводородов может достигать до 3% [94].

На рис. 3.1 приведена спутниковая фотография Севастопольской бухты, на которой отмечены точки отбора проб.

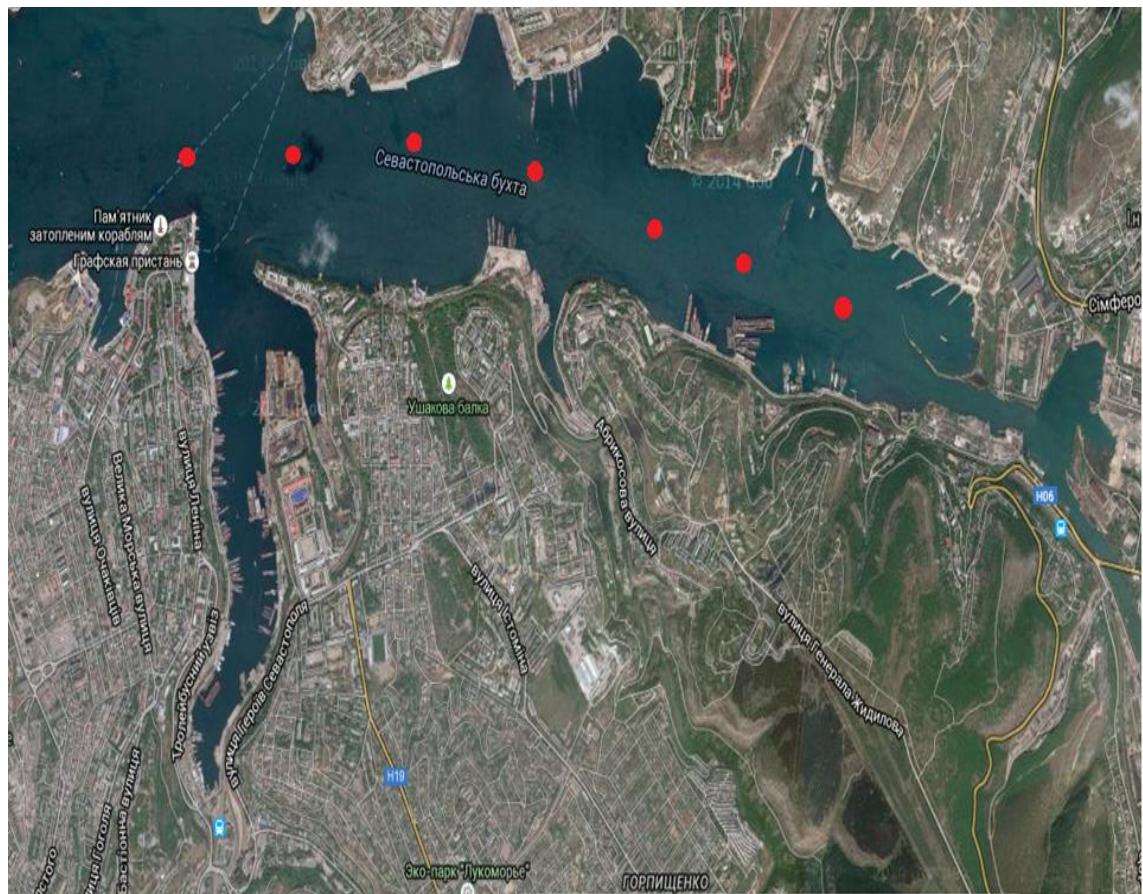


Рис.3. 1. Спутниковый снимок Севастопольской бухты с точками отбора проб донных осадков.

Минералогический анализ отобранных образцов показал, что донные отложения центральной части Севастопольской бухты представлены песками с незначительной примесью иловых отложений. На рис. 3.2. представлена типичная дифрактограмма исследованных песков. Из приведенной дифрактограммы видно, что пески в основном представлены кристаллами кальцита, кварца и полевых шпатов с примесью аморфных частиц кремнезема.

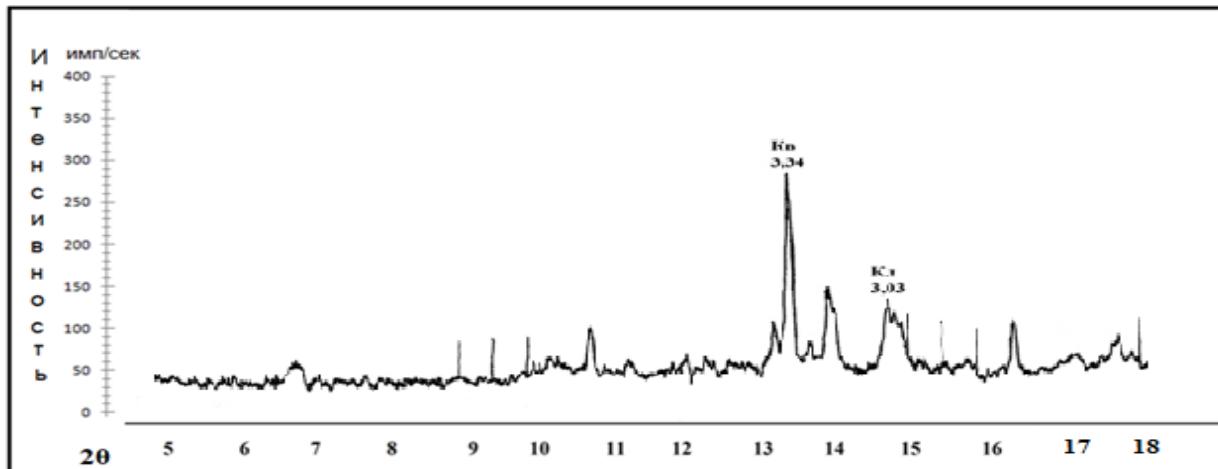


Рис. 3.2 Дифрактограмма песчаной фракции донных осадков Севастопольской бухты.

Для сравнения исследовались прибрежные донные осадки Карадагского заповедника, как участка с минимальной антропогенной нагрузкой. На рис. 3.3 представлен спутниковый снимок прибрежной зоны Карадагского заповедника, на котором указаны точки отбора образцов.



Рис. 3.3 Спутниковый снимок прибрежной зоны Карадагского природного заповедника и точки отбора образцов донных осадков.

Анализ показал, что донные отложения прибрежной зоны в основном представлены грубыми песками. Минеральный состав донных осадков прибрежной зоны Карадагского заповедника был близким по составу и отличался от песчаной фракции Севастопольской бухты повышенным содержанием глинистых частиц, в основном, представленных иллитом и монтмориллонитом. На рис. 3.4. приведена типичная дифрактограмма таких образцов.

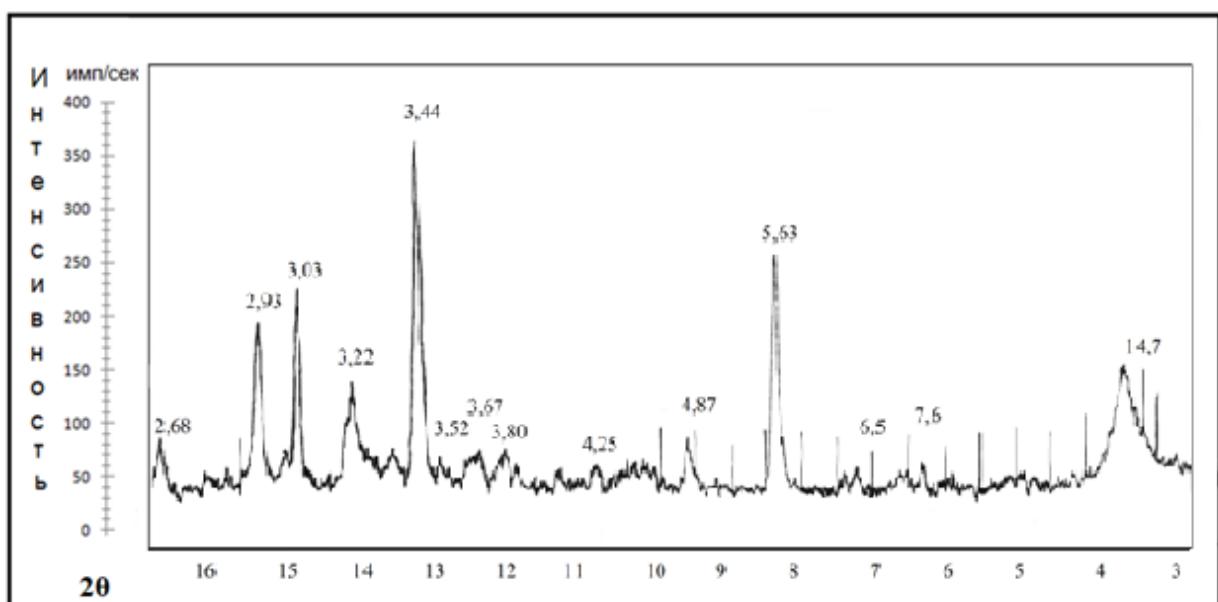


Рис. 3.4. Дифрактограмма песчаной фракции донных осадков прибрежной зоны Карадагского заповедника.

Помимо этих минералов в песчаной фракции присутствует небольшое количество акцессорных минералов (цеолиты, аметисты, бариты, сердолик, пириты и др.). Исследованная песчаная фракция содержала незначительное количество органических веществ, содержание которых не превышало 0,1%. Органические вещества, как правило, концентрируются в иловой фракции. Для выделения иловой фракции из донных осадков прибрежной зоны Карадагского заповедника использовали метод «отмучивания» [95].

Для этого в стакан емкостью 2л. помещали 150 гр. сырых донных осадков. Полученная смесь заливалась 2л. свежей морской воды соленостью 17 %. Смесь перемешивалась механической мешалкой в течение 60 минут и оставлялась в покое на 12 часов. Образовавшаяся взвесь осторожно сифоном переносилась в выпарную чашку, выпаривалась и досушивалась при температуре  $105\pm1^{\circ}\text{C}$  до постоянного веса. Полученный сухой остаток измельчался в агатовой ступке до фракции – 100 мкм и в дальнейшем использовался для аналитических исследований. На рис. 3.5 представлена дифрактограмма иловой фракции Севастопольской бухты.

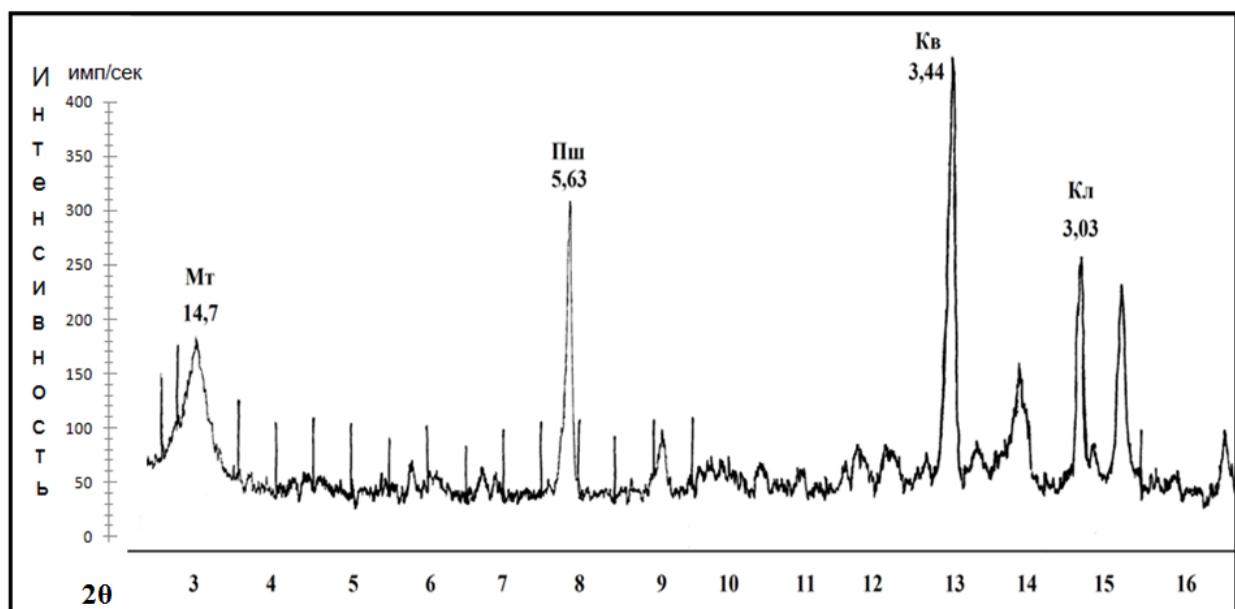


Рис. 3.5 Дифракторамма иловой фракции донных осадков Севастопольской бухты. (Мт –монтмориллонит; Пш – полевой шпат; Кв – кварц; Кл – каолинит.)

Из полученных данных видно, что минеральный состав иловой фракции представлен высокодисперсным кальцитом и кварцем, а также глинистыми минералами - монтмориллонитом, каолинитом, иллитом. Количество органических веществ, оцененное по методу Тюрина [96] не превышало 1-1,5%. Значительно большее количество органических веществ накапливалось в иловой фракции донных отложений Севастопольской бухты. Для исследования отбиралась иловая фракция донных отложений в районе «Памятника затопленным кораблям».

Отбор иловых отложений в данном районе был обусловлен особенностю течений, которые направлены от створа бухты в ее глубину, где встречаются с течением стоков реки «Черная». В результате в центральной части бухты образуется круговорот, что приводит к оседанию всех взвешенных веществ и их накоплению в районе «Памятника затопленным кораблям» (рис.3.6.)



Рис. 3.6. Схема течений в Севастопольской бухте.

Зонами устойчивого загрязнения морских экосистем являются области схождения разнородных водных масс в акваториях бухт и эстуарий [97]. Загрязняющие вещества распределяются неравномерно, образуя зоны повышенных уровней загрязнения: в эвтрофическом слое, фронтальных зонах и поверхностном слое донных осадков [40].

Отбор придонных илов проводился профессиональными дайверами из ИНБЮМа, по стандартной методике, утвержденной в этом институте. Образцы придонных илов отбирались в районе Севастопольской бухты у «Памятника Затопленным кораблям» в двух точках. Образец №1 отобран на

северной стороне у входа в бухту в 50м от берега на глубине 20 м. Образец №2 отобран на расстоянии 100м от памятника вглубь бухты на глубине 50м. Образцы представляли собой вязкую легкоподвижную суспензию со слабым «специфическим» запахом. Содержание твердой фазы составляло 60-70%. Из отобранной части был выделен осадок, который выпаривался при температуре, не превышающей 60-70C<sup>0</sup>. Из этого образца был приготовлен аналитический препарат.

Иловая фракция Севастопольской бухты, как и иловая фракция придонных илов прибрежной зоны Карадагского заповедника, состоит из высокодисперсных кальцита и кварца. В отличие от илов прибрежной зоны Карадагского заповедника, илы Севастопольской бухты содержат значительно больше глинистых минералов и особенно органических веществ. Минеральный состав илистой и песчаной фракции донных образцов Севастопольской бухты приведен в таблице 3.1.

Таблица 3.1

### **Минеральный состав иловой и песчаной фракции донных осадков Севастопольской бухты.**

Иловая фракция донных осадков	Песчаная фракция донных осадков
Кальцит	Кальцит
Кварц	Кварц
Полевой шпат	
Монтмориллонит	

Отличительной особенностью илов Севастопольской бухты является высокая степень загрязнения их органическими веществами.

Существенное влияние на поглощение нефтепродуктов иловыми отложениями оказывает присутствие в них глинистых минералов.

Таким образом, особую ценность для изучения поведения нефти в морских экосистемах представляет информация о взаимодействии нефти со

слоистыми силикатами. Это связанно с особенностями поглощения нефтепродуктов глинистыми минералами.

В ряду глинистых минералов монтмориллонит обладает наименьшей степенью поглощения нефти [98] хотя его влагоемкость и способность сорбировать многие поллютанты значительно выше, чем у других глинистых минералов.

Исследования, выполненные [99] в 2008-2015 гг. показали, что при поглощении углеводородов, находящихся на поверхности воды, слоистыми силикатами важнейшую роль играет их дисперсность. Особенность поглощения неполярных углеводородов глинистыми минералами в присутствии воды определяется специфической

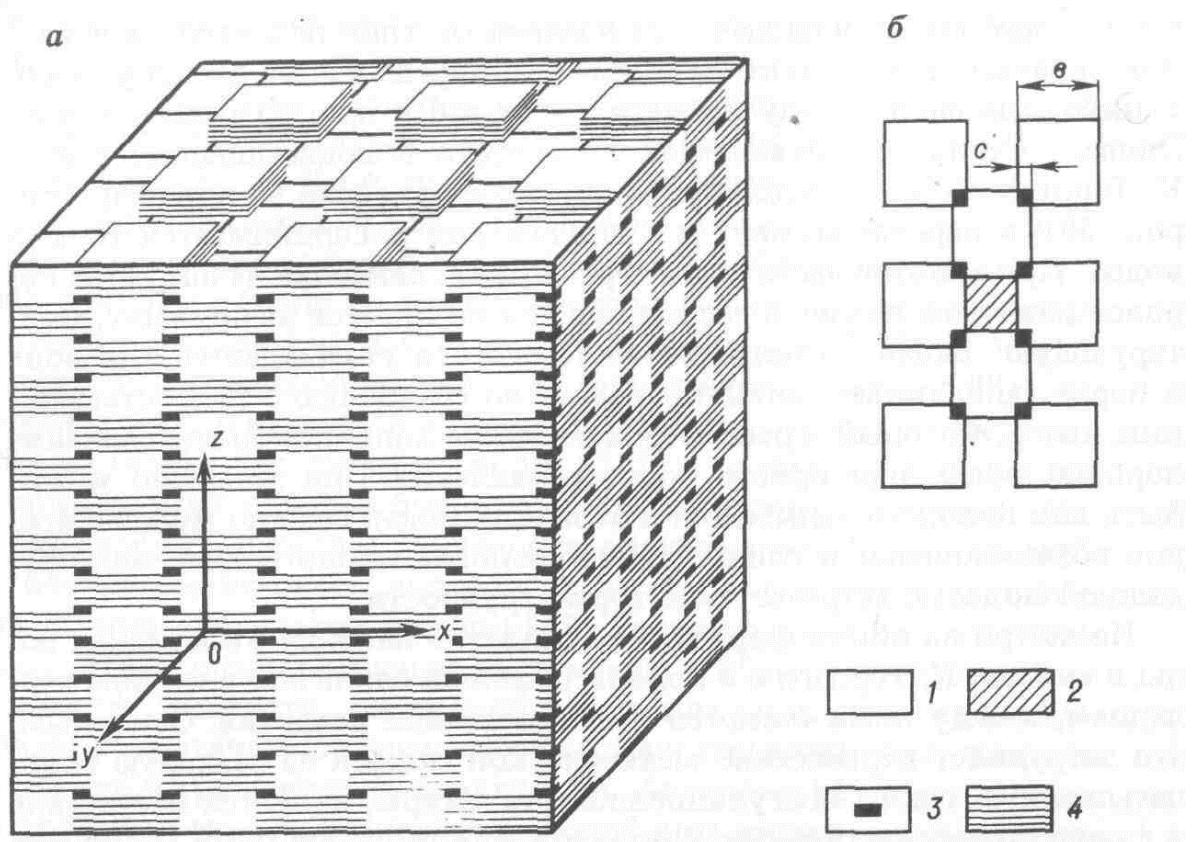


Рис. 3.7. Физико-химическая модель водонаполненной глины.

а – общий вид модели; б – фрагмент модели (вид сверху в пл.  $xy$ ); 1 – сквозные макропоры в пл.  $\parallel xy$ ; 2 – не сквозные макропоры в пл.  $\perp xy$ ; 3 – микропора; 4 – микроагрегаты глинистых частиц [100].

структурой глинистых агрегатов [101]. Согласно физико-химической модели (рис. 3.7) [100] глинистые агрегаты состоят из микроагрегатов, которые образуются вследствие наложения кристаллитов базальными гранями друг на друга.

В результате такой самоорганизации в глинистых агрегатах образуется сложная система макро- и микропор, доступных как для молекул воды, так и для углеводородов. Каналы, по которым происходит поглощение воды глиной, практически недоступны для углеводородов. [99]. В текстуре глинистых минералов существуют специализированные поры, по которым могут мигрировать либо молекулы полярных веществ – вода, либо неполярных – углеводороды.

Основное количество гидрофильных центров глинистых минералов находится на ребрах, углах, сколах, и представлены, в основном, силанольными и алюминольными центрами. В связи с тем, что на входе в эти каналы создается высокий потенциал для лиофобных компонентов, внедрение углеводородов в эти капилляры маловероятно. В то же время образование микроагрегатов обусловлено наложением микрокристаллов глины друг на друга. Наличие гидрофобных центров на базальных гранях глинистых частиц делает возможным внедрение неполярных углеводородов между микрокристаллами в глинистых микроагрегатах. Такая структура микроагрегатов позволяет углеводородам относительно легко внедряться между микрокристаллами глин, в то время как внедрение углеводородов в межслоевое пространство глинистых минералов практически невозможно. Последнее обстоятельство многократно подтверждено исследованиями, выполненными в институте Колloidной химии НАН Украины, под руководством Овчаренко Ф.Д.

Из предложенной схемы строения глинистых агрегатов становится очевидным, почему для илов сложенных относительно крупными глинистыми частицами (каолинит, дикит) содержание нефтепродуктов выше, чем для илов преимущественно смектитового состава (монтмориллонит, нонtronит и др.).

Таким образом, становится понятным, почему в сухом остатке иловой фракции, минеральный состав которого сложен высокодисперсными кальцитом, кварцем, монтмориллонитом, иллитом, общее содержание органических веществ не превышало 3%.

Помимо общего содержания органического углерода в донных осадках Севастопольской бухты, определялось количество нефтяных углеводородов (НУ) (хлороформная фракция) и гумуса.

Для выделения НУ использовался хлороформный метод, который заключается в том, что сухой остаток донных отложений экстрагируется хлороформом в экстракторе «Сокслета», при температуре 50-60°C<sup>0</sup> в течение 5-6 часов. При этом в результате экстракции в колбе приемнике экстрактора концентрировались углеводороды, растворимые в хлороформе (хлороформная фракция). После завершения экстракции образец донных осадков был извлечен из центральной части экстрактора и высушивался до постоянной массы при температуре 60-70°C<sup>0</sup>. Содержание нефтяных углеводородов оценивалось по их количеству в хлороформном экстракте. Количество углеводородов в хлороформном экстракте определялось в сухом остатке по количеству С<sub>орг</sub> после полного удаления хлороформа.

Для определения количества гумуса в донных отложениях использовалась методика согласно требованиям ISO 10694 [91]. Высушенные после экстракции хлороформом образцы обрабатывались 0,1n раствором гидроксида натрия при соотношении Т:Ж – 1:50, при температуре 60-70 °C в течение двух часов на магнитной мешалке. Для выделения гуминовых кислот щелочной экстракт корректировался 10% раствором серной кислоты до pH-2.

Выпавшая гуминовая кислота отделялась от жидкой фазы раствора фильтрованием, промывалась водой и высушивалась.

Исследования показали, что содержание нефтяных углеводородов в образцах донных осадков Севастопольской бухты не превышает 0,25% от массы сухого образца, а гумуса составляет до 3% соответственно. В компонентном составе преобладают водорастворимые органические соединения, что указывает на большую потенциальную способность органического вещества к преобразованию.

Полученные препараты - хлороформная вытяжка, гуматы и гуминовая кислота исследовалась методом ИК-спектроскопии рис 3.8. На рис. 3.8. представлены ИК-спектры исходного образца иловых осадков Севастопольской бухты, а также его хлороформный экстракт, и гуматы извлеченные из этого образца.

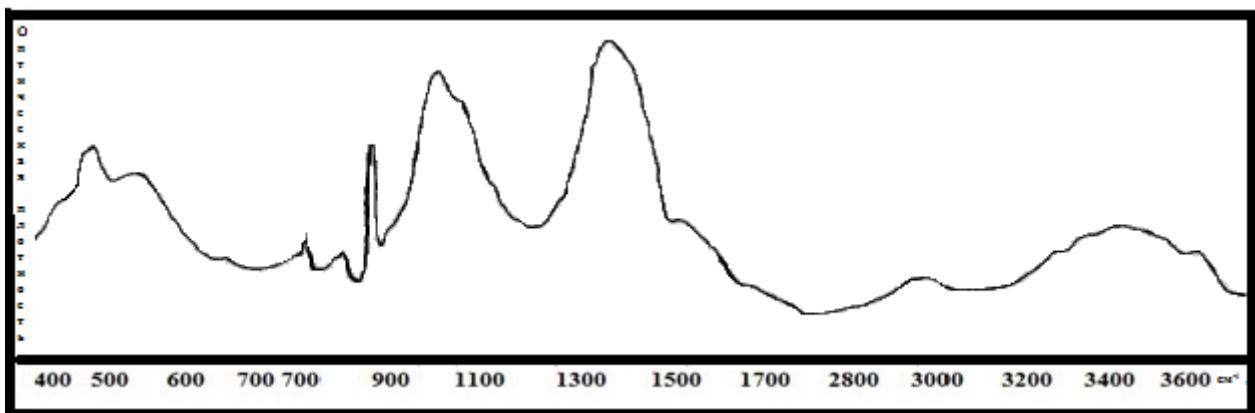


Рисунок 3.8. а) ИК-спектры исходного донного образца №1.

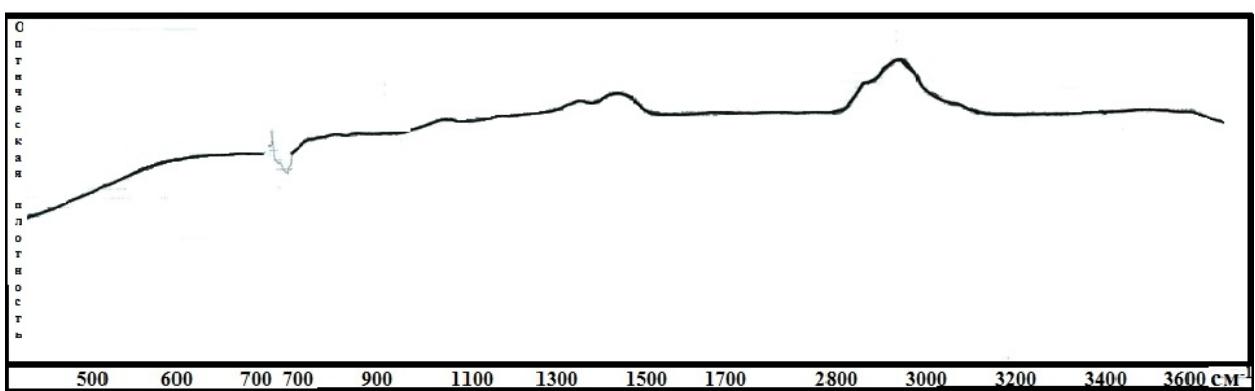


Рисунок 3.8. б) ИК-спектры хлороформного экстракта донного образца №1.

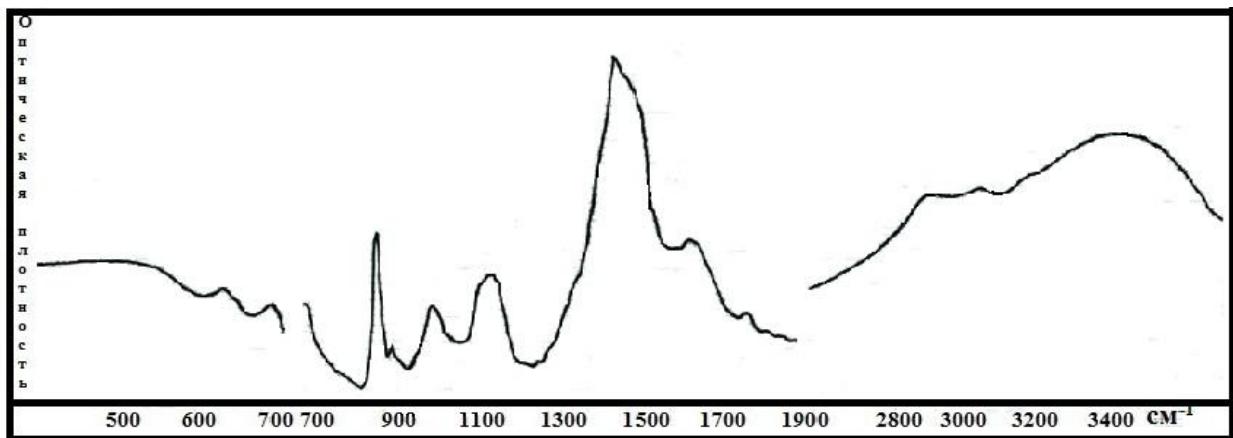


Рисунок 3.8. в) ИК-спектры щелочного экстракта донного образца №1.

Учитывая, что ИК-спектры образцов №1 и №2 были идентичны, также как и продукты их выщелачивания (хлороформная, щелочная фракция - гуматы) в работе представлены лишь данные по образцу №1.

Исследования ИК-спектров (рис. 3.8.) показали, что в ИК - спектре исходного образца №1 (рис.3.8. а) присутствуют полосы поглощения в области  $785\text{-}805\text{cm}^{-1}$  ( $\text{Si-O-Si}$ ) колебания, сильные полосы поглощения карбоната кальция в области  $880$  и  $1450\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), деформационные колебания молекулярной воды в области  $1620\text{cm}^{-1}$  и валентные колебания в области  $3450\text{cm}^{-1}$ . Не смотря на то, что по данным рентгеновской дифрактометрии, в исходном образце не регистрируются рефлексы от смектитовых минералов, в ИК-спектрах четко фиксируются полосы в области  $3630\text{ cm}^{-1}$  которые связаны со структурными валентными колебаниями  $\text{OH}$  – групп в глинистых минералах и адсорбционно связанный воды. Отсутствие рефлексов на рентгенограмме, вероятно, следует объяснить тем, что количество глинистых минералов не велико, а их дисперсность настолько велика, что не дает возможности для формирования рентгеновского рефлекса фиксируемого дифрактометром. Для более тщательных ИК-исследований нами из донных илов были выделены фракции нефтепродуктов.

Анализ хлороформных экстрактов (рис. 3.8. б) показал, что в полученных спектрах присутствуют только полосы поглощения С-Н групп, относящиеся к углеводородам ( $2800\text{-}3000\text{cm}^{-1}$ ).

ИК-спектр сухого остатка щелочных вытяжек донных отложений приведен на рис.3.8.в). Аналитический препарат для этих исследований изготавливается традиционным методом при прессовании 2мг сухого остатка щелочных вытяжек с KBr. Полученные ИК – спектры можно интерпретировать следующим образом: полоса  $870\text{cm}^{-1}$  относится к деформационным СН-колебаниям; полосы  $870\text{-}903\text{cm}^{-1}$  могут быть отнесены к деформационным СН-колебаниям; полоса  $1005\text{cm}^{-1}$  может интерпретироваться как колебания ароматических колец, которые составляют неотъемлемую часть гуминоподобных полимеров; полоса  $1140\text{cm}^{-1}$  относится к ассиметричным валентным колебаниям в сложных и простых эфирах типа -С-O-С-; интенсивная полоса при  $1455\text{cm}^{-1}$  может относиться к деформационным СН колебаниям находящихся как в ароматических кольцах так и в алифатических цепочках; полосу  $1630\text{cm}^{-1}$  и  $1760\text{cm}^{-1}$  можно интерпретировать как валентные колебания карбонильных групп; полоса  $1760\text{cm}^{-1}$  соответствует колебанием =C=O группы, полоса  $1630\text{cm}^{-1}$  интерпретируется как -C=O, кроме того в этой области могут присутствовать деформационные колебания - OH групп; в области  $3440\text{cm}^{-1}$  в спектре наблюдается широкая интенсивная полоса, которая обуславливается валентными колебаниями - OH групп, как в органическом веществе так и связанной с ними молекулой воды.

Сравнивая приведенный спектр с ИК-спектрами гуминовых кислот выделенных щелочным методом из торфа (рис 3.9.) и анализируя полученные данные, мы считаем, что органическое вещество донных осадков растворимое в щелочах представлено преимущественно гуматами, для которых характерно наличие системы ароматических конденсированных колец сочлененных с алифатическими цепочками несущих, как правило, основное

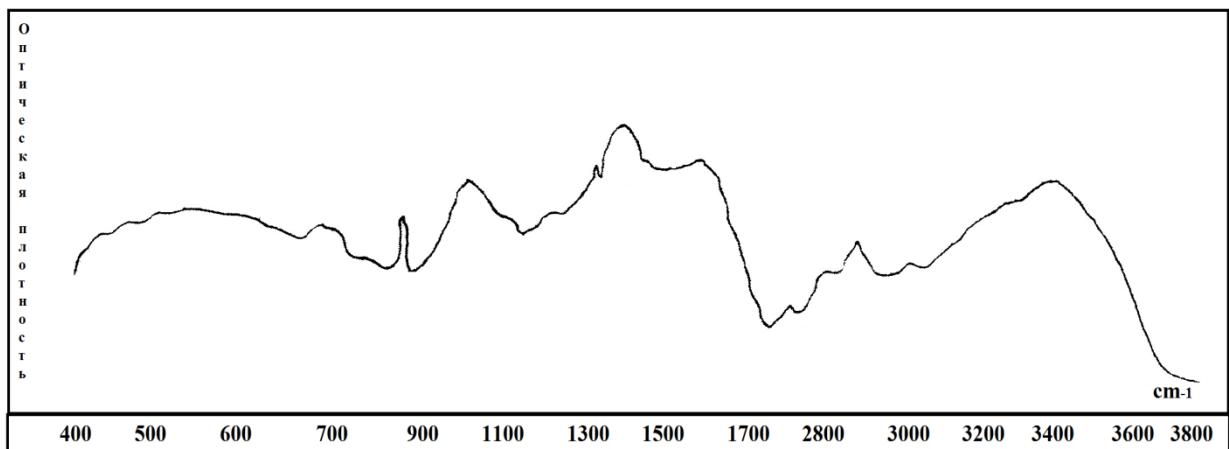


Рис. 3.9. ИК-спектр гуминовой кислоты выделенной из торфа.

количество функциональных групп (карбонильных, карбоксильных, аминогрупп и др.), наличие этих групп в гуминоподобных полимерах обеспечивает им высокое сродство к катионам тяжелых металлов. Образование гуматов из нефтепродуктов может быть связано с деятельностью некоторых нефтеокисляющих микроорганизмов в условиях недостатка кислорода.

Высокое содержание гуматов и относительно низкое содержание углеводородов в органическом веществе донных осадков связано с трансформацией углеводородов в гуматы под действием микроорганизмов. Более подробно этот вопрос рассмотрен в разделе 5.

Изучение донных отложений Севастопольской бухты и прибрежной зоны Карадагского заповедника показало, что песчаная фракция в основном представлена кварцем и кальцитом с незначительной примесью глинистых минералов. Песчаная фракция, как правило, содержит незначительное количество органических веществ, содержание которых не превышает 0,1%.

Минеральный состав иловой фракции донных отложений представлен высокодисперсным кварцем, кальцитом и глинистыми минералами (монтмориллонит, иллит, каолинит).

Содержание органических веществ в иловой фракции значительно выше, чем в песчаной и составляет для илов Севастопольской бухты 1-5%.

Иловая фракция донных осадков Севастопольской бухты состоит из углеводородов растворимых в хлороформе, хлороформная фракция и гумуса (таб. 3.2). Не смотря на высокое загрязнение Севастопольской бухты углеводороды, составляют не более 20% от общего содержания органических веществ.

Таблица 3.2

### **Содержание органических веществ в донных осадках.**

<b>Фракции органических веществ</b>	Севастопольская бухта	Карадагский заповедник
Углеводороды (хлороформная фракция)	0,21%	0,05%
Гуматы (щелочная фракция)	2,76%	0,245%
Общее содержание	2,97 %	0,25%

Сравнивая количество органических веществ в донных отложениях Севастопольской бухты с их количеством в прибрежной зоне Карадагского заповедника можно предположить, что накопление органических веществ в Севастопольской бухте происходит вследствие загрязнения техногенными нефтепродуктами, которые под воздействием нефтеокисляющих микроорганизмов превращаются в гуминовые вещества.

### **3.2. Тяжелые металлы в донных осадках.**

Важнейшим критерием, определяющим токсичность донных осадков помимо нефтепродуктов, являются тяжелые металлы [102]. Микроэлементы попадают в донные осадки в результате процессов седиментации и оказываются аккумулированными поровыми и внутренними водами, карбонатами, глинистыми минералами, органическим материалом, гидроксидами железа, оксидами марганца, сульфидами, силикатами, компонентами биоты. Важным фактором, влияющим на адсорбционную

способность ионов тяжелых металлов, является размер частиц осадка. Распределение гранулометрических фракций в поверхностном слое донных осадков Севастопольской бухты определяется морфометрическими и гидрологическими факторами. Тяжелые металлы в донных осадках присутствуют, главным образом, в трех формах: в виде хорошо растворимых соединений в поровых водах, в адсорбированном виде и в виде нерастворимых соединений неорганической природы (сульфидов, оксидов, гидроксидов и др.) и нерастворимых органо-минеральных соединений [103].

Определение содержания тяжелых металлов в образцах проводилось методами атомно-абсорбционной и эмиссионной спектроскопии и приведены в табл.3.2.

Таблица 3.2

### **Тяжелые металлы в донных осадках Севастопольской бухты.**

СОДЕРЖАНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛОВ								
МГ/КГ								
№ п.п.	Наименование образца	Mn	Ni	Cr	Zn	Cu	Pb	Sn
1	Образец №1 (донные осадки)	600	100	200	1000	1000	2000	1000
3	№1-хлороформный экстракт	200	20	50	600	200	500	300
5	№1-щелочной экстракт	300	50	100	400	600	1200	500
2	Образец №2 (донные осадки)	600	100	300	1000	1200	1500	700
4	№2-хлороформный экстракт	200	40	100	500	250	250	200
6	№2-щелочной экстракт	250	60	150	300	600	1000	300

Характерной особенностью меди является способность сорбироваться на взвешенных веществах и частицах донных осадков путем адсорбции на поверхности гидроксидов железа и марганца, участвовать в процессах

ионного обмена с глинистыми минералами и взаимодействовать с высокомолекулярными органическими соединениями. Содержание меди на выходе из бухты составляет 780-1880мг/кг, [103] наши измерения показали, что в образце №1 отобранном на выходе из бухты содержание меди составляло 1000мг/кг, а несколько далее вглубь бухты концентрация увеличилась до 1200 мг/кг. Учитывая, что в районе заповедной зоны Карадагского заповедника, в которой антропогенная составляющая загрязнения является минимальной, а содержание меди составляет 40 – 50 мг/кг, повышенное содержание меди в донных осадках Севастопольской бухты связанно с антропогенным влиянием.

Известно, что медь концентрируется в минеральной и органической компонентах осадка [104]. В образце №2 при общем содержании меди 1200 мг/кг экстракция щелочным раствором уменьшила содержание меди в образце до 600 мг/кг. Можно допустить, что медь поглощается не только глинистой компонентой, но и органическими соединениями, содержащими гуминоподобные полимеры. Этот вывод не является абсолютным и требует дополнительных исследований. В реальных условиях процессы, накладываясь один на другой, затрудняют интерпретацию полученных экспериментальных данных. Медь характеризуется как слабо подвижный элемент. В целом она проявляет себя как типично техногенный металл.

Содержание цинка в иловых отложениях Севастопольской бухты на порядок больше, чем в иловых отложениях прибрежной зоны Карадагского природного заповедника, причем значительное количество находится как в хлороформной фракции, так и во фракции органических веществ, основным компонентом которых являются гуматы. Большое количество цинка в хлороформных экстрактах связано с образованием сложных комплексных соединений с кислород содержащими компонентами нефтепродуктов, растворимых в хлороформе. Загрязнение донных осадков Севастопольской бухты цинком, связано [103], с функционированием морского флота и в частности с использованием цинка и олова в противообрастающих красках

содержащих полимерный материал, растворяющийся в углеводородах. Учитывая высокую комплексообразующую активность гуминовых веществ ко многим многозарядным катионам, в том числе цинку, не исключена вероятность образования хелатных комплексов цинка с гуминовыми веществами, накапливающимися в иловой фракции донных осадков. В целом распределение цинка, как и меди, носит ярко выраженный техногенный характер.

В отличие от цинка и меди загрязнение донных осадков свинцом и никелем мало зависит от содержания в них органических соединений, при этом их природа мало влияет на это загрязнение.

Загрязнение осадков соединениями хрома и никеля в основном связано с антропогенной деятельностью. В отличие от вышенназванных элементов, содержание марганца в донных отложениях Севастопольской бухты меньше чем в относительно чистых отложениях прибрежной зоны Карадагского заповедника, что связано с его геохимическими особенностями.

Ведущую роль в распределении марганца играют внутриводоёмные процессы. Учитывая, что, Севастопольская бухта является заливом эстуарного типа, в процессе взаимодействия распресненных вод, которые сформировались в бухте (соленость 13-14 %), с более солеными водами открытой части Черного моря, значительная часть марганца выпадает в осадок. Поэтому его содержания в количестве 250 – 300 мг/кг приурочены к району выхода из бухты. При определенных гидрологических ситуациях марганец выносится из Южной бухты и, попадая в качественно иные окислительно-восстановительные условия района выхода из бухты, переходит в нерастворимые формы, повышая концентрацию Mn в донных осадках [103, 105].

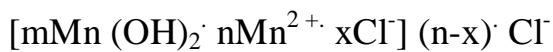
Ион Mn<sup>2+</sup> энергетически очень устойчив, в аэробных условиях он окисляется в десятки-сотни тысяч раз медленнее, чем Fe. Скорость окисления Mn (II) зависит от величины pH, концентрации O<sub>2</sub> и температуры среды и

растет с их увеличением. Различают биотическое (под действием микроорганизмов) и абиотичне (небиологическое) окисления Mn (II). Существенное влияние на сорбцию и осаждения марганца оказывает образования его коллоидов.

Образование коллоидов в этих условиях объясняется тем, что в слабо соленой воде (13-14 %) при pH 7-8, ионы Mn (II) образуют нерастворимый гидроксид по схеме:



Образующийся гидроксид марганца конденсируется в виде наночастиц которые в присутствии органических веществ, играющих роль стабилизатора, образуют устойчивые коллоидные частицы. В общем случае состав коллоидных частиц может быть выражен формулой:



где m - количество гидроксида марганца в конденсированной части коллоида; n - количество ионов марганца адсорбированных на поверхности ядра конденсированной частицы, которые определяют его полный электрохимический потенциал ( $\phi$  - потенциал); x - количество ионов хлора в противослое, которые определяют электрохимический потенциал ( $\zeta$ -потенциал); (N - x) - количество ионов хлора в диффузной ионной атмосфере.

Как видно из приведенной структуры общий заряд коллоидной частицы положительный, что обеспечивается сорбцией ионов марганца на поверхности наночастиц  $(\text{OH})_2$ . На выходе из бухты при столкновении слабосоленой воды бухты с водами открытого моря, соленость которого составляет 17-19 %, повышенная концентрация электролитов в морской воде приводит к сжатию диффузной ионной атмосферы коллоидной частицы и, как следствие, к уменьшению величины дзета потенциала, уменьшению кинетической устойчивости, коагуляции частиц и выпадению марганецсодержащих частиц в осадок.

Предложенный механизм позволяет объяснить повышенное содержание марганца в донных отложениях на выходе из Севастопольской

бухты в зоне столкновения слабосоленых вод бухты с более солеными водами открытой части Черного моря.

Таким образом, загрязнение донных осадков свинцом, хромом, медью, цинком и оловом в основном, связано с антропогенной деятельностью в районе бухты.

Содержание марганца в донных осадках у выхода из Севастопольской бухты невелико и соизмеримо с количеством марганца в осадках прибрежной зоны Карадагского заповедника. Низкое содержание марганца в донных осадках, у выхода из Севастопольской бухты связано с осаждением марганецсодержащих веществ и обусловлено внутриводоемными процессами.

### **3.3. Микроорганизмы в донных осадках Севастопольской бухты.**

Существенное влияние на трансформацию углеводородов и поведение ТМ в донных осадках оказывают микроорганизмы.

Для исследования микробиологического состава донных осадков Севастопольской бухты была проведена серия лабораторных исследований.

Лабораторные исследования нефтеокисляющих микроорганизмов донных осадков Севастопольской бухты проводились на плотной минеральной среде [106], которая включает все необходимые для развития микроорганизмов соли и не содержит никаких органических веществ. Для развития нефтеокисляющих микроорганизмов в такую среду необходимо введение, какого либо углеводорода или нефти. Плотную минеральную среду готовят путем добавления к жидкой минеральной среде микробиологического агара в количестве 20 г на 1 л среды. Посевы исследуемого материала производят в чашки Петри, заливают тонким слоем расплавленной и охлажденной агаризованной минеральной среды, затем крышки чашек приоткрывают на несколько секунд, и на поверхность чашек наносят тонким слоем стерильный источник углеводорода таким образом, чтобы получилось равномерное покрытие (не более 1,1мм толщиной). На подготовленную среду инокулировали исследуемый донный осадок.

Экспозиция проводилась в течение 30 дней при температуре 37<sup>0</sup>C в биологическом шкафу. После окончания экспозиции образцы исследовались с использованием микроскопического метода. На рис. 3.9. показан рост микроорганизмов выделенных из донных осадков.



Рис. 3.10. Рост микроорганизмов выделенных из донных осадков.

Результаты микробиологических исследований донных осадков Севастопольской бухты (табл. 3.3.) показали, что доминирующим видом являются бактерии рода *Pseudomonas*, количество которых насчитывает 27 культур. Из них 17 культур принадлежат бактериям *Pseudomonas desmoliticus*. Также высевались бактерии *Bacterium*, *Pseudobacterium* и *Vibrio*, среди этих бактерий доминировали виды *Bacterium album*, *Pseudobacterium subluteum* и *Vibrio beijerinckii*. Среди микроорганизмов, выделенных из донных осадков Севастопольской бухты 65% бактерий способны трансформировать углеводороды нефти, что характеризует Севастопольскую бухту, как зону с повышенной антропогенной нагрузкой.

Таблица 3.3.

**Микробиологический состав донных осадков.**

<b>№ п.п.</b>	<b>Микроорганизмы</b>	<b>Количество культур</b>
1	<i>Pseudomonas desmoliticus</i>	17
2	<i>P. sinuosa</i>	3
3	<i>P. liquefaciens</i>	4
4	<i>P. liquida</i>	3
5	<i>Bacterium cycloclastes</i>	1
6	<i>B. halophilum</i>	7
7	<i>B. album</i>	9
8	<i>Pseudobacterium ovatum</i>	1
9	<i>P. subluteum</i>	3
10	<i>P. halosmophilum</i>	1
11	<i>Vibrio beijerinckii</i>	3
12	<i>V. cuneatus</i>	1
13	<i>V. aquatilis</i>	1

В комплексном микробиологическом процессе окисления углеводородов значительная роль принадлежит нефтеокисляющим микромицетам (микрогрибам). Микромицеты являются более устойчивыми в окружающей среде, по сравнению бактериями, к перепадам температуры и pH. Для изучения микологического состава донных осадков Севастопольской бухты были проведены лабораторные исследования. Исследование микологического состава проводилось по стандартным методикам. Учет количества грибных зародышей проводили посевом почвенной смеси, разведения  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  на твердые питательные среды (сусло-агар,

картофельный агар, рН-4,5), а видовой состав по определителям [107-110]. Результаты микологического анализа приведены в таблице 3.4.

Исследования микологического состава донных осадков Севастопольской бухты показали, что доминирующими являются виды *Aspergillus* и *Penicillium*, которые являются активными биодеструкторами углеводородов. Виды *Cladosporium*, *Fusarium*, *Trichoderma* встречаются в меньшей степени. Следует отметить, что *Trichoderma* наиболее характерна для участков грунтов и донных осадков, загрязненных продолжительное время. Виды *Cephalosporium*, *Mukor*, *Verticillium* были малочисленны и высевались не во всех пробах.

Таблица. 3.4.

#### **Микологический состав донных осадков.**

№п.п.	Род микромицетов	Интенсивность роста
1	<i>Aspergillus</i>	+++
2	<i>Cephalosporium</i>	+
3	<i>Cladosporium</i>	++
4	<i>Fusarium</i>	++
5	<i>Mukor</i>	+
6	<i>Penicillium</i>	+++
7	<i>Trichoderma</i>	++
8	<i>Verticillium</i>	+

Микробиологические исследования донных осадков Севастопольской бухты показали, что среди нефтеокисляющих бактерий преобладает род *Pseudomonas*, а из микромицетов доминируют виды *Aspergillus* и *Penicillium*. Так как эти микроорганизмы являются активными биодеструкторами углеводородов, этот видовой состав может являться характерным для донных осадков загрязненных нефтепродуктами.

В микробиологическом составе донных осадков преобладают микроорганизмы, являющиеся активными биодеструкторами углеводородов.

Среди бактерий доминирующим является род *Pseudomonas*, количество которых насчитывает 27 культур. Из них 17 культур принадлежат бактериям *Pseudomonas desmoliticus*.

В микологическом составе донных осадков Севастопольской бухты доминирующими являются виды *Aspergillus* и *Penicillium*, которые являются активными биодеструкторами углеводородов.

Совместное воздействие микробной и грибной композиции обеспечивает высокую эффективность биодеградации углеводородов.

Большинство углеводородокисляющих микроорганизмов способны окислять сырую нефть, продукты переработки нефти и многие чистые углеводороды. Скорость утилизации углеводородов снижается, с увеличением длины углеводородной цепи. Преобладание некоторых углеводородов может способствовать окислению других углеводородов. Поскольку большинство углеводородокисляющих микроорганизмов могут легко утилизировать нормальные парафины, их количество в нефти может определять время разложения других соединений – изопарафинов, циклопарафинов и даже ароматических веществ [78].

Быстрое потребление микроорганизмами нормальных алканов приводит к относительному увеличению содержания разветвленных алканов и ароматических соединений. Впоследствии происходит перестройка бактериальных сообществ и начинается предпочтительное использование ароматических соединений. Длительное пребывание нефти в аэробных условиях приводит к биодеградации разветвленных, циклических, алифатических и ароматических компонентов.

В пределах одной акватории могут существовать различные по своим биохимическим особенностям микроорганизмы. Бактерии, выделенные из разных участков акватории, обладают неодинаковой способностью разрушать ароматические и насыщенные соединения.

Важнейшим фактором успешного окисления нефти бактериями является достаточное количество кислорода, которое требуется для преобразования

нефтяных фракций, с одной стороны, в биомассу общего состава  $C_7H_{11}O_3$ , а с другой – в  $CO_2$  и  $H_2O$ . В некоторых случаях при недостатке кислорода и низких температурах нормальные парафины могут трансформироваться в циклические углеводороды, в том числе гуминоподобные вещества.

В естественных условиях нефть и нефтепродукты никогда не распределяются равномерно и образуют локальные скопления, которые могут привести к уменьшению содержания кислорода в морской воде и тем самым замедлить процессы биодеградации нефти [78].

### 3.4 Выводы раздела 3

1. В минеральном составе песчаной фракции донных отложений доминирующее положение занимает кальцит, кварц и незначительное количество глинистых минералов, количество органических веществ не превышает 0,1%.

2. Минеральный состав иловой фракции прибрежной зоны представлен высокодисперсным кальцитом, кварцем и глинистыми минералами (монтмориллонит, иллит, каолинит и др.) и высокодисперсными наноразмерными аморфными образованиями.

3. Органическое вещество представлено преимущественно гуматами и углеводородами растворимыми в хлороформе, содержание последних не превышает 20% от общего содержания органического вещества в иловых донных осадках.

4. Тяжелые металлы (Mn Ni Ti Cr Zn Cu Pb Sn) в донных осадках преимущественно концентрируются в нерастворимой части органических веществ в виде гуматов, хотя некоторое количество металлов, таких как цинк, могут находиться в углеводородах.

5. Загрязнение донных осадков свинцом, хромом, медью, цинком и оловом в основном, связано с антропогенной деятельностью в районе бухты.

6. Содержание марганца в донных осадках у выхода из Севастопольской бухты невелико и соизмеримо с количеством марганца в осадках прибрежной зоны Карадагского заповедника. Низкое содержание марганца в донных осадках, у выхода из Севастопольской бухты связано с осаждением марганецсодержащих веществ и обусловлено внутриводоемными процессами.

7. Микробиологический анализ донных осадков показал, что доминирующими являются углеводородокисляющие бактерии и микромицеты. Среди бактерий доминирующим является род *Pseudomonas*. В микологическом составе донных осадков доминируют виды *Aspergillus* и *Penicillium*.

## РАЗДЕЛ 4.

### ТРАНСФОРМАЦИЯ НЕПОЛЯРНЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ В ПРОЦЕССЕ ИНФИЛЬТРАЦИИ.

В этом разделе рассматривается трансформация неполярных углеводородов (керосина) в результате процесса инфильтрации. Образцы почв загрязненные керосином, в зоне нефтебазы аэропорта «Борисполь», а также образцы исходного керосина и керосина отобранного из подземной линзы, были объектом исследований. Эти образцы, были любезно предоставлены ведущим сотрудником канд. г.н. наук Парамоновой Г.К. (Институт геологических наук НАН Украины).

Следствием процесса инфильтрации является загрязнение грунтов и приповерхностных вод нефтепродуктами. Нефтепродукты, поступающие на поверхность земли, под действием гравитационных сил перемещаются сквозь ненасыщенную грунтовую зону, взаимодействуют с ней и испытывают влияние физико-химических процессов (растворения, испарения, сорбции и биодеградации), которые зависят от физико-химических свойств нефтепродуктов и грунтов зоны аэрации [111].

Керосин, поступающий через зону аэрации, сложенную супесчаными и суглинистыми грунтами с гетерогенной макропористостью, не накапливается на поверхности капиллярной зоны, а без какой-либо задержки достигает уровня грунтовых вод, где формируется положительный напор и происходит его горизонтальное растекание [111, 112].

В песчаных грунтах происходит преимущественное распространение нефтепродукта в вертикальном направлении, под действием гравитационных сил. Движение жидкости происходит по относительно крупным и хорошо проницаемым порам между частицами, что связано с дисперсностью грунта. Зона проникновения нефтепродуктов через супесь близка к форме полусфера [110].

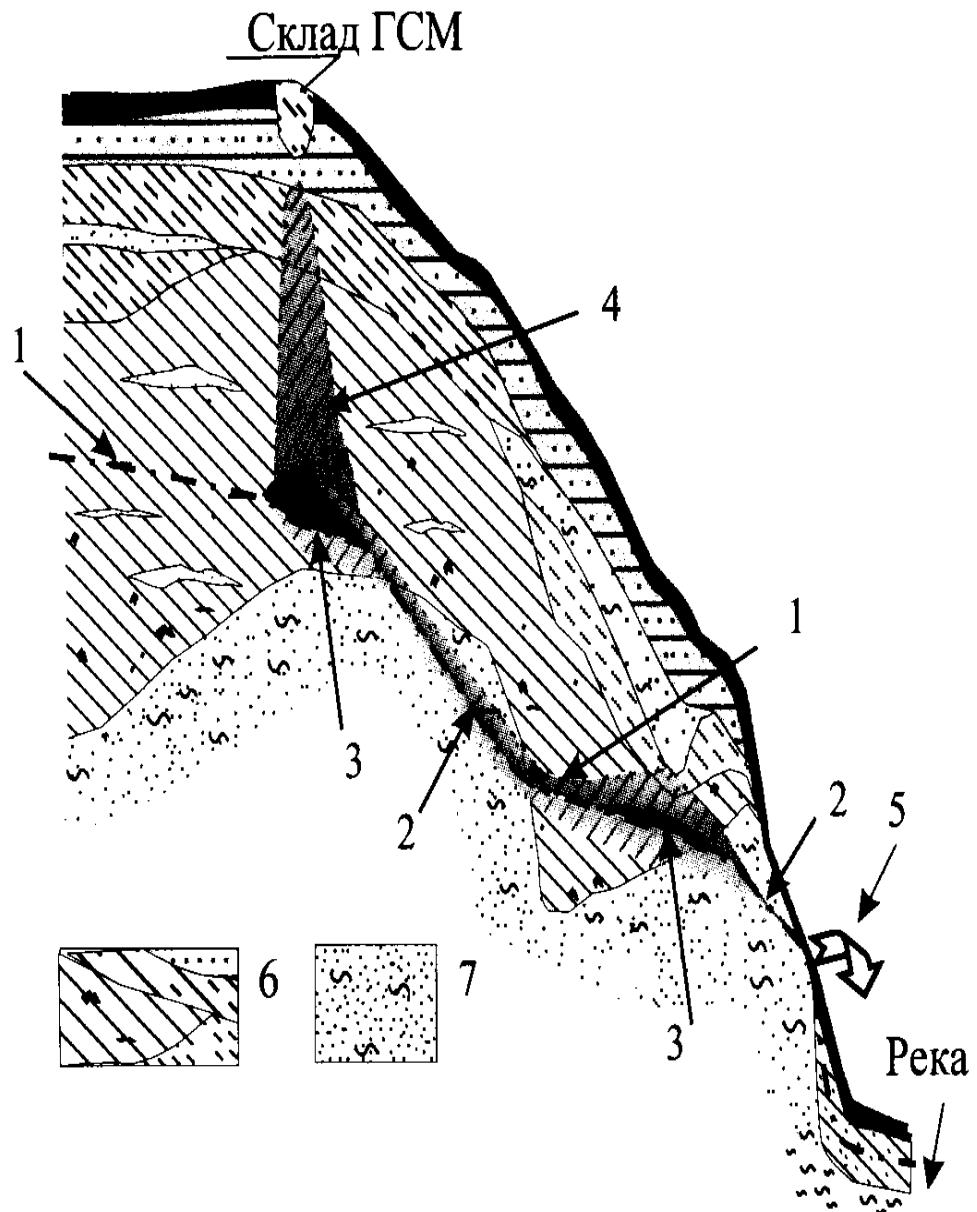


Рис. 4.1. Геолого-гидрогеологический разрез.

1 – Уровень грунтовых вод, расположенный в суглинках; 2 – уровень грунтовых вод, расположенный в песках; 3 – линза керосина; 4 – зона нефтяного загрязнения грунтовой толщи; 5 – родник (место выхода керосина на поверхность земли); 6 –суглинки; 7 – пески [112].

В результате колебания уровня грунтовых вод, нефтепродукты могут попадать в нижнюю часть зоны аэрации. Поступив на уровень грунтовых вод, нефтепродукт создает линзу, которая растекается по поверхности

грунтовых вод и передвигается на значительные расстояния вместе с ними. Вследствие колебания уровня грунтовых вод часть нефтепродуктов становятся захваченными как в зоне аэрации, так и в насыщенных грунтах (рис. 4.1.) [111, 112].

При формировании линзы происходит ее боковое растекание и формирование следующих зон:

- верхняя – капиллярная зона (воздух - нефтепродукты), в которой нефтепродукты находятся под отрицательным давлением;
- ядро линзы – зона с подвижными (мобильными) нефтепродуктами, которые испытывают давление больше атмосферного;
- нижняя - капиллярная зона – (нефтепродукты – вода), в пределах которой количество нефтепродуктов уменьшается сверху вниз до нуля на нижней границе [112].

Нефтепродукты вступают во взаимодействие с компонентами почвенного поглощающего комплекса, в результате чего происходит нарушение равновесия геохимических процессов с одновременным фитотоксическим воздействием на растительность и микробиологический состав почв.

Нефть и нефтепродукты вызывают практически полную депрессию функциональной активности флоры и фауны. Ингибируется жизнедеятельность большинства микроорганизмов, включая их ферментативную активность.

Отмечается большая неоднородность распределения нефтяных компонентов в почвах, что зависит от физических и химических свойств конкретных почвенных разностей, качества и состава поступившей нефти [113, 114].

Керосин, инфильтрующийся через слой почвы и грунта, претерпевает ряд существенных изменений.

Разрушение нефтепродуктов связано с процессами их окисления кислородом воздуха, находящегося в поровом пространстве, с образованием

подвижных кислород содержащих веществ (спирты, альдегиды, кислоты) вплоть до полной минерализации нефтепродуктов с образованием  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . Ведущую роль в процессах трансформации нефтепродуктов играют почвенные аэробные микроорганизмы.

Учитывая, что значительное количество разливов нефтепродуктов (керосина) происходит при заправке авиаотранспорта, в качестве объекта исследования были выбраны чистые грунты, и грунты загрязненные авиационным керосином в районе нефтебазы аэропорта «Борисполь». Для исследований были отобраны: образец №1 отбирался на незагрязненном участке на глубине 0,1м и представлен средним суглинком (30-40% глины). Образец №2 - отбирался в незагрязненной зоне аэрации на глубине 1м и представлен легкой супесью. Минеральный состав этого образца, в основном представлен зернами кварца с незначительной примесью глинистых минералов. Образец №3 отбирался в зоне старого загрязнения на глубине 1м и представлен легкой супесью. На загрязненном участке в зоне аэрации, на глубине 2м был отобран образец №4 представленный легкой супесью. В насыщенной зоне на загрязненном участке на глубине 4м был отобран образец №5 представленный легкой супесью. Образец №6 был отобран в насыщенной зоне на глубине 3,7м, на незагрязненном участке аэропорта и представлен легкой супесью.

Также отбирались образцы керосина из керосиновой линзы на глубине 2-3м в районе нефтебазы аэропорта «Борисполь».

Минеральный состав отобранных образцов, оцененный методом рентгеновской дифракции показал, что эти образцы в основном сложены кварцевым песком с примесью глинистых минералов (рис 4.2.).

Оценка органических компонентов в образцах проводилась методом ИК-спектроскопии.

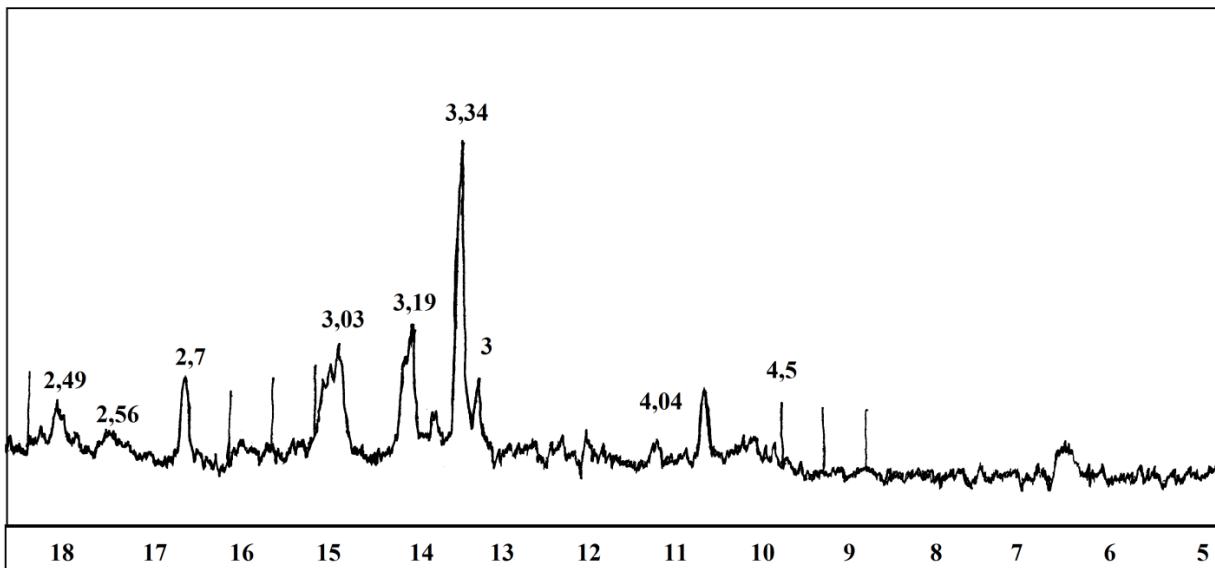


Рис. 4.2. Дифрактограмма образца почвы в районе нефтебазы «Борисполь».

Исследование микологического состава проводилось по стандартным методикам. Учет количества грибных зародышей проводили посевом почвенной смеси, разведения  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  на твердые питательные среды (сусло-агар, картофельный агар, pH-4,5), а видовой состав по определителям [109, 110, 114, 115, 116].

Усредненный микробиологический состав чистых и загрязненных грунтов представлен на рис. 4.3.

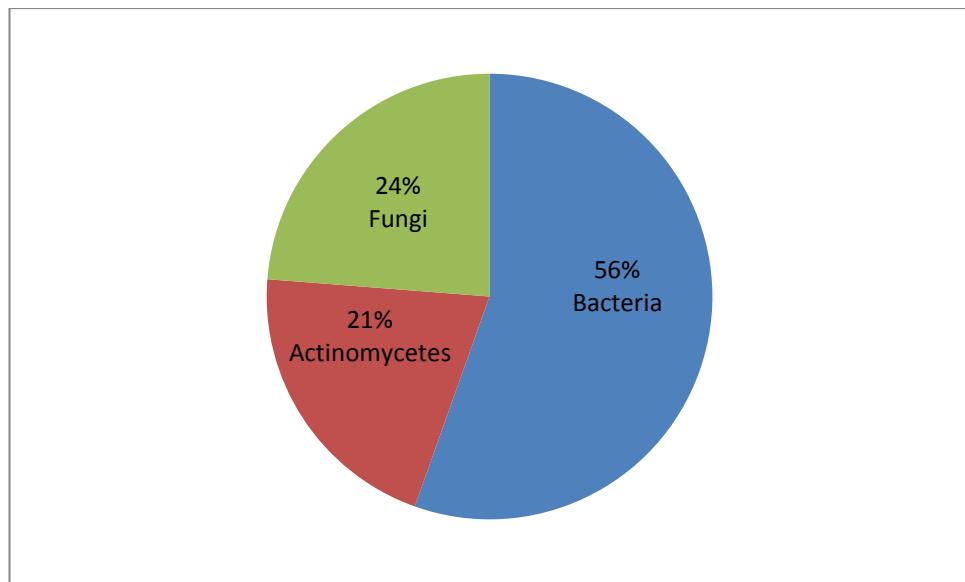


Рис. 4.3. Диаграмма микробиологического состава чистых грунтов аэропорта «Борисполь».

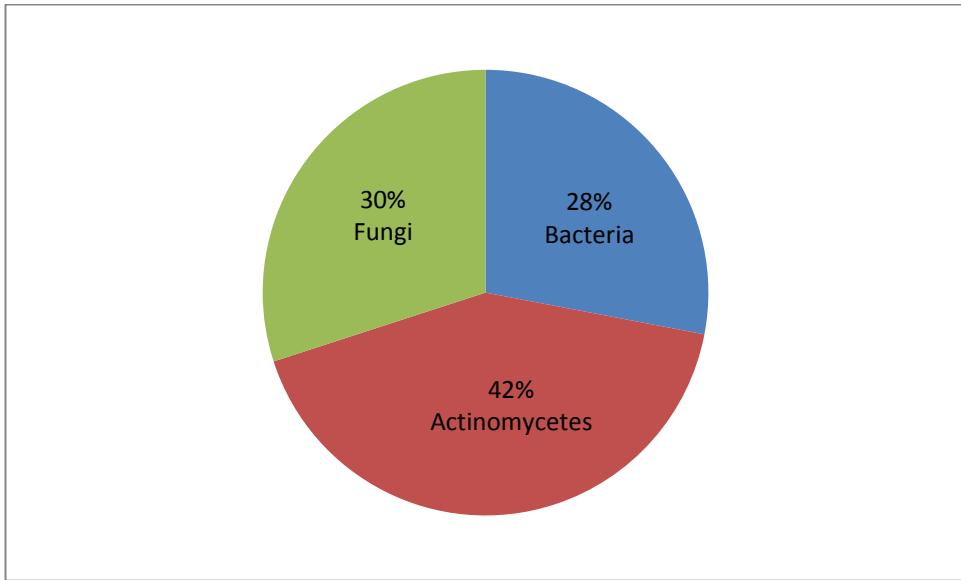


Рис.4.4. Диаграмма микробиологического состава чистых грунтов аэропорта «Борисполь».

Как видно из полученных данных углеводороды неодинаково воздействуют на разные группы почвенных микроорганизмов. Бактерии оказались наиболее чувствительными к углеводородным загрязнителям, в то время как микромицеты проявляют повышенную устойчивость, следствием чего доля микромицетов среди микроорганизмов увеличивается.

Микологический анализ показал (табл.1), что наибольшее количество грибных зародышей находится в незагрязненной почве, на глубине до 1 м. (обр. 1 и 2).

Относительно высокое содержание КОЕ (колониеобразующая единица) (обр. 6) обусловлено, вероятно, доминированием грибов рода *Fusarium* (табл. 4.1.), обладающих достаточно высоким биохимическим потенциалом и высокой проникающей способностью [117].

Нефтепродукты как среда обитания грибов характеризуются рядом особенностей:

- содержат большое количество сравнительно доступного углерода и минимальное – азота при почти недостаточном пространственном расположении его в молекуле;
- в них почти отсутствует доступная активная вода, что оказывает существенное влияние на синтез грибной клетки [118].

Таблица 4.1.

**Количество грибных зародышей в почве нефтебазы аэропорта  
«Борисполь»**

№п.п.	Глубина отбора (м)	Характеристика образца	КОЕ, тыс./г почвы.
1	0,1	Порода, суглинок средний незагрязненный	11,0
2	1,0	Зона аэрации, супесь легкая, незагрязненная	12,25
3	0,1	Насыпной грунт, супесь твердая, старое загрязнение	3,75
4	2,0	Зона аэрации, супесь легкая, загрязненная	2,7
5	4,0	Насыщенная зона, супесь легкая, загрязненная	1,6
6	3,7	Насыщенная зона, супесь легкая, незагрязненная	7,9

Примечание:

1. КОЕ – количество образующих единиц/г почвы;
2. Разведение –  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ;

Высев почвенной болтушки на твердые агаризованные среды – сусло-агар, картофельный агар.

Изменения в микоценозе грунтов под влиянием загрязняющих веществ определяются конкурентными отношениями в сообществе, и эти взаимоотношения различны. При низком и среднем уровне загрязнения главную роль во взаимодействии популяций с близкими потенциальными возможностями играет конкуренция по типу неустойчивого равновесия. Исход взаимодействия в данном случае зависит от плотности популяции конкурентного вида, а преимущество получают микромицеты. Это обусловлено тем, что микромицеты, обладающие большой потенциальной

плотностью при высоком уровне загрязнения имеют преимущество в конкуренции с другими микроорганизмами. В этих условиях доминируют виды, способные расти намного быстрее других, независимо от исходной плотности и плотности популяций других видов.

Видовой состав микроорганизмов в исследуемых образцах пестрый и разнообразный (см. табл. 4.2.), при относительно незагрязненной почве происходит стимулирование развития микроскопических грибов, видовой состав более разнообразен (обр. 1 и 2).

Таблица 4.2.

### **Встречаемость микроорганизмов в почве нефтебазы аэропорта «Борисполь»**

№ п.п.	Вид гриба	Номер образца почвы					
		1	2	3	4	5	6
1	<i>Alternaria tenuissima</i> Niltshire				++		
2	<i>Aspergillus alliaceus</i> Th. et Church	+	+				
3	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fres			+++		+	
4	<i>Aspergillus ochraceus</i> Wilhelm			+++			
5	<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare			+++			
6	<i>Aspergillus terreus</i>			+++			
7	<i>Chaetomium aureum</i> Chivers	+	+				
8	<i>Cladosporium cladosporioides</i> de Vries					+++	+
9	<i>Cladosporium cladosporium</i>					+++	
10	<i>Cladosporium macrocarpon</i>				+++		
11	<i>Cladosporium herbarum</i> Lk ex Fr				++		
12	<i>Cylindrocarpon diaymum</i> Wr.	++	+				
13	<i>Geotrichum candidum</i>			+			
14	<i>Gliocladium roseum</i> Bain	++	+				
15	<i>Fusarium avenaceum</i> Sacc.	++					
16	<i>Fusarium moniliforme</i> Bilai	+	+				+++
17	<i>Fusarium solani</i> Sacc.	+	+				+++
18	<i>Fusarium sporotrichiella</i> Bilai	+	+				
19	<i>Mortierella alpina</i> Peyronel	+++					
20	<i>Mortierella hidrophila</i> Linnemann		+				
21	<i>Moniliacea</i>			+	+		

	(отсутствует спорообразование)						
22	Mucor sp.	+					
23	Mycelia sterilia						+
24	Paecilomyces marquandi Hughes	++					
25	Paecilomyces lilacinus Sumson	++					
26	Penicillium corylophylum Dierck	+	+			+	
27	Penicillium corimbiferum West		+				
28	Penicillium godlenskii Zal	+	+				
29	Penicillium paxilli Bain	+	+				
30	Pseudallescheria bogdii Ginnis				+++		
31	Scolecobusidium macrosporium Roy, Dw. et Mishra		++				
32	Syncephalostrum racemosus Cohn et Schroter	+					
33	Trichoderma fertile Bissett	++					
34	Trichoderma virens Miller, Giddens et Foster	+++					
35	Trichoderma koningi Oudem	+++					
36	Ulocladium botrytis Preuss		++	+			

**Примечание:** Идентифицировано 36 видов микроорганизмов.

+ - вид встречается в пределах 10-20% образца;

++ - вид встречается в пределах 50% образца;

+++ - вид доминирует.

В загрязненной почве, очевидно, произошло смешение разнообразия грибных комплексов по сравнению с фоновой незагрязненной почвой.

В результате микробиологического анализа можно сделать вывод, что произошла перестройка сообщества микромицетов – выпадают чувствительные виды, а доминирующее положение занимают микромицеты, способные утилизировать углеводороды нефти (виды *Aspergillus fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. terreus* обр. 3) и меланинсодержащие темноокрашенные виды *Aternaria tenuissima*, *Cladosporium* sp. Последние виды, могут считаться индикаторными и отсутствуют в контрольной незагрязненной почве (*Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp.)

Таким образом, становится очевидным, что инфильтрация керосина через грунт содержащий микроорганизмы может несколько изменять его химический состав.

Исследование образцов чистого керосина рис. 4.5., а также образцов отобранных из объема керосиновой линзы с глубины 2-3м, проводились методом ИК-спектроскопии и представлены на рис.4.6. (на рис. К – колебание кольца).

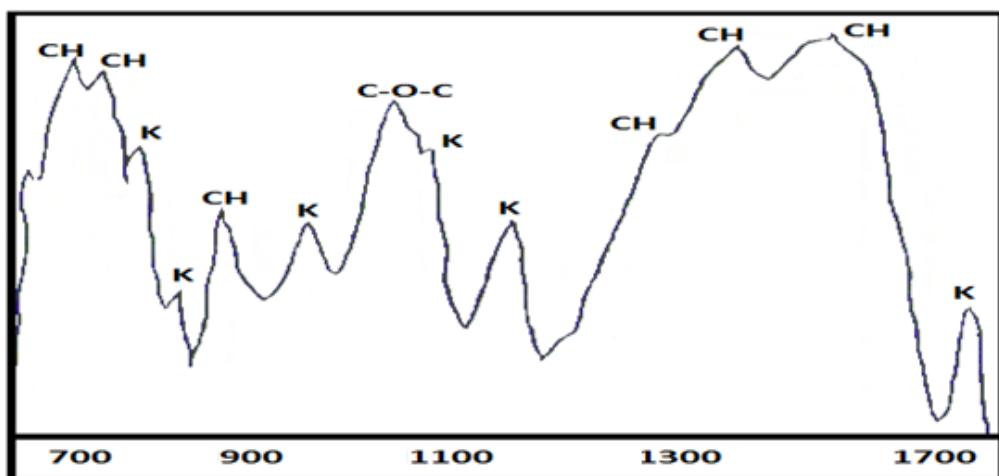


Рис. 4.5. ИК-спектр чистого авиационного керосина. (К- колебание кольца)

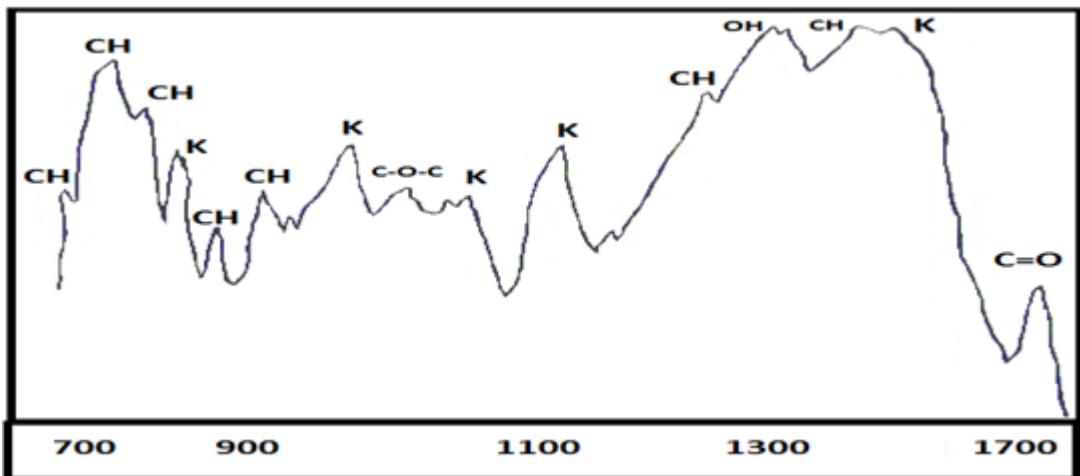


Рис. 4.6. ИК-спектр керосина из линзы. (К-колебание кольца).

ИК-спектроскопические исследования показали, что исходный керосин помимо полос ответственных за СН колебания имеет некоторое количество

полос поглощения соответствующих колебанию ароматического кольца ( $810\text{ см}^{-1}$ ,  $850\text{ см}^{-1}$ ,  $975\text{ см}^{-1}$ ,  $1090\text{ см}^{-1}$ ,  $1170\text{ см}^{-1}$ ,  $1480\text{ см}^{-1}$ ,  $1610\text{ см}^{-1}$ ) и практически полное отсутствие кислород содержащих групп. В результате фильтрации керосин подвергается окислительному воздействию микроорганизмов, что соответственно, отражается на ИК-спектрах (рис.4.6.). В ИК-спектрах появляются полосы поглощения в области  $1385\text{ см}^{-1}$  и  $1630\text{ см}^{-1}$  соответствующие деформационным колебаниям OH групп и полосы соответствующие валентным колебаниям C=O в области  $1630\text{ см}^{-1}$  и  $1770\text{ см}^{-1}$ .

Помимо процессов окисления в измененном керосине увеличивается доля ароматических углеводородов, что отражается увеличением интенсивности полосы  $810\text{ см}^{-1}$  в два раза.

Основной механизм окисления углеводородов разных классов в аэробных условиях, близких к условиям поверхности Земли, - это внедрение кислорода в молекулу углеводорода, замена связей с малой энергией разрыва (C-C, C-H) связями с большей энергией разрыва (C-O, H-O) [119].

Процессы биогенного окисления углеводородов настолько сложны, что в настоящее время ещё не имеется достаточно чёткого и определённого представления об их механизме. Вопрос этот сложен уже потому, что на направление процесса биогенного окисления оказывают влияние многие факторы: кислотность среды, окислительно-восстановительные условия, температура, освещение, осмотическое давление и так далее. Помимо перечисленных факторов, имеют значение и физиологические особенности самих микроорганизмов, проявляющиеся при окислении индивидуальных углеводородов и их смесей [120].

Микроорганизмы обладают свойством избирательного отношения к различным углеводородам, причём эта способность определяется не только различием в структуре вещества, но даже и количеством углеродных атомов, входящих в структуру углеводородов. [121].

Окисление углеводородов большинством известных микроорганизмов осуществляется с помощью адаптивных энзимов

(ферментов). Этот факт установлен многочисленными экспериментами по окислению углеводородов клетками микроорганизмов, выращенных на неуглеводородных субстратах. [120, 122].

При окислительной деградации возможно образование продуктов промежуточного окисления углеводородов — спиртов, альдегидов, кетонов, карбоновых кислот, сложных эфиров, а также бифункциональных соединений - альдегидокислот, кетокислот и др. Следует отметить, что в природных условиях микроорганизмы осуществляют процессы окисления как за счет аэробного, так и анаэробного дыхания [123].

Оптимальным способом ликвидации избытка углеводородов было бы их полное окисление до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  (процесс минерализации) с последующим удалением  $\text{CO}_2$  в атмосферу или в виде карбонатных соединений, — в литосферу. Однако если образование  $\text{CO}_2$  происходит в воде, то он практически полностью растворяется, что приводит к увеличению содержания в воде минерального углерода ( $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HCO}^{3-}$ ).

При частичном окислении, как правило, образуются гуминоподобные полимеры или нерастворимые смолистые вещества. Схематически преобразование углеводородов может быть представлено следующим образом (рис.4.7).

Становится ясно, что воздействие микроорганизмов на керосин способствует ухудшению его качества, как за счет образования низкомолекулярных соединений кислоты, альдегиды спирты, так и за счет процессов ароматизации вплоть до образования высокомолекулярных гуминоподобных веществ, наличие которых резко снижает качество авиационных топлив.

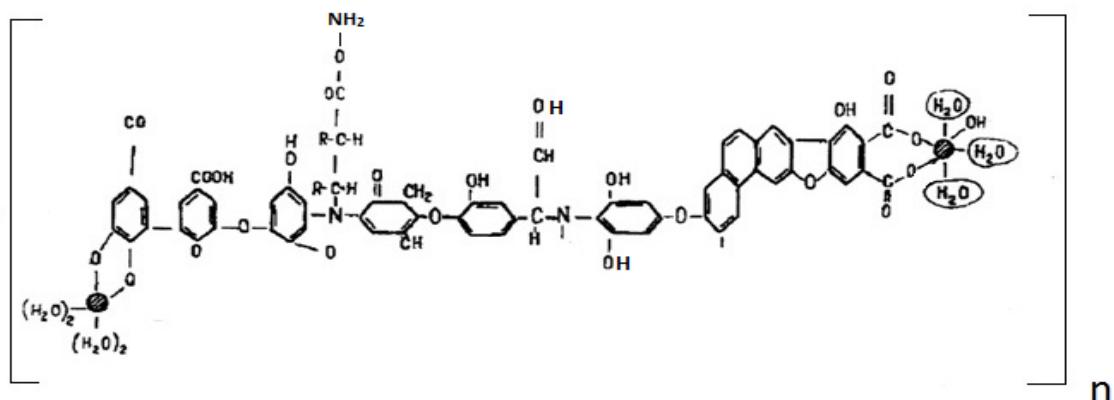


Рис. 4.7. Схема преобразования углеводородов под действием микроорганизмов.

#### **4.1 Выводы раздела 4**

1. Миграция керосина через слой почва-грунт, содержащие микроорганизмы, сопровождается его трансформацией и связана с внедрением кислорода в углеродную цепочку.
2. В составе керосина появляются углеводороды содержащие кислород, которые могут идентифицироваться как функциональные группы спиртов, кислот, простых и сложных эфиров и т.д. А также происходит частичное образование ароматических циклов из алифатических углеводородов и высокомолекулярных гуминоподобных полимеров.
3. Инфильтрация керосина сопровождается микробиологическим окислением керосина и одновременно изменением микробиологического состава почвогрунтов.
4. Взаимодействие углеводородов с нефтеокисляющими микроорганизмами приводит к изменению микологического состава среды. Наиболее устойчивыми в этих условиях являются меланин-синтезирующие микромицеты семейства *Aternaria tenuissima*, *Cladosporium* sp., которые могут быть индикаторами загрязнения грунтов.

## РАЗДЕЛ 5

### **БИОХИМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ТРАНСФОРМАЦИИ НЕПОЛЯРНЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ.**

Ранее (см. раздел 4) было показано, что в природных условиях под действием нефтеокисляющих микроорганизмов линейные алканы, присоединяя атом кислорода, превращаются в низкомолекулярные кислородсодержащие органические соединения. Если количество окислителя достаточно, то под действием биодеструкторов нефтепродукты окисляются до диоксида углерода и воды. Однако, в некоторых случаях, возможно, несколько иное направление этого процесса, в результате чего образуются ароматические углеводороды или гуминоподобные полимеры.

В настоящее время сложно однозначно определить механизм этого процесса протекающего в грунтах и донных отложениях, ход этого процесса зависит от многих факторов, в том числе от наличия высокодисперсных глинистых минералов, роль которых в настоящее время является невыясненной, однако они являются обязательным компонентом донных илов и грунтов.

#### **5.1 Исследование влияние глинистых минералов на рост и развитие углеводородокисляющих микроорганизмов.**

Исследования влияния глинистых минералов проводились в лабораторных условиях. В качестве минеральной фазы, наиболее близкой по составу к донным отложениям прибрежной зоны Черного моря, использовалась бентонитовая глина Черкасского месторождения, характеристика и свойства этой глины приведена в разделе 2. Кроме того, в исследованиях использовался Глуховецкий каолинит с размером частиц 1-2 мкм и использовался палыгорскит Черкасского месторождения.

В качестве биодеструктора использовался микромицет семейства *Cladosporium cladosporioides* штамм 396, имеющий повышенную активность по отношению к нефтепродуктам. Опыты по культивированию микроорганизмов проводились на среде Чапека, в аэробных условиях. Результаты эксперимента приведены на рис.

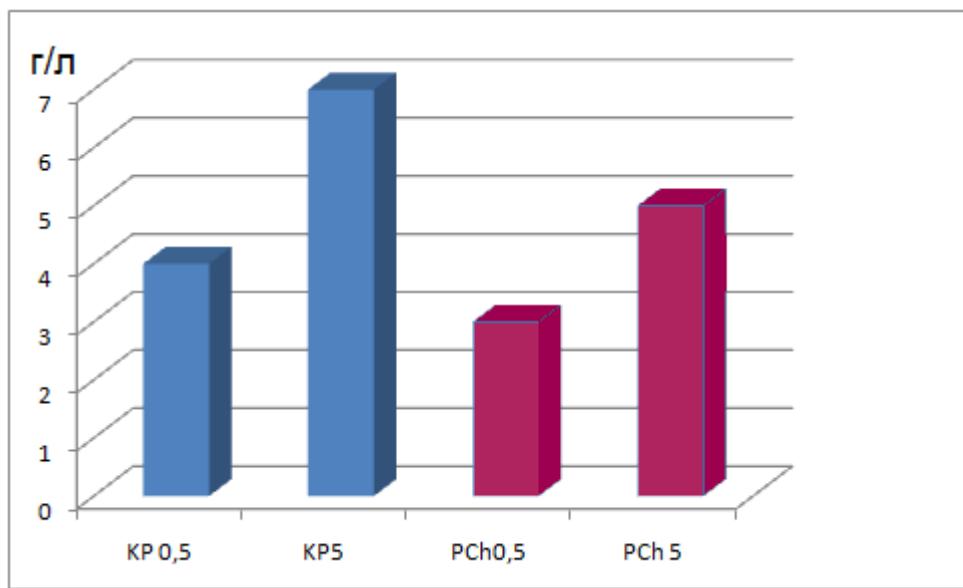


Рис. 5.1. Влияние природы глинистых минералов и их концентраций на рост биомассы *Cladosporium cladosporioides*.

На рис.5.1. показан рост микроорганизмов при содержании минеральной фазы 0,5% и 5%. Из полученных результатов видно, что увеличение концентрации глинистой компоненты в культуральной среде усиливает рост микроорганизмов независимо от природы глинистых компонентов.

Тем не менее, природа глинистых минералов неодинаково стимулирует рост микроорганизмов. Как ни удивительно, наиболее активное воздействие на рост микроорганизмов оказывает каолинит, по сравнению с бентонитовой или палыгорскитовой глиной. Причина этого явления будет рассмотрена ниже.

В донных осадках каолиниты составляют небольшую часть глинистых компонентов. Главным глинистым компонентом грунтов являются смектиты (монтмориллонит) и гидрослюды (иллит).

Исследовалось влияние бентонитовой глины на рост и развитие микроргрибов. Влияние концентрации глинистой фракции находящейся в питательной среде на рост и развитие биодеструктора *Thielavia terrestris* *Cladosporium cladosporioides* приведены на рис. 5.2.

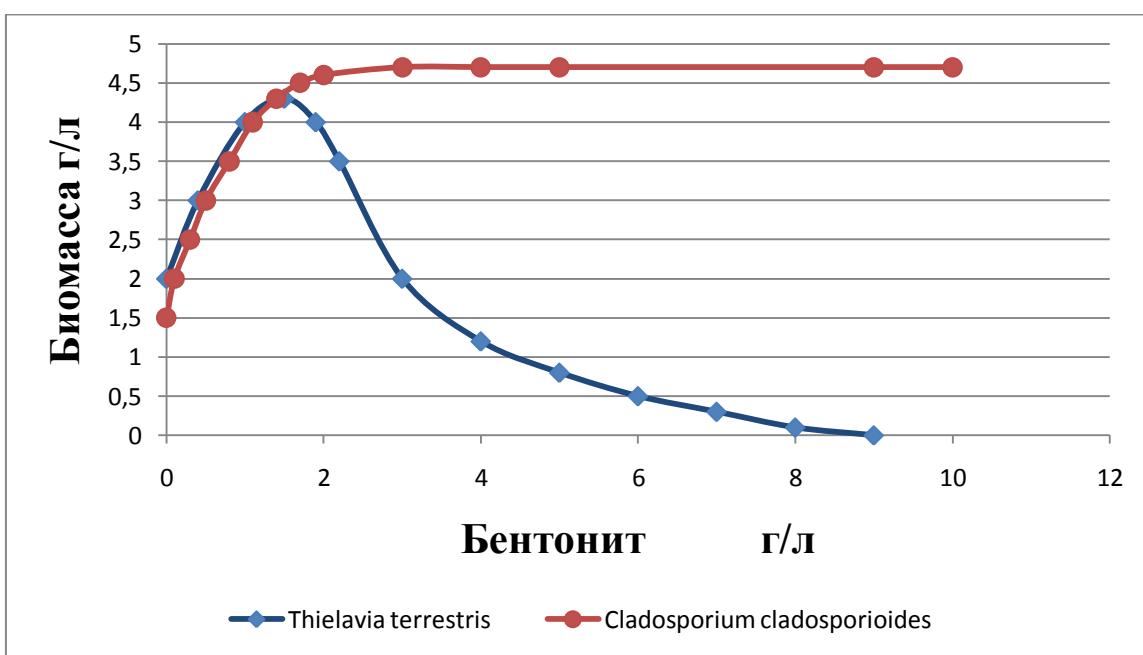


Рис. 5.2. Влияние бентонита на накопление биомассы микроорганизмами *Thielavia terrestris* и *Cladosporium cladosporioides*.

Из рисунка видно, что присутствие высокодисперсных глинистых минералов в питательной среде оказывает стимулирующее действие на рост и развитие микроргрибов, однако это воздействие зависит от природы микроорганизма. При низких концентрациях бентонита, до 1,5 г/л, наблюдается активизация роста микроорганизма *Thielavia terrestris*, в то время как излишнее количество глины, свыше 2 г/л, угнетает его рост. Несколько по-другому этот процесс протекает для микромицета *Cladosporium cladosporioides*. Как и для микроргриба *Thielavia terrestris* низкие

концентрации бентонитовой глины активизируют рост, а при более высоких концентрациях рост стабилизируется, и повышение концентрации глины не оказывает угнетающего действия на этот процесс.

Активизация роста микроорганизмов в присутствии глинистых минералов обусловлена тем, что контакт бактерий с глинистыми минералами может защищать их клетки от негативного влияния различных внешних факторов окружающей среды.

Глинистые минералы могут оказывать протекторное воздействие на микроорганизмы. На рис.5.3. представлено влияние ионов меди в культуральной среде на рост *Cladosporium cladosporioides* в присутствии бентонитовой глины в количестве 2 г/л [124].

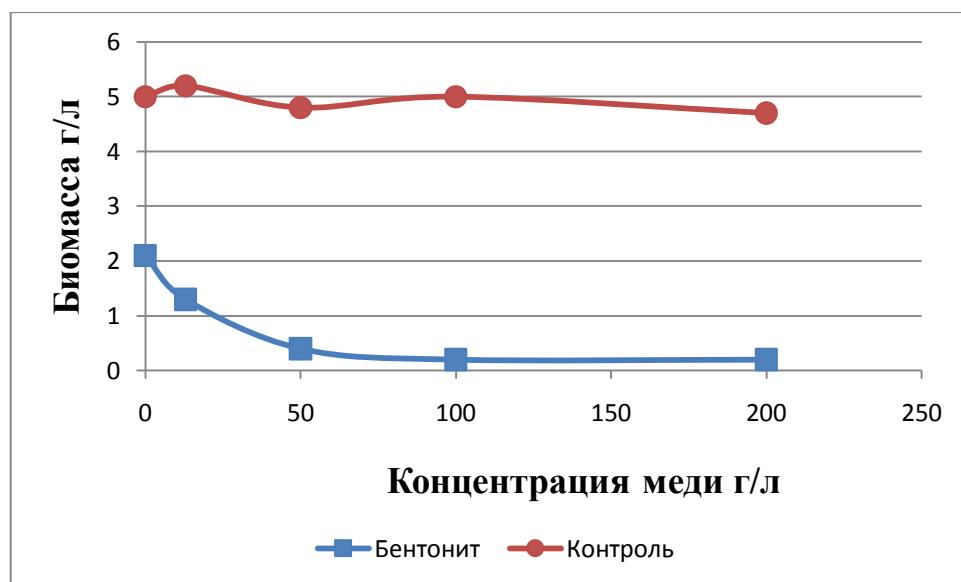


Рис. 5.3. Влияние ионов меди в культуральной среде на рост *Cladosporium cladosporioides* в присутствии бентонитовой глины.

Как видно из рисунка, в отсутствие бентонитовой глины ионы меди оказывают сильное угнетающее действие. В то же время, в присутствии бентонитовой глины в количестве 5% негативное действие меди полностью нейтрализуется, а бентонитовая глина оказывает симулирующее действие.

Протекторные свойства глин, вероятно, связаны с высоким сродством монтмориллонитовой глины к ионам тяжелых металлов с образованием прочных металлоглинистых комплексов.

Таким образом, уменьшается количество свободных ионов меди в жидкой среде, что обуславливает способность микроорганизмов в этих условиях к росту.

Существует оптимальное соотношение между минеральной и органической фазой, при котором наблюдается максимальная активизация бактериальной фазы, что соответственно отражается на разрушении нефтяных углеводородов.

Стимулирующее влияние глинистых минералов на микроорганизмы объясняется целым рядом факторов, среди которых адгезия занимает доминирующее место. По поглотительной способности по отношению к микроорганизмам, первое место занимают сапониты: гумбрин, монтмориллонит, кил, нонtronит [125].

Тем не менее, наши исследования показали, что относительно крупные кристаллы каолинита (1-2 мкм) могут оказывать более высоко стимулирующее воздействие на рост микроорганизмов, чем микрокристаллы монтмориллонита (0,05-0,1 мкм). Полученные результаты объясняются тем, что глинистые минералы, адсорбируя микробные клетки, образуют с ними крупные агрегаты размером 50—200 мкм. На рис. 5.4. с показано влияние природы глинистых минералов и ее концентрации на величину глинисто-микробных агрегатов. Как видно наиболее крупные агрегаты образуются в среде с каолинитом.

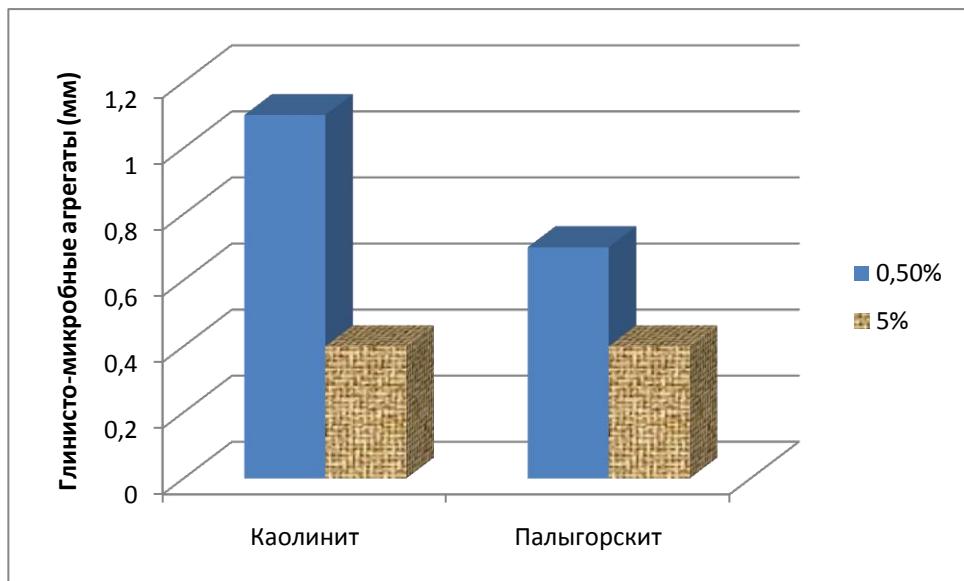


Рис. 5.4. Влияние природы глинистых минералов и ее концентрации на величину глинисто-микробных агрегатов.

Микрофотография границы агрегата и глинистых минералов в каолинит-грибном ассоциате показана на рис.5.5. [124].

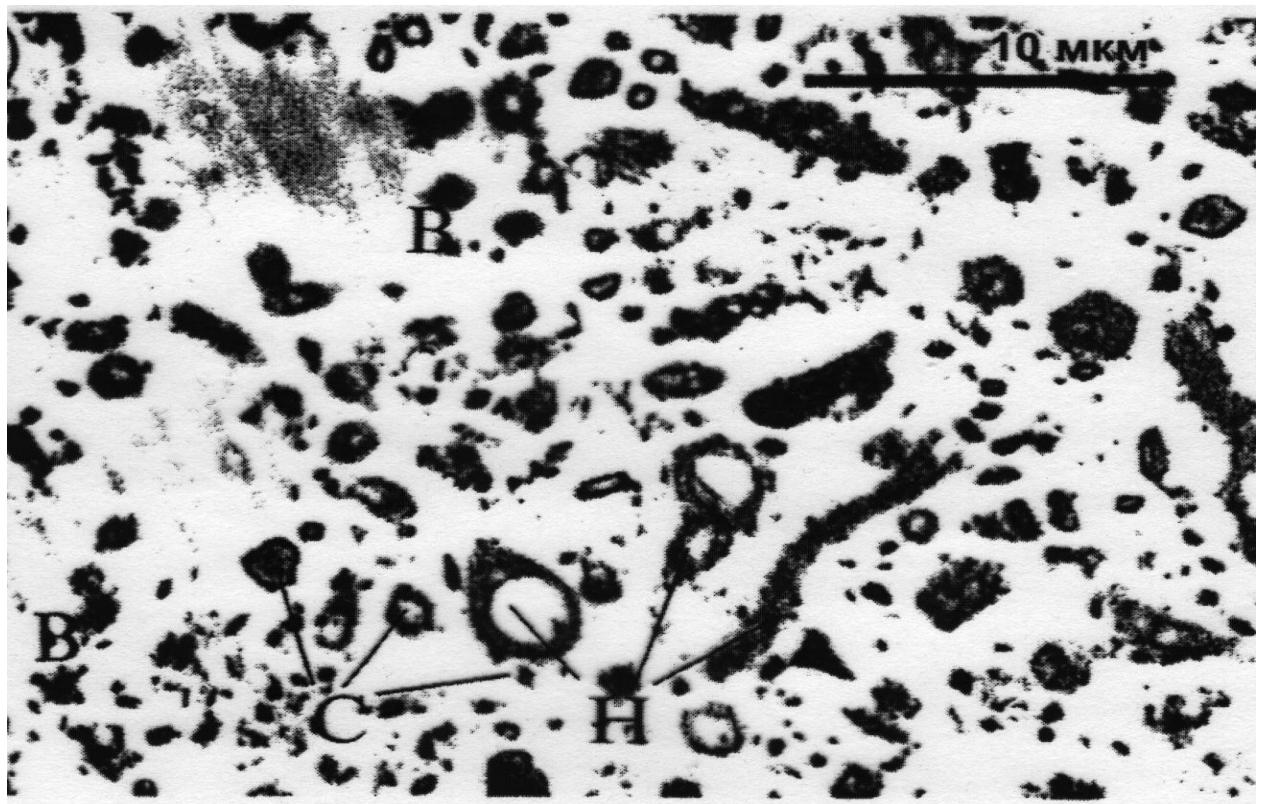


Рис.5.5. Граница агрегата и глинистых минералов в каолинит-грибном ассоциате (с - частицы глинистых минералов; h- гифы микромицетов).

Похожие агрегаты образуются микрогрибами, дрожжами и бактериями, а также при их взаимодействии с белками, основными аминокислотами и другими веществами, которые имеют свободные аминогруппы. Если адсорбция клеток не происходит, или протекает очень слабо, то подобные агрегаты не образуются [126]. Помимо природы минералов размер агрегатов в значительной степени зависит от числа микробных клеток, адсорбированных минералом. На адсорбцию клеток микроорганизмов существенно влияют условия среды. [126, 127, 128, 129].

Существует определенное значение рН, при котором клетки микроорганизмов адсорбируются в наибольшем количестве. При рН отличающихся от этих показателей, адсорбция ухудшается и при некоторых показателях рН может совсем прекратиться. В щелочной области наступает усиление адсорбционного взаимодействия некоторых микроорганизмов. Разные микроорганизмы имеют не одинаковые максимальные и минимальные показатели адсорбции при разных показателях рН. Существенная роль в этом взаимодействии принадлежит электростатическим силам и при достижении рН среды, близкого или равного изоэлектрическому состоянию клеток микроорганизмов, действие электрического фактора снижается и происходит усиление адсорбционного взаимодействия между минеральными частицами и клетками микроорганизмов, действие электрического фактора снижается и происходит усиление адсорбционного взаимодействия между минеральными частицами и клетками микроорганизмов [128]. На флоккулирующие свойства микроорганизмов при их взаимодействии с минеральными частицами влияет их возраст. Это явление объясняется действием электростатических сил, так как потенциал клеток микроорганизмов с возрастом изменяется.

## **5.2. Моделирование трансформации неполярных углеводородов под действием консорциума углеводородокисляющих микроорганизмов.**

Для моделирования процессов биотрансформации неполярных углеводородов была разработана специальная методика. В качестве неполярных углеводородов было выбрано трансформаторное масло, не содержащее ароматических углеводородов и содержащее только алифатические углеводороды общей формулой  $C_nH_{2n+2}$ . В качестве биодеструктора использовался биопрепарат «Эконадин». В качестве минеральной фазы использовалась бентонитовая глина Черкасского месторождения близкая по составу к иловой фракции донных осадков прибрежной зоны (Севастопольская бухта, иловый компонент донных отложений прибрежной зоны Карадагского заповедника). В таблице 5.1. приведен минеральный состав иловой фракции донных отложений и бентонитовой глины Черкасского месторождения.

Таблица 5.1.

### **Минеральный состав иловой фракции донных отложений и бентонитовой глины Черкасского месторождения.**

Донные иловые отложения	Бентонит
Кальцит	Монтмориллонит
Кварц	Иллит
Монтмориллонит	Палыгорскит
Иллит	Кальцит
Каолинит	Кварц
Полевые шпаты	Полевые шпаты

Учитывая, что бентонитовая глина является несколько видоизмененным осадком морских донных отложений, и содержит те же минералы, что и донные осадки это позволило использовать её в качестве

минеральной фазы в опытах по биохимическому моделированию трансформации углеводородов.

Биохимическое моделирование проводилось путем выдержки в биологическом шкафу специальной композиции, содержащей в качестве углеродсодержащего компонента в питательной среде трансформаторное масло.

В качестве модели иловой части донных осадков была приготовлена серия препаратов, содержащая углеводороды, минеральную фазу и биопрепарат «Эконадин» (микроорганизмы и микрогрибы инокулированные на торфе) в различных соотношениях. Предварительными исследованиями было установлено, что наилучшие результаты были получены при соотношении биодеструктора, минеральной фазы и углеводородов 10:5:1,5. Для получения необходимой композиции сухой препарат «Эконадин» тщательно смешивался с бентонитовой глиной, до получения однородной смеси, в которую вносили расчетное количество трансформаторного масла. Образовавшуюся смесь перемешивали и переносили в чашку «Петри», в которую добавляли необходимое количество дистиллированной воды. Для культивирования подготовленные таким образом чашки «Петри» помещали в термостат и выдерживали при постоянной влажности 100% и температуре  $37\pm1^{\circ}\text{C}$  в течение 30 суток. По истечении указанного срока образцы были извлечены из термостата, высушены при температуре  $60\text{-}70^{\circ}\text{C}$  до постоянного веса. Полученные образцы осторожно измельчались в агатовой ступке до фракции меньше 1мм. Полученный аналитический препарат в дальнейшем использовался для исследований.

Для выделения остатков углеводородов аналитический препарат был подвергнут экстракции хлороформом в экстракторе «Сокслета». Для этого необходимое количество препарата помещалось в патрон из фильтровальной бумаги (синяя лента) и располагался в средней части экстрактора. Экстракция проводилась в течение 6 часов при температуре  $60^{\circ}\text{C}$ .

Было установлено, что этого времени достаточно для полной экстракции компонентов растворимых в хлороформе. Полученные экстракты исследовались методом ИК-спектроскопии. Результаты приведены на рис. 5.6. и 5.7. а также в таблице 5.2.

На рис.5.6. приведены ИК спектры исходного трансформаторного масла и углеводородов, образующихся после деструкции трансформаторного масла микроорганизмами и после удаления хлороформа из хлороформного экстракта (рис. 5.7.).

В таблице 5.6. приведены характеристические полосы функциональных групп и их частоты в ИК-диапазоне.

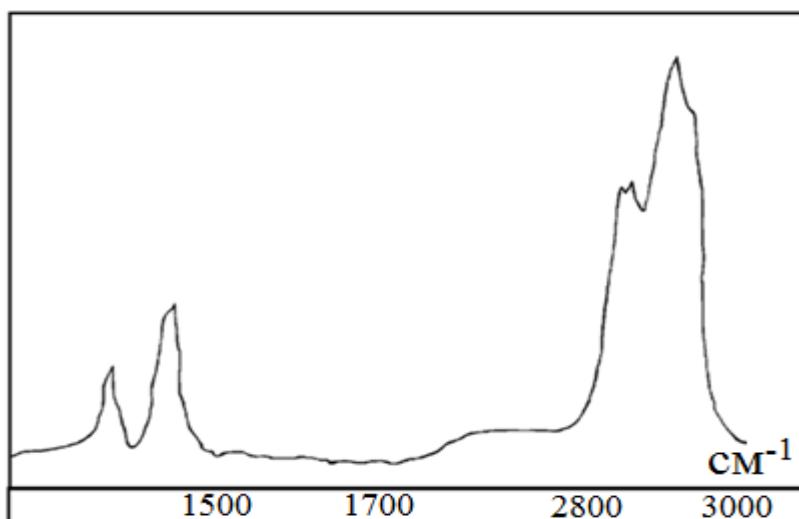


Рис.5.6. ИК-спектр чистого трансформаторного масла.

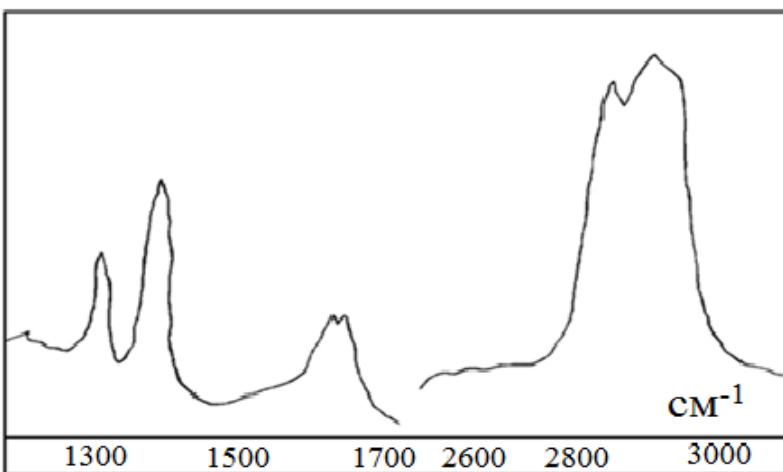


Рис. 5.7. ИК-спектр трансформаторного масла после микробиологической деструкции.

Таблица 5.2.

**ИК-полосы поглощения трансформаторного масла до и после эксперимента.**

Чистое трансформаторное масло		Трансформаторное масло после биотрансформации	
Область поглощения см <sup>-1</sup>	Функциональные группы	Область поглощения см <sup>-1</sup>	Функциональные группы
730	Деформационные - СН	730	Деформационные - СН
1170	-	1170	Колебание кольца
1270	-	1270	Колебание кольца
1378	Деформационные - СН	1378	Деформационные - СН
1462	Деформационные - СН	1463	Деформационные – СН
1715	-	1715	Валентные С=О
1735	-	1735	Валентные С=О
2865	Валентные - С-Н	2865	Валентные С-Н
2932	Валентные - С-Н	2932	Валентные С-Н
2955	Валентные - С-Н	2955	Валентные С-Н

Анализ полученных результатов показал, что в спектрах остатков углеводородов после действия биодеструкторов регистрируются полосы поглощения, которые идентифицируются как бензольные кольца в ароматических углеводородах, которые отсутствуют в исходном трансформаторном масле. На спектрах это выражается появлением полос поглощения в области  $1170\text{cm}^{-1}$  и  $1270\text{cm}^{-1}$ . На ИК-спектрах образцов дополнительно появляются полосы в области  $1715\text{cm}^{-1}$  и  $1735\text{cm}^{-1}$  соответствующие валентным колебаниям С=О, что характерно для процессов окисления нефтепродуктов.

Полученные данные однозначно свидетельствуют, что под действием микроорганизмов разрушающих неполярные углеводороды, происходит частичная трансформация алифатических углеводородов в ароматические. Одновременно происходит частичное окисление углеводородов с

образованием соединений содержащих карбонильные и карбоксильные группы. Вероятно, такой спектр может быть связан с трансформацией алифатических углеводородов в гуминоподобные вещества.

Для моделирования процессов трансформации нефти были поставлены аналогичные эксперименты, в которых в качестве углеводородной фазы использовалась легкая нефть Розбышевского месторождения.

Для этой цели были разработаны и изготовлены композиции со следующим составом:

контрольный образец (ЭК1) – препарат «Эконадин» 10гр и 2,5 мл нефти;  
образец (ЭКБ5) - препарат «Эконадин» 10гр, 5гр. бентонитовой глины и 2,5 мл нефти;  
образец (ЭКБ10) - препарат «Эконадин» 10 гр. , бентонитовой глины и 2,5 мл нефти.

Кроме этих составов были получены аналитические препараты, в которых вместо препарата «Эконадин» использовался биодеструктор «Родекс» имеющий несколько иной микробиологический состав.

Для получения препарата были приготовлены смеси со следующим составом:

контрольный образец (РК1) - препарат «Родекс» 10 гр., 2,5 мл нефти;  
образец (РБ5) - препарат «Родекс» 10 гр. , 5гр. бентонитовой глины и 2,5 мл нефти; образец (РБ10) - препарат «Родекс» 10 гр., 10 гр. бентонитовой глины и 2,5 мл нефти.

Как и в предыдущих опытах, полученные смеси помещались в чашки «Петри», в которые добавляли необходимое количество дистиллированной воды. Подготовленные образцы помещались в термостат при 37<sup>0</sup>С на 30 суток. По окончании экспозиции образцы высушивались до постоянного веса.

Для определения остаточного количества нефти навеска остатка измельчалась до фракции до 100 мкм. Полученные препараты

экстрагировались в экстракторе «Сокслета». Для контроля был получен хлороформный раствор сырой нефти, в котором определялся сухой остаток.

Изучение состава хлороформных вытяжек проводилось методом ИК-спектроскопии.

На рис. 5.8. б), 5.8. в), 5.8. г) приведены ИК-спектры образцов нефти, подвергшихся действию биодеструктора «Эконадин». На рис. 5.9. б), 5.9. в), 5.9. г) приведены ИК-спектры образцов нефти, подвергшихся действию биодеструктора «Родекс-Т». В таблице 5.3. приведены характеристические частоты полос поглощения и соответствующие им функциональные группы этих образцов. На рис. 5.8. а) приведены ИК-спектры чистой нефти. На рисунках «К» – колебание кольца.

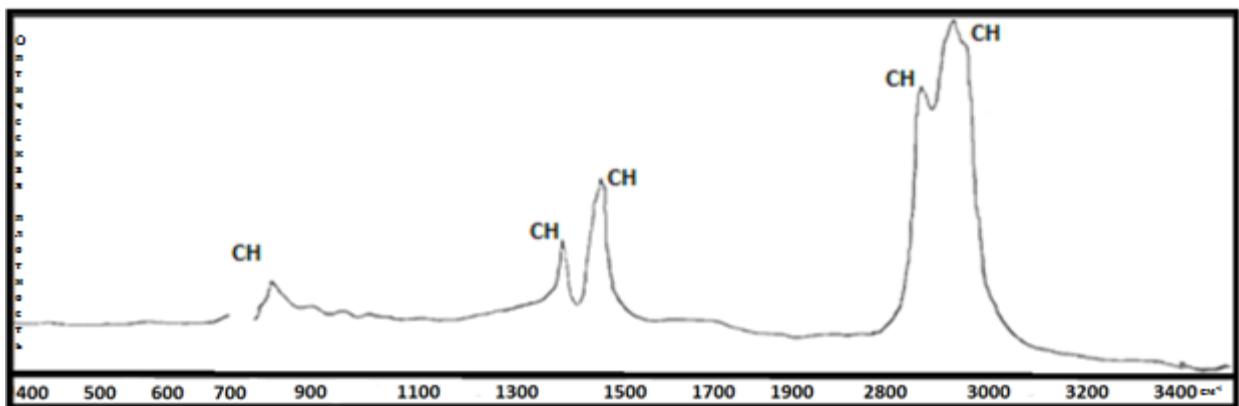


Рис. 5.8. а) ИК-спектр образца Розбышевской нефти.

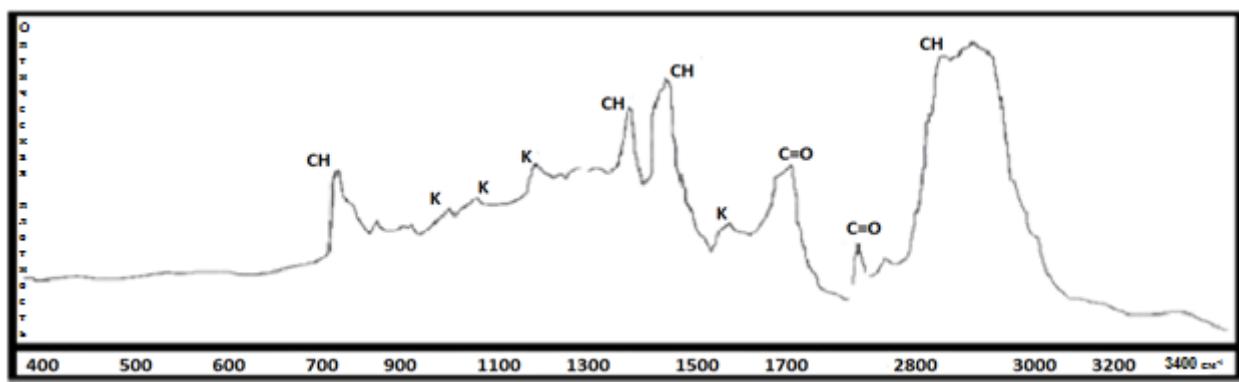


Рис. 5.8. б) ИК-спектр образца ЭК1.

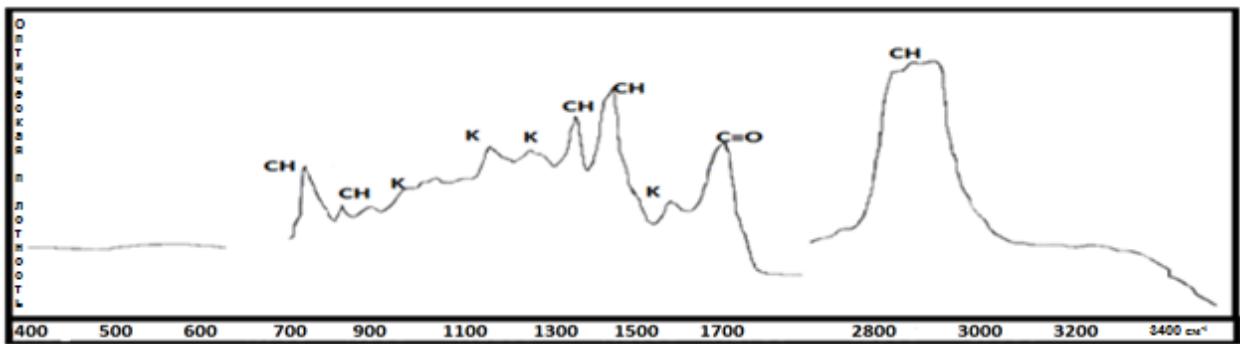


Рис. 5.8.в) ИК-спектр образца ЭКБ5.

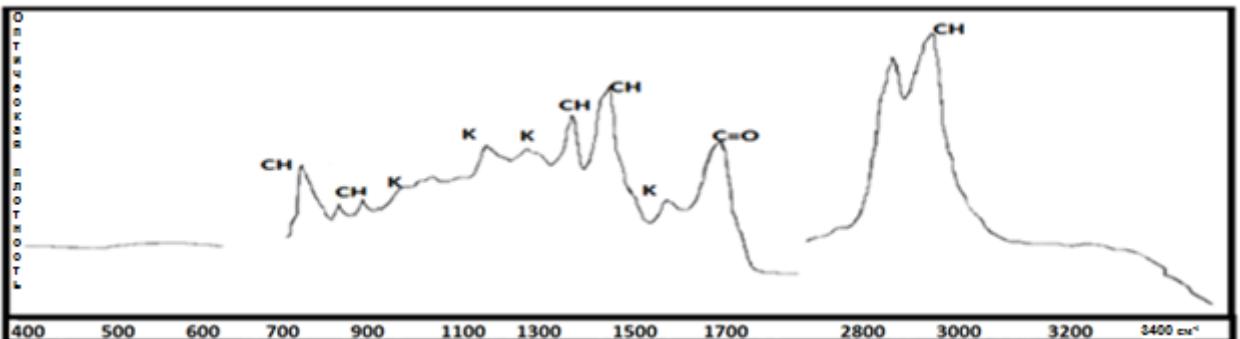


Рис. 5.8.г) ИК-спектр образца ЭКБ10.

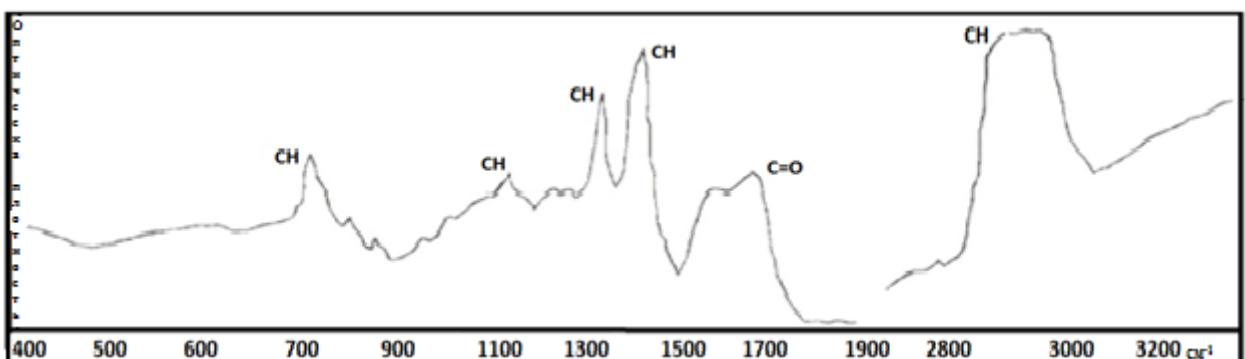


Рис.5.9. а) ИК спектр образца РК1.

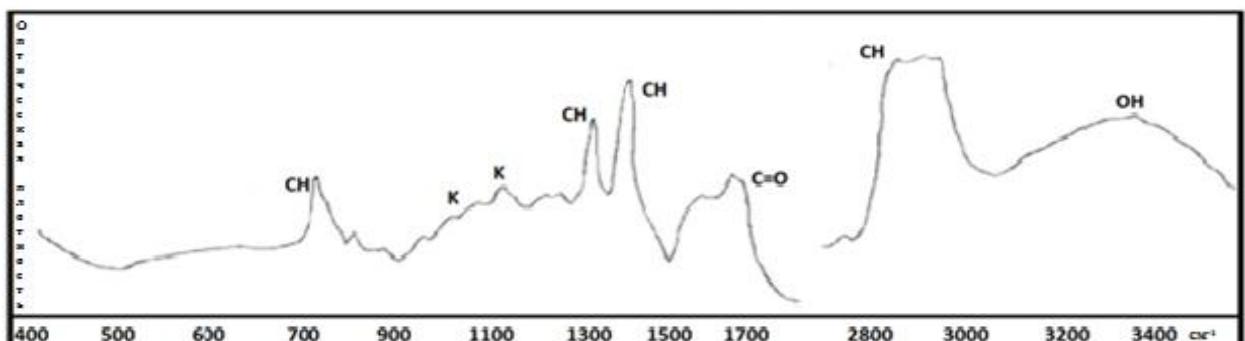


Рис. 5.9. б) ИК спектр образца РБ5.

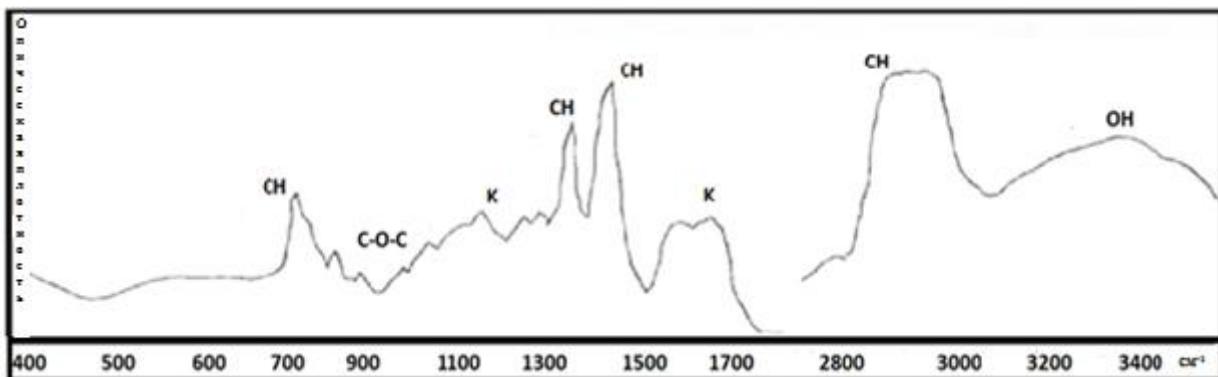


Рис. 5.9. в) ИК спектр образца РБ10.

Приведенные ИК спектры остатков нефтепродуктов после воздействия на нефть биодеструкторов «Родекс» и «Эконадин» дают основание считать, что их влияние на механизм разрушения углеводородов близок, но несколько отличается по интенсивности. В экстрактах после удаления хлороформа появились новые полосы, отсутствующие в сырой нефти и идентифицируемые нами как колебания ароматического кольца ( $1170 \text{ см}^{-1}$ ,  $1270 \text{ см}^{-1}$ ,  $1610 \text{ см}^{-1}$ ), и кислород содержащие группы ( $\text{C=O}$ ), которые образуются вследствие окисления алифатических цепочек кислородом (см. рис 5.8.; 5.9.).

Анализируя ранее проведенные работы, становится очевидным, что деструкция углеводородов микроорганизмами в присутствии кислорода, как было сказано ранее, заключается во внедрении атома кислорода в углеводородную цепь. Этот процесс достаточно сложен и в настоящее время нет однозначной точки зрения по этому вопросу.

Таблица 5.3.

**Характеристические частоты полос поглощения и соответствующие им функциональные группы.**

№	Функциональная группа	Область поглощения см <sup>-1</sup>						
		Нефть	Эконадин			Родекс		
			ЭК1	ЭКБ5	ЭКБ10	РК1	РБ5	РБ10
1	Деформационные колебания СН	730	730	730	730	730	730	730
2	Деформационные колебания СН	820	820	820	820	815	818	819
3	Деформационные колебания СН	-	890	880	880	875	880	880
4	Деформационные колебания СН и кольца	-	980	980	980	980	980	980
	Валентные колебания С-О-С, С-ОН	-	-	-	-	1040	1040	1040
5	Колебание кольца	-	1170	1173	1175	1170	1170	1170
6	Колебание кольца валентные С-О-С	-	1270	1270	1270	-	-	-
7	Деформационные колебания СН	1380	1380	1380	1380	1380	1380	1380
8	Деформационные колебания СН	1470	1470	1470	1470	1470	1470	1470
9	Колебания кольца С=С, С=О, ОН деформационные	-	1610	1613	1620	1650	1650	1650
10	Валентные С=О	-	1710	1710	1720	1720	1720	1720
11	Валентные С=О	-	1740	1740	1740	-	-	-
12	СН валентные	2870	2870	2870	2800	2800	2800	
13	СН валентные	2935	2935	2935	3000	3000	3000	

Как было показано ранее (см. раздел 4) основным механизмом окисления углеводородов большинством известных микроорганизмов осуществляется с помощью адаптивных энзимов (ферментов). В донных осадках прибрежной зоны трудно однозначно выделить разрушение нефтепродуктов за счет аэробного и анаэробного разложения.

Важнейшей особенностью микробиологической трансформации линейных углеводородов, в условиях донных осадков, является образование ароматических циклических структур, таких как гуматы.

### **5.3 Моделирование гумификации углеводородов.**

Особый интерес представляет процесс гумификации углеводородов, так как продукты, которые образуются в результате него, являются природными компонентами донных осадков и почв, а также активными сорбентами тяжелых металлов. При частичном окислении углеводородов, как правило, образуются гуминоподобные полимеры или нерастворимые смолистые вещества (киры). Протекает этот процесс в условиях пониженных температур и недостатка кислорода. Процесс гумификации продуктов промежуточного окисления углеводородов также является эффективным способом биохимической трансформации нефтяных углеводородов [130].

Образование гуминоподобных полимеров из нефтепродуктов, как в донных осадках, так и в почвах может быть одним из способов борьбы с нефтяными загрязнениями. Вышесказанное положение делает возможной ускоренную реабилитацию загрязненных илов и грунтов.

Для подтверждения предложенной гипотезы был проведен ряд исследований. Ранее было показано, что в лабораторных условиях под воздействием биодеструктора часть трансформаторного масла превращается в гуминовые соединения. Катализатором этого процесса могут быть ионы содержащие азот. Исследовалось влияние ионов аммония на процессы образования гуминоподобных веществ. В лабораторных условиях были

приготовлены специальные биоминеральные смеси, состав которых был аналогичен описанным ранее, но в их состав дополнительно вводили ион аммония в виде 3% раствора  $\text{NH}_4^+$ , в количестве – 1мл, 5мл, 10мл, 15мл. Полученные смеси культивировались в биологическом шкафу в течение 30 суток при температуре  $37\pm1^\circ\text{C}$  и влажности 100%. После окончания экспозиции образцы высушивались до воздушно сухого состояния при температуре до  $60^\circ\text{C}$ . В полученных образцах на анализаторе «МИКРАН» определяли остаточное количество трансформаторного масла. На рис. 5.10 представлены данные о влиянии ионов аммония на остаточное количество трансформаторного масла.

Как видно из рисунка ионы аммония оказывают катализическое действие на разрушение линейных алифатических углеводородов типа  $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$ . Для исследования состава веществ оставшихся после биодеструкции измельченные сухие образцы экстрагировались хлороформом. Методика проведения этих работ была аналогичной описанной ранее.

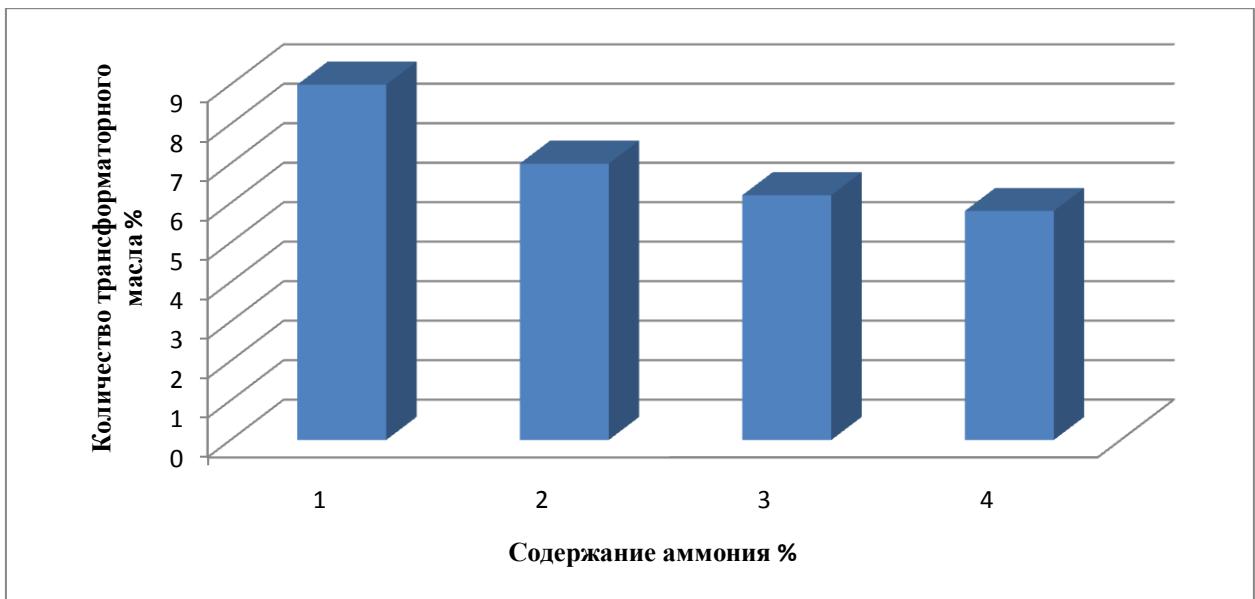


Рис.5.10 Влияние ионов аммония на остаточное количество нефтяных углеводородов.

На рис. 5.11.- 5.16 представлены ИК-спектры хлороформных вытяжек исследованных образцов.

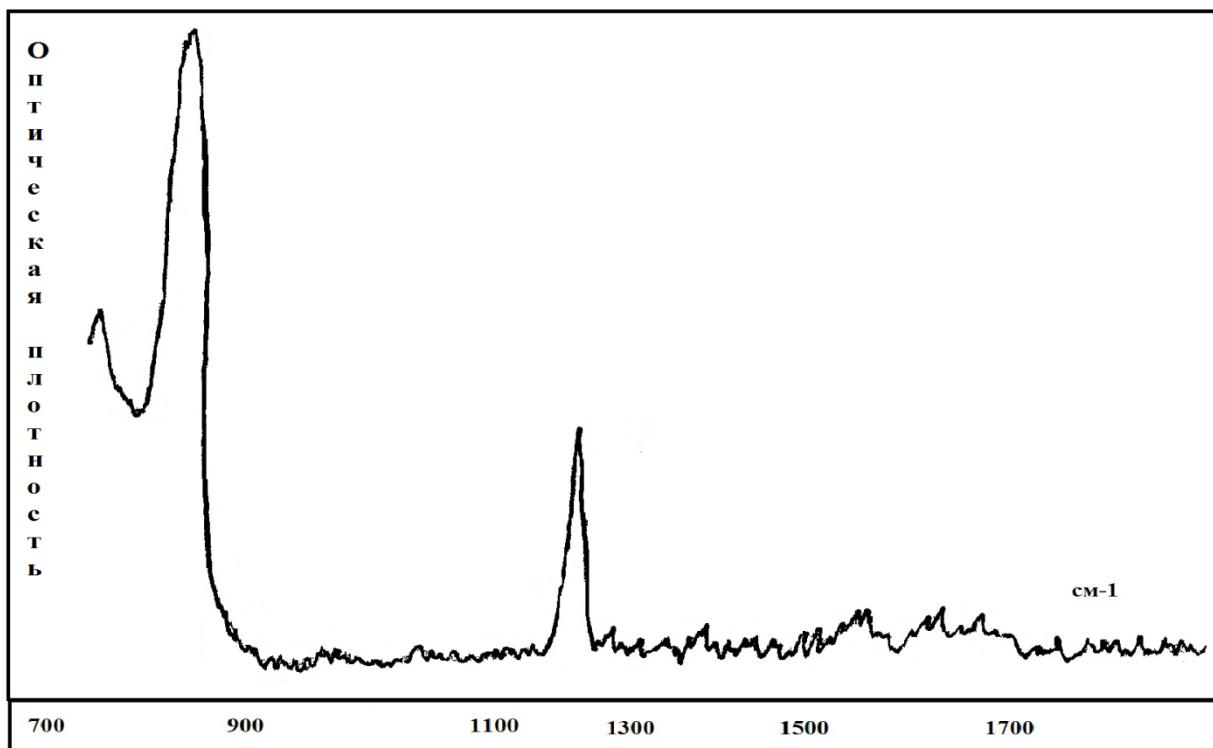


Рис. 5.11. ИК-спектр образца №1.

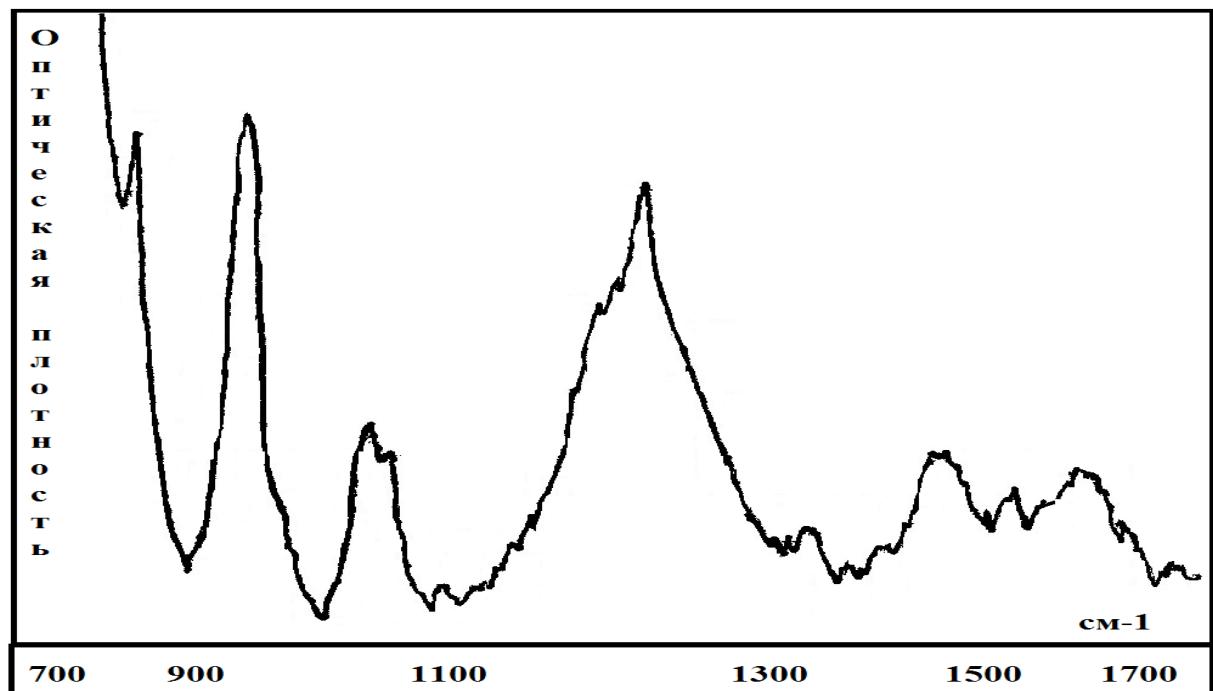


Рис. 5.12. ИК-спектр образца №2.

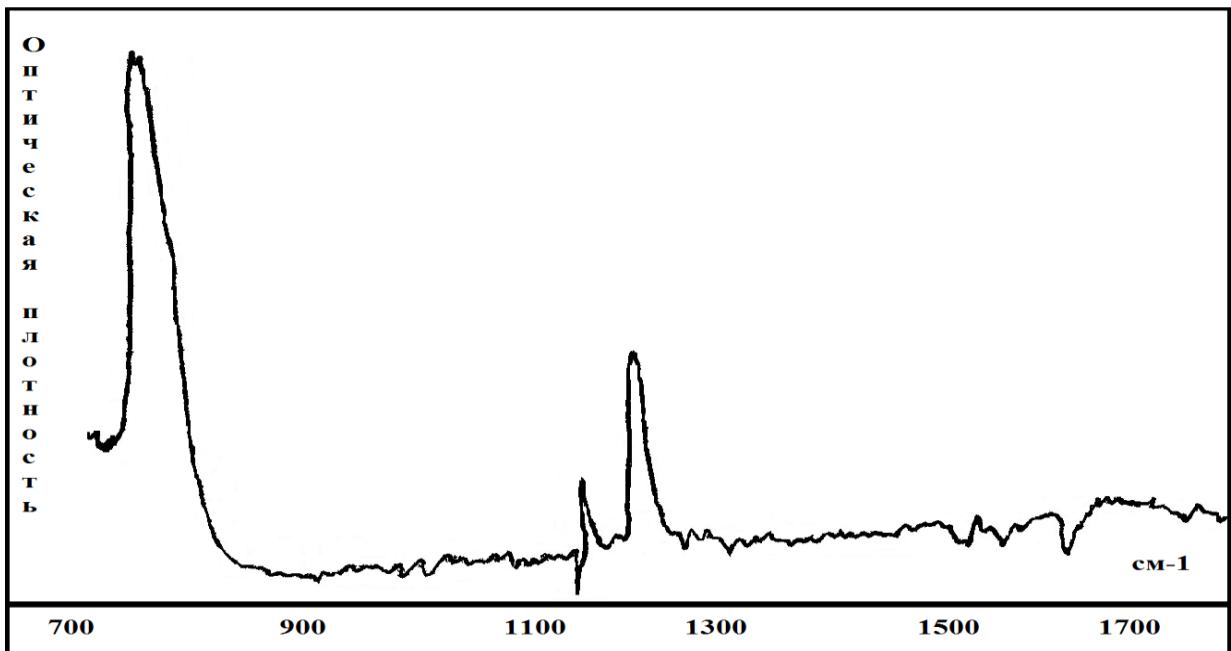


Рис. 5.13 ИК-спектр образца №3.

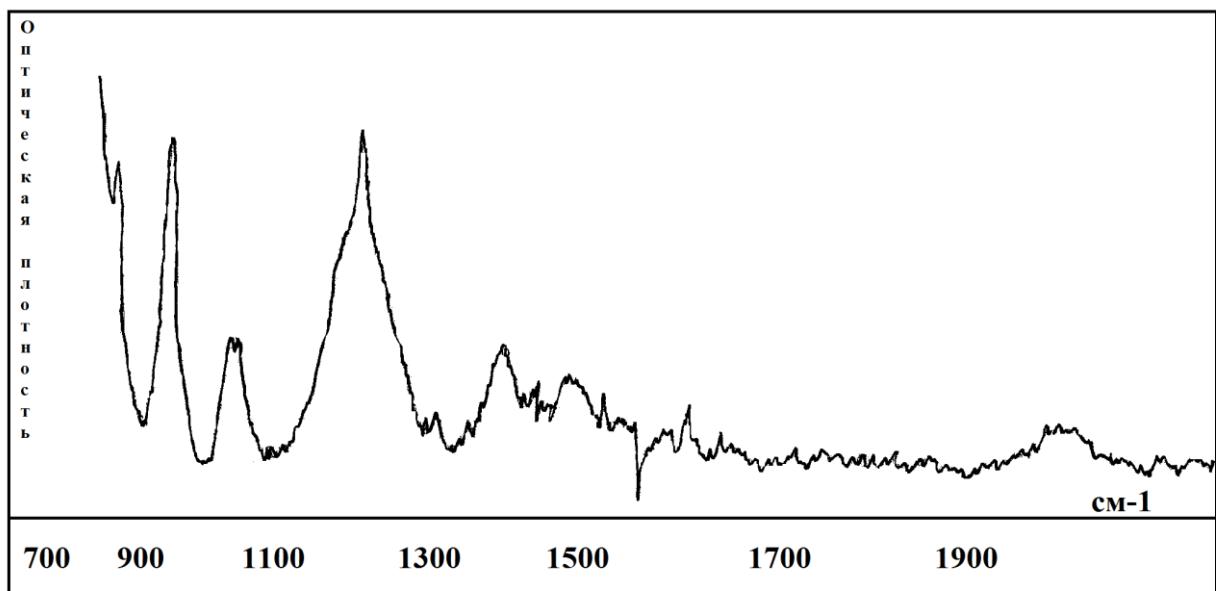


Рис. 5.14. ИК-спектр образца №4.

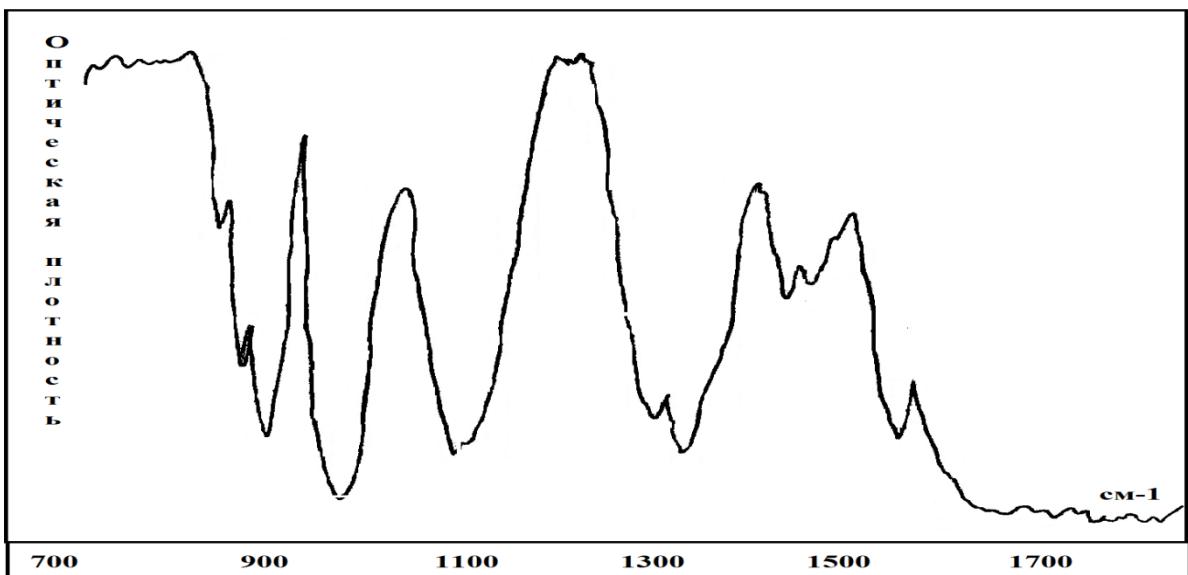


Рис.5.15. ИК-спектр образца №5.

В таблице приведены характеристические полосы поглощения, их интенсивность и соответствующие им функциональные группы (табл.5.4.).

Таблица 5.4.

## ИК-спектры экстрактов хлороформа после микробиологической деструкции с аммонием.

<b>№1 аммоний 5мл</b>		<b>№2 без аммония</b>		<b>№3 аммоний 1 мл</b>		<b>№4 аммоний 10 мл</b>		<b>№5 аммоний 15 мл</b>	
770	C-Cl	770	C-Cl	760	C-Cl	770	C-Cl	770	C-Cl
-	-	855	<b>Асим. кол. Кольца 9%</b>	-	-	855	<b>Кол. Кольца 6,2%</b>	855	<b>Кол. Кольца 5,8%</b>
-	-	930	C-Cl	-	-	930	Д. С-Н	880	Средние Д. С-Н
-	-	1020	<b>Кольцо 21%</b>	1040	B. С-О-С	1020	B. С-О-С <b>Кольцо 18%</b>	1050	Сильные C-Cl
1220	B. C-O-C	1220	B. С-О-С	1220	B. С-О-С	1220	Сильные. B. С-О-С	1220	Очень сильные B. С-О-С
-	-	1330	Д. С-Н	-	-	1330	Слабые Д. С-Н	1335	Слабые Д. С-Н
-	-	1430		-	-	1430	Д. С-Н B. С-ОН	1430	Очень сильные Д. С-Н, B. С-ОН
-	-	-	-	-	-	-	-	1480	<b>Сл. Кол. Кольца 3%</b>
-	-	1530	B. -C=O, Д. N-H	-	-	1530	B. -C=O, Д. N-H	1535	Сильные B. -C=O, Д. N-H
-	-	-	-	1640	B. -C=O Д. NH <sub>3</sub>	1640	Д. NH <sub>3</sub>	1605	<b>Средние кол. 11% Кольца</b>

Как видно из приведенных данных количество ароматических углеводородов в хлороформном экстракте, образовавшихся в результате биодеструкции, уменьшается с повышением концентрации иона аммония, что соответственно отражается на интенсивности соответствующих полос поглощения. В то время как остаточное количество углеводородов уменьшается. Уменьшение ароматических углеводородов экстрагируемых хлороформом при одновременном увеличении концентрации ионов аммония следует объяснить более глубокими процессами трансформации нефти и увеличением количества гуминоподобных полимеров нерастворимых в хлороформе.

Процессы гумификации обусловлены тем, что при недостатке растворенного кислорода возможно анаэробное окисление углеводородов нитратами и нитритами, образовавшимися из ионов аммония. Восстановительное аминирование промежуточных продуктов окисления углеводородов с образованием азотсодержащих органических соединений, в том числе аминокислот, предопределяет возможность включения избыточного азота, в состав вновь образовавшегося органического вещества (процесс гумификации). Эффективность процесса аминирования промежуточных продуктов окисления органических соединений и, соответственно, гумификации, зависит от содержания в системе иона аммония. [131].

Этот процесс может быть описан гипотезой А.Е. Браунштейна, согласно которой механизм, в результате которого происходит процесс образования гуминовых веществ, протекает через стадию синтеза аминокислот, которая протекает через стадию трансреаминации из  $\alpha$ -кетокислот и амиака. Сущность его сводится к восстановительному аминированию  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты с образованием глутаминовой кислоты (реакцию катализирует глутаматдегидрогеназа) и к последующему трансаминированию глутамата с любой  $\alpha$ -кетокислотой. Эта система

включения аммонийного азота в органические соединения с использованием трансфера аминогрупп свойственна многим бактериям и растениям [132].

В холодное время года при температуре воды меньше  $10^0\text{C}$  и при недостатке кислорода, процесс гумификации преобладает над процессом минерализации ( $\text{Сорг} > \text{Смин}$ ), в среднем гумификация — 80%, минерализация — 20%, тогда как в теплое время года, при благоприятном газовом режиме, процесс минерализации преобладает над процессом гумификации ( $\text{Сорг} < \text{Смин}$ ), в среднем гумификация — 30%, минерализация 70% [131].

Из приведенного механизма становится очевидным, что в илах прибрежной зоны при низких температурах, и в присутствии ионов аммония доминируют процессы гумификации над процессами минерализации органического вещества, а при прогреве воды до температуры выше  $10^0\text{C}$ , активно протекает процесс минерализации с разрушением углеводородов до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ .

По аналогии с донными осадками, в силу специфики антропогенных загрязнений почв нефтепродуктами, возможна совместная биохимическая трансформация нефтяных углеводородов и нитратов с образованием гумусовых веществ, элементный состав которых соответствует природным.

Известно, что процесс разрушения углеводородов под действием микроорганизмов протекает на границе раздела фаз минерал-раствор. Увеличение поверхности раздела фаз путем внесения в систему высокодисперсных минеральных веществ ускоряет процесс трансформации.

Наши исследования показали, что в лабораторных условиях биодеструкторы нефти в присутствии монтмориллонита способствуют синтезу ароматических, полициклических соединений, что подтверждается результатами ИК-исследований (см. рис. 5.8.б), в), г) и рис. 5.9. а), б), в)).

Предположительно образование растворимых в хлороформе циклических структур из нафтеновых углеводородов активно происходит под действием микроорганизмов в присутствии глинистых минералов.

Как было показано ранее, глинистые минералы стимулируют рост и развитие микроорганизмов. Одновременно с этим усиливаются процессы биодеструкции углеводородов. Использование природных дисперсных глинистых минералов (вермикулита, глауконита и цеолита) способствует заметному ускорению процессов микробной деградации углеводородов нефти. Применение микробной нефтеокисляющей культуры *Ps. putida* на поверхности цеолита способствует увеличению ее численности в воде и продлевает период активности бактерий [133]. Тем не менее, в настоящее время трудно однозначно оценить влияние глинистых минералов на эти процессы.

#### **5.4 Сорбция тяжелых металлов в процессе биодеструкции углеводородов в присутствии солей аммония.**

В данном подразделе исследовалась сорбция поливалентных катионов ( $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ) биоминеральной смесью подвергшейся воздействию биодеструктора «Эконадин» в присутствии ионов аммония. Для этого использовались образцы биоминеральной смеси после воздействия на них микроорганизмов, образовавшихся в результате экспериментов описанных в предыдущем разделе. Кроме этих образцов в опытах по сорбции использовались высушенные донные осадки Севастопольской бухты и бентонитовая глина Черкасского месторождения. Минеральный, химический и микробиологический состав этих образцов описан разделе 2 и 3. Характеристика сухого препарата донного ила приведена в разделе 2 , а бентонита в разделе 2 и 3.

Для исследования был приготовлен раствор, который одновременно содержал катионы  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ . Для приготовления растворов использовались хлориды соответствующих катионов. Полученный раствор

корректировался до рН 5-7,5 по аналогии с морской водой рН 7,3. В результате корректировки в растворе образовывался осадок гидроксидов соответствующих металлов, который отделялся от жидкости фильтрованием. В осветленной жидкости методом атомной абсорбции определяли содержание отдельных катионов металлов. Раствор содержал:  $\text{Fe}^{+3}$  – 2,7 мг/дм<sup>3</sup>,  $\text{Mn}^{+2}$  – 13,5 мг/дм<sup>3</sup>,  $\text{Pb}^{+2}$  3,4 – мг/дм<sup>3</sup>,  $\text{Cu}^{+2}$  – 20 мг/дм<sup>3</sup>,  $\text{Ni}^{+2}$  – 21 мг/дм<sup>3</sup>,

Для эксперимента 1 гр. сорбента смешивался со 150 мл раствора сорбата и помещался на магнитную мешалку на 30 минут. После этого образец помещался в термостат при температуре 25<sup>0</sup>С на сутки. По истечении указанного времени жидкая фаза отделялась от осадка путем фильтрования через фильтр «синяя лента», а в осветленном растворе определяли остаточное содержание анализируемых катионов. На рис.5.12. приведено количество катионов поглощенных донными осадками выраженное в процентах от его содержания в исходном растворе.



Рис. 5.17. Поглощение тяжелых металлов донными осадками.

Как видно из приведенных данных наилучшее средство донных осадков проявляется к многовалентным катионам переходных металлов

железа, меди, свинца, в то время как катионы марганца и никеля сорбируются меньше. Полученные результаты хорошо согласуются с результатами измерения тяжелых металлов в природных илах прибрежной зоны. Сравнивая сорбцию тяжелых металлов донными осадками (рис. 5.17) и бентонитовой глиной (рис.5.18.) видно, что характер сорбции этих металлов практически идентичен. Обращает на себя внимание относительно слабая сорбция марганца, как донными осадками, так и бентонитовой глиной, имеющей минеральный состав подобный к минеральному составу донных осадков. Можно предположить, что поглощение тяжелых металлов донными осадками в основном определяется минеральной фазой, однако этот тезис требует дополнительных исследований.

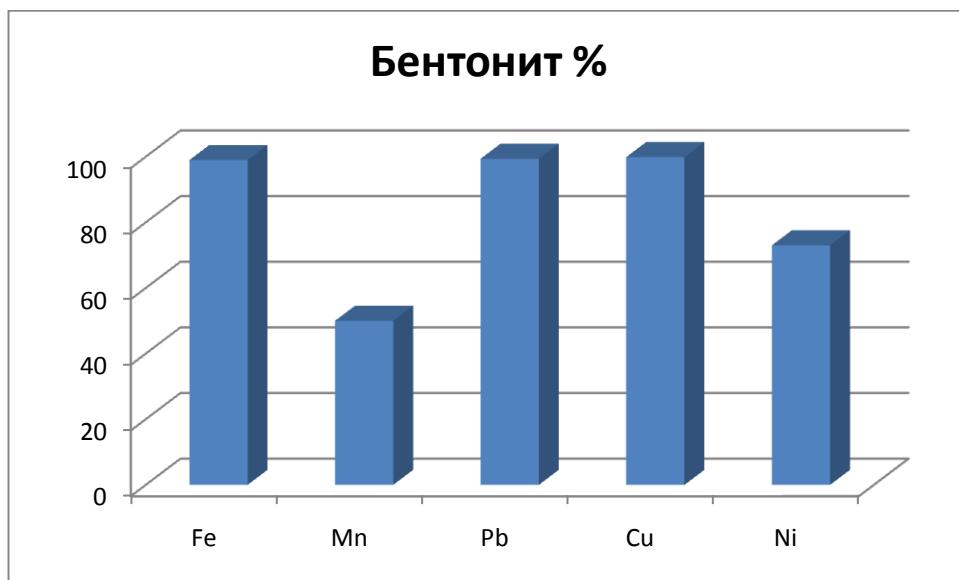


Рис. 5.18. Поглощение тяжелых металлов бентонитовой глиной.

Относительно низкая сорбция марганца связана с его фазовым составом. В условиях эксперимента (рН 7,5) марганец легко образует коллоидные растворы, сорбция которых минеральными частицами определяется не столько химическими свойствами катионов марганца, сколько агрегативной устойчивостью марганецсодержащих коллоидов.

В предыдущем разделе 4 было показано, что неполярные углеводороды под действием микроорганизмов в присутствие ионов аммония

трансформируются в гуминоподобные соединения (гуматы). Известно, что эти соединения к ионам поливалентных катионов обладают повышенным сродством. Для выяснения этой гипотезы были поставлены опыты по сорбции катионов  $Cu^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ , образцами биоминеральной смеси, которые подверглись воздействию микроорганизмов в присутствии ионов аммония (рис. 5.19.). На рис. 5.19. представлены результаты исследования сорбции катионов продуктами, образующимися после разрушения углеводородов микроорганизмами препарата «Эконадин» в присутствии ионов аммония.

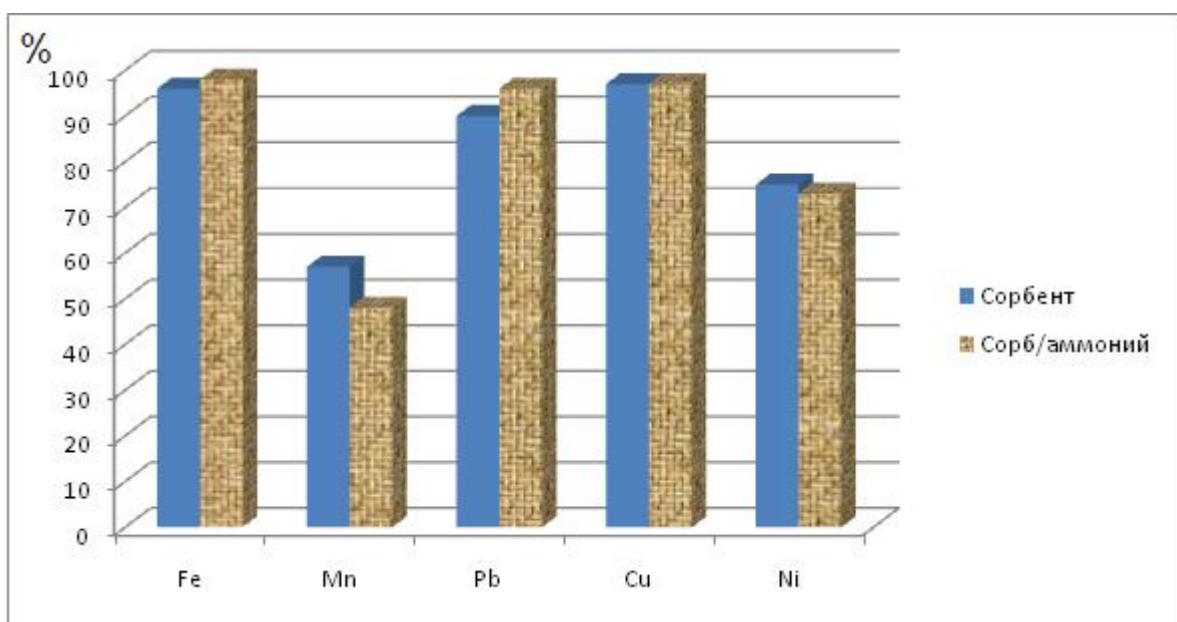


Рис. 5.19. Влияние ионов аммония на поглощение тяжелых металлов биоминеральной смесью.

Присутствие ионов аммония в биоминеральной смеси несколько увеличивает сорбционную способность исследуемых препаратов. Это связано с тем, что в процессе биотрансформации алифатических углеводородов образуются нерастворимые органические соединения склонные к сорбции многозарядных катионов. Из полученных данных видно, что соединения марганца сорбируются слабее сорбентом содержащим ион аммония. Полученные результаты корреспондируют с сорбией марганца, как донными осадками, так и чистым бентонитом. Относительно низкое

поглощение марганца и никеля в исследуемых образцах, вероятно, связано со способностью этих элементов образовывать коллоидную фазу в нейтральной или слабощелочной среде. В этих условиях поглощение марганца и никеля обусловлено не только взаимодействием ионов с органическими веществами осадка, но и агрегативной устойчивостью коллоидов. Присутствие в водной фазе органических веществ образующихся в результате биодеградации углеводородов, способствуют кинетической устойчивости коллоидов и наночастиц. Этим фактором объясняется высокая подвижность соединений марганца в Севастопольской бухте и выпадение этих соединений в осадок на выходе из бухты при изменении физико-химических условий. Вследствие этого органические и гуминовые кислоты поглощают его хуже, чем высокодисперсные минералы. Этим следует объяснить, что гуминовые кислоты способствуют образованию коллоидов и тем самым повышают их агрегативную устойчивость и соответственно затрудняют поглощение. Подобный процесс характерен и для марганца, который в водной фазе находится как в ионной, так и в коллоидной форме. Наличие коллоидных или псевдоколлоидных форм затрудняет его осаждение как в виде комплексных соединений с органическим веществом, так и при процессах коагуляции на высокодисперсных минеральных частицах.

Эта гипотеза также подтверждается природой образования железомарганцевых конкреций (ЖМК) при изменении термодинамических условий в дисперсионной среде и соответственно образованием осадка ЖМК.

Таким образом, повышение сорбционных способностей донных осадков, подвергшихся действию биодеструктора, в присутствии ионов аммония связано с образованием гуминоподобных полимеров, которые имеют повышенное сродство к железу, свинцу и меди. В то же время, гуминовые кислоты стабилизируют коллоидные растворы и препятствуют осаждению марганца и никеля.

## 5.5. Выводы раздела 5

Биохимическое моделирование трансформации углеводородов в лабораторных условиях показало:

Высокодисперсные глинистые минералы, составляющие основную массу минеральной части иловых донных осадков ускоряют рост и развитие биодеструкторов;

Неполярные углеводороды в присутствии глинистых минералов и биодеструкторов (бактерии и микромицеты) окисляют нефтепродукты с образованием кислородсодержащих радикалов (спирты альдегиды, кислоты) и частично преобразуют углеводороды в сложные гуминоподобные соединения. В присутствии ионов аммония этот процесс смещен в сторону образования гуминовых веществ;

Сорбция поливалентных катионов  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  возрастает в присутствии сложных органических веществ, в том числе гуматов, образующиеся при трансформации углеводородов. В отличие от этих катионов на ионы  $\text{Mn}^{+2}$  практически не влияют продукты биодеструкции углеводородов, так как при  $\text{pH} > 7$  марганец преимущественно находится в коллоидной форме.

## РАЗДЕЛ 6

### **РАЗРАБОТКА БИОМИНЕРАЛЬНОЙ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ОЧИСТКИ ТВЕРДЫХ ПОВЕРХНОСТЕЙ ОТ НЕФТЕПРОДУКТОВ.**

Для удаления нефти и нефтепродуктов с поверхности твердых тел, как правило, используются различные растворители и пены. В состав этих растворителей входят ПАВ и вещества ослабляющие адгезию нефтепродуктов к твердым поверхностям. Существенным недостатком этого метода является использование веществ, которые при взаимодействии с нефтепродуктами образуют соединения более опасные для окружающей среды, чем нефтепродукты. Эти недостатки могут быть значительно уменьшены, если использовать промышленные препараты, в состав которых входят микроорганизмы, способные трансформировать нефтепродукты в минеральные и малотоксичные органические вещества.

Среди большого количества биодеструкторов, производимых в мире, в Украине выпускаются «Эколан», «Эконадин», «Родекс-Т» и др. [134], которые состоят из консорциума нефтеразрушающих микроорганизмов, инокулированных на поверхность торфа. Эти препараты предназначены для использования в грунтах и на поверхности воды. Существенным недостатком микробиологических биодеструкторов является незначительная адгезия к минеральным и искусственным поверхностям. Недостатки этих препаратов можно минимизировать благодаря предлагаемому способу.

Известен способ очистки твердых поверхностей загрязненных нефтепродуктами, который заключается в том, что гидрофобные загрязнения удаляются с поверхности твердого тела с помощью жидкой магнитной пены, производимой в месте использования из известных компонентов стандартными методами, которая потом собирается магнитными подборщиками и разрушается с удалением поглощенных гидрофобных загрязнений [135-139].

В качестве компонентов для создания пены используют одно из следующих веществ: 6-оксиэтилированный додециловый спирт, 15-оксиэтилированный октилфенол, цитилпиридинный хлорид, додецилсульфат натрия, олеат натрия, додецилуретан сахарозу, ацетилцеллюзозу, полиакрилонитрил, ацетон, бензол, полиамидокислоту, полисульфонамид, диметилформамид, бензин, или любую их комбинацию.

Для получения пены используют следующие установки: воздушно-пенные стволы, установки генерирующие пену за счет барботирования воздуха через раствор пенообразующего вещества, пеногенераторы с образованием пены на сетках.

Для разрушения пены на поверхности твердых тел, используют механические и физические методы – устройства вибрационного типа, гидродинамический – струйные пеноразрушители, аэродинамический, акустический, например ультразвуковой и термический методы, химические методы, или любую их комбинацию.

В качестве магнитной компоненты используют магнитные наноразмерные частицы, которые содержат: Fe, Co, Ni, Cr, Nd, Sm, Gd, и др. Магнитные наночастицы вводят в пену из раствора, представляющего углеводородное (трансформаторное, веретенное, силиконовое), или другое масло, которое содержит 20-60% магнитных наночастиц, стабилизованных добавками ароматических соединений (фенола, нафталина, крезолов).

Недостатком предложенного способа удаления нефтепродуктов является загрязнение окружающей среды высокотоксичными веществами, такими как ПАВ, нафталин, крезол, фенол, которые по своей токсичности значительно превышают токсичность нефти и нефтепродуктов.

Использование углеводородокисляющих микроорганизмов позволило создать экоогически безопасную биоминеральную композицию для разрушения нефтемасляных загрязнений на поверхности твердых тел.

Была проведена серия экспериментов, позволяющая оценить оптимальный состав глинисто-микробной композиции и эффективность такого способа.

Для исследований использовались промышленно выпускаемые биопрепараты биодеструкторы: «Родекс-Т», «Эконадин» и «Эконадин-2». Характеристика этих препаратов приведена в разделе материалы и методы.

В качестве объекта использовался гранитный гравий, силикатная плитка и бетон, загрязненные нефтепродуктами.

Препараты «Эконадин» и «Родекс-Т», являясь гидрофобными порошками, с водой практически не смешиваются. Попытка нанести водосодержащий пастообразный препарат на поверхность гравия, загрязненного нефтепродуктами, оказалась неудачной, так как частицы препарата легко отделялись от загрязненной поверхности.

С целью повышения гидрофильтрации и биологической активности были разработаны специальные композиции, состоящие из биодеструктора, бентонитовой глины Черкасского месторождения и воды. Влияние бентонита на разрушение нефтяных загрязнений на поверхности гравия приведены в таблице.6.1.

Из коммерческих препаратов были получены водные суспензии при соотношении твердая фаза/жидкость (Т:Ж) – 1:20. В полученную суспензию вносили загрязненные образцы гравия и оставляли в биологическом термостате при 37 С° в течение 10 дней. После завершения процесса культивирования образцы гравия извлекались из водной суспензии, промывались дистиллированной водой и высушивались.

Таблица 6.1.

**Влияние бентонита на разрушение нефтяных загрязнений на поверхности гравия.**

Состав смеси	Остаточное количество углеводородов %
Эконадин	30
Эконадин, бентонит 5%	26
Эконадин, бентонит 10%	20
Эконадин, бентонит 15%	16
Эконадин, бентонит 20%	8
Эконадин, бентонит 25%	20

Для определения остаточных нефтепродуктов, гравий подвергшийся воздействию биопрепараторов экстрагировался хлороформом при температуре 50-60С<sup>0</sup> до полного растворения поверхностных нефтяных пленок. В полученном экстракте определялось остаточное количество нефтепродуктов.

Повышение биологической активности биодеструкторов достигалось путем введения бентонитовой глины в смесь вода+биодеструктор. Результаты исследований приведены в таблице 6.2.

Таблица 6.2.

**Разрушение углеводородов микроорганизмами**

№ п.п.	Биопрепарат	Среда	Остаток углеводородов	
			МГ/Г	%
1	Эконадин	вода	0,005	38
2	Родекс-Т	вода	0,004	30
3	Эконадин	бентонит, вода	0,0027	20,8
4	Эконадин-2	бентонит, вода	0,0026	20
6	Родекс-Т	бентонит, вода	0,0008	6,15

Как видно из полученных данных, присутствие в водной среде биодеструктора приводит к частичному разрушению нефтяных пленок. В условиях эксперимента с поверхности загрязненного гравия удается удалить не более 70% нефтепродуктов. Внесение бентонита приводит к более полному удалению нефтепродуктов. Природа биостимулирующего действия бентонита была описана ранее.

В общем случае действие нефтяных биодеструкторов можно рассматривать следующим образом: в течение 1-3 часов после соединения биопрепарата с нефтепродуктом ферменты расщепляющие углеводороды изменяют структуру нефтепродукта: разжижают и частично разрушают нефтепродукт, тем самым существенно облегчая его усвоение микроорганизмами. Затем углеводородокисляющие микроорганизмы активизируются в нефтяной среде в течение 24 часов с момента соединения биопрепарата с нефтепродуктом и при наличии благоприятных условий сохраняют жизненную активность с образованием новых колоний до усвоения и переработки массы нефтепродукта [140].

Изучение трансформации нефтяных загрязнителей, подвергшихся действию биодеструктора, проводили методом ИК - спектроскопии. Для получения аналитического препарата из хлороформной фракции, после отделения хлороформа был получен остаток, который наносился на поверхность пластинки из KBr. ИК - спектры органического вещества до и после обработки гравия биопрепаратами представлены на рис. 6.1.

Полосы поглощения на ИК – спектрах можно интерпретировать следующим образом:  $465\text{-}470\text{cm}^{-1}$  может быть идентифицирована как колебания Si-O-Si в алюмосиликатах;  $535\text{cm}^{-1}$  как колебания Si-O-Al;  $730\text{cm}^{-1}$  как деформационные колебания C-H групп в углеводородах;  $880\text{cm}^{-1}$  - деформационные колебания C-H групп;  $1040$  и  $1090\text{cm}^{-1}$  - Si-O колебания в алюмосиликатах;  $1380$ ,  $1410$ ,  $1470\text{ cm}^{-1}$  – деформационные колебания C-H групп;  $1510$  и  $1610\text{ cm}^{-1}$  объясняется колебанием кольца в ароматических

компонентах нефтепродуктов;  $1725\text{cm}^{-1}$  – валентные колебания C=O карбонильной группы;  $2800 - 3000\text{cm}^{-1}$  валентные колебания C-H групп.

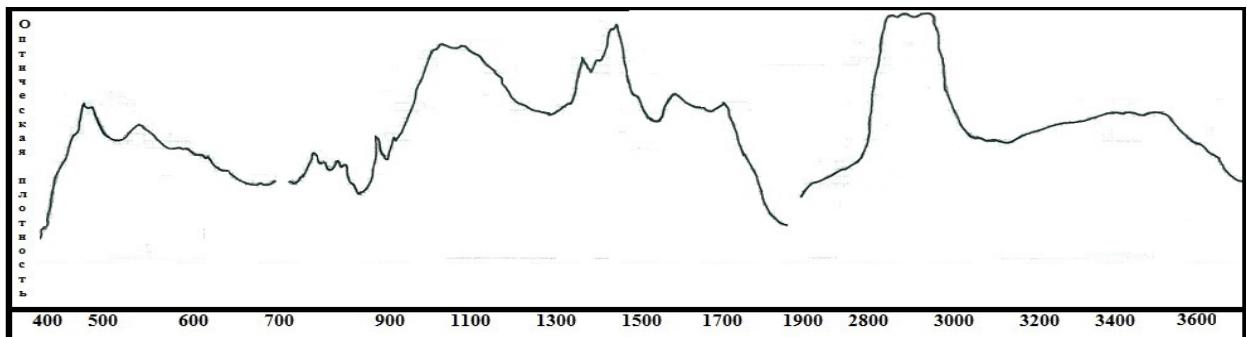


Рис.6.1. а)

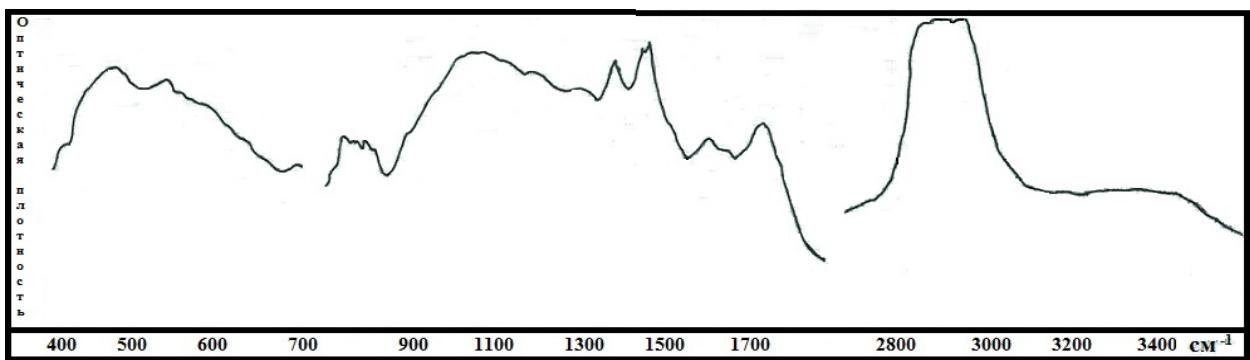


Рис.6.1. б)

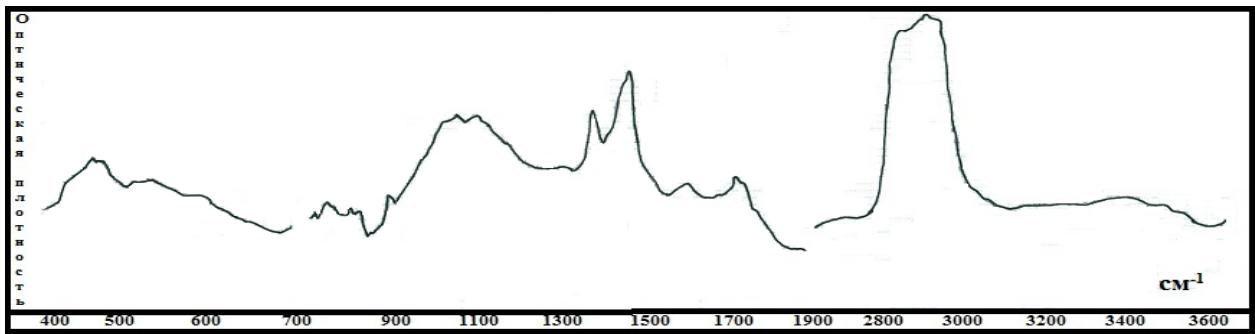


Рис.6.1. в)

Рис.6.1. ИК-спектры сухого остатка хлороформных экстрактов: а) до обработки биопрепаратором; б) после обработки препаратом «Эконадин-2»; в) после обработки препаратом «Родекс-Т».

Из анализа полученных данных следует, что помимо углеводородов, хлороформный экстракт содержит высокодисперсные алюмосиликаты, которые в процессе экстракции выносятся с поверхности гравия и накапливаются в колбе экстрактора. Используя данные приведенные на рис.6.1., мы рассчитали оптическую плотность некоторых отдельных полос поглощения в остатке хлороформных вытяжек после полного удаления хлороформа, которая приведена в таблице 6.3. С целью уменьшения погрешности при оценке количества ароматических углеводородов, использовался внутренний стандарт в виде полосы поглощения CH с частотой  $1470\text{cm}^{-1}$ . Для оценки количества ароматических ядер предлагается использовать коэффициент – K, как отношение оптических плотностей полос поглощения при CH -  $1470\text{cm}^{-1}$  колебаний к оптической плотности колебания кольца при  $1610 \text{ см}^{-1}$   $K = D_{1470}/D_{1610}$ . Аналогичным образом рассчитывался коэффициент  $K_1$  как отношение  $D_{1470}/D_{1725}$ .

Таблица 6.3

### **Оптическая плотность ИК – полос поглощения нефтяных углеводородов до и после обработки биопрепаратором.**

Полосы поглощени я $\text{см}^{-1}$	Функциональные группы	D - оптическая плотность			
		Обработка биопрепаратами			
		До обработки	Эконадин	Эконадин-2	Родекс-Т
1470	-CH	1,83	1,04	1,42	1,04
1610	Кольцо	0,63	0,37	0,30	0,15
1725	-C=O	0,66	0,65	0,61	0,28
K	$1470/1610$	2,9	2,8	4,7	6,9
$K_1$	$1470/1725$	2,8	1,6	2,3	3,7

Из данных видно, что различные биопрепараты оказывают неодинаковое действие на углеводороды. Близкое значение К и К<sub>1</sub> для исходных нефтепродуктов и нефтепродуктов после воздействия на них препарата «Эконадин», связано с тем, что микроорганизмы препарата разрушают алифатические и ароматические компоненты нефтепродуктов в соотношении, в котором они находились в исходном образце. Микроорганизмы в биопрепарате «Эконадин-2» и особенно в «Родекс-Т» более активно разрушают ароматические компоненты, в результате этого коэффициент – К, увеличился с 2,8 до 4,7 для «Эконадин-2» и 6,9 для препарата «Родекс-Т».

Использование водной суспензии биопрепаратов для разрушения пленки нефтепродуктов на поверхности гравия затруднено, так как гидрофобные частички торфа в биопрепаратах имеют слабую адгезию к загрязненной поверхности. В предыдущих разделах было показано, что бентонитовая глина в зависимости от ее концентрации в среде активизирует рост аэробных микроорганизмов.

Недостаток биодеструктора заключающийся в слабой адгезии частиц торфа к твердой минеральной поверхности может быть минимизирован при добавлении к биодеструктору бентонитовой глины.

Известно, что [141] монтмориллонит, составляющий основную часть бентонитовой глины, имеет как гидрофильные, так и гидрофобные центры. Гидрофильные центры преимущественно локализованы на боковых гранях, торцах микрокристаллов и обусловлены силанольными (SiOH) и алюминольными (AlOH) центрами, а гидрофобные центры обусловлены насыщенными SiO-Si связями, преимущественно локализованными на базальных гранях. Такое расположения гидрофильных и гидрофобных центров на микрокристалле монтмориллонита дает возможность снизить энергию взаимодействия твердая фаза - вода и способствовать адгезии композита к гравию. Становится ясно, что лишь при определенном

соотношении гидрофобного материала (биодеструктор) и гидрофильно-гидрофобного минерала (монтмориллонит), можно получить композицию, имеющую высокую адгезию к очищаемой поверхности. Для оптимизации соотношения биопрепарат-бентонит в системе бентонит-вода, исследовались адгезионные свойства и способность полученной смеси к разрушению нефтесмоляных загрязнений. В таблице 6.4. приведены результаты лабораторных исследований композиций с различным составом.

Таблица 6.4.

**Влияние состава биоминеральной композиции на разрушение нефтепродуктов**

Состав смеси	Эффективность адгезии
Эконадин	Практически отсутствует
Бентонит	Высокая
Эконадин, бентонит 5%	Низкая
Эконадин бентонит 10%	Средняя
Эконадин бентонит 20%	Высокая

Из приведенных данных следует, что на активность композита разрушать нефтепродукты существенное влияние оказывает количество бентонита в смеси. Экспериментально установлено, что оптимальные результаты получены при содержании бентонита к биопрепаратору как 1,5:10.

На основе полученных данных разработан оптимальный состав композиции, пригодной для удаления загрязнений с твердых поверхностей. Разработанная композиция также может быть использована для очистки керамических, кафельных и бетонных поверхностей.

Нами предлагается способ изготовления глинисто-минеральной смеси, пригодной для очистки всех видов твердых поверхностей.

Для получения рабочей композиции в емкость из нержавеющей стали, обеспеченной мешалкой и терморубашкой, загружается 1 кг биодеструктора «Эконадин».

При перемешивании к препарату постепенно вносят 200 гр. бентонитовой глины Черкасского месторождения марки БМ-У. После равномерного распределения бентонита в биодеструкторе в полученную смесь добавляют очищенную воду до образования пастоподобной массы.

Необходимая густота полученной массы определяется структурой и свойствами загрязненной поверхности.

Для активизации микроорганизмов в полученную смесь добавляют 5-10мл трансформаторного масла. Смесь перемешивается и оставляется на 24 часа при температуре  $37\pm1^{\circ}\text{C}$ . После указанного времени композиция готова к использованию.

Очистку гравия, загрязненного нефтепродуктами можно проводить следующим образом: в емкость объемом 3л. загружается 1кг загрязненного гравия, на который наносили предварительно подготовленную биоминеральную композицию, с расчета 0,1 мл на  $1\text{cm}^2$  поверхности загрязненного гравия. Емкость закрывалась полупроницаемой пленкой и помещалась в термостат при температуре  $37\pm1^{\circ}\text{C}$  и влажности 100% на 21 день. После завершения экспозиции образцы промывались струей воды для удаления остатков биоминеральной композиции. После высушивания в образцах определялся остаток нефтепродуктов. На рис.6.2. представлены образцы гравия до и после очистки.

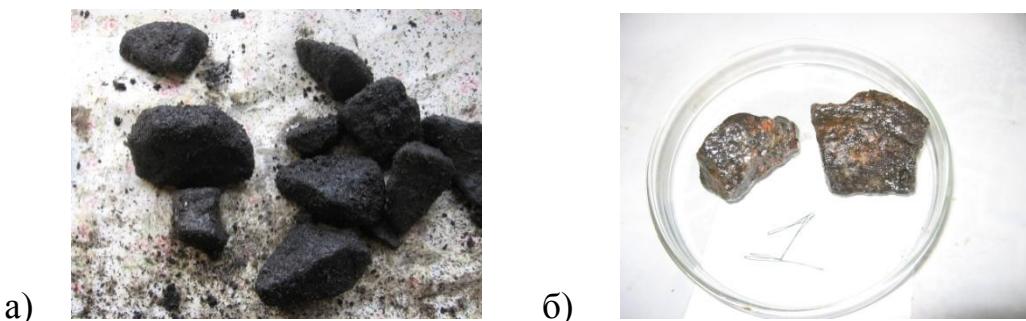


Рис.6.2. Образцы гравия: а) до обработки биопрепаратом; б) после обработки биопрепаратом Эконадин.

Остаточное количество нефтепродуктов в образцах, приведено в таблице 6.5. Кроме того, в таблице 6.5. приведены результаты содержания нефтепродуктов в гравии и контрольном образце, в котором вместо «Эконадина» использовалось эквивалентное количество измельченного торфа.

Таблица 6.5.

**Эффективность очищения гравия биоминеральной композицией.**

Номер образца	Остаточное количество углеводородов %
1 биоминеральная композиция	20,8
2 биоминеральная композиция	18,6
3 биоминеральная композиция	21,5
4 бентонит + торф	55,38

Очистка плоских вертикальных кафельных или керамических поверхностей от нефтепродуктов проводилась следующим образом:

На поверхность кафельной или керамической плитки, загрязненной отработанным трансмиссионным маслом, наносился слой предварительно подготовленной биоминеральной композиции толщиной 0,5-1 см. Плитка покрывалась полиэтиленовой пленкой, которая препятствовала испарению влаги из биоминеральной композиции. Плитки устанавливались вертикально. Экспозиция проводилась в лабораторном помещении при температуре 22-28<sup>0</sup>С и влажности воздуха 50-70% на протяжении 30 суток. После указанного срока с поверхности плиток удалялась защитная пленка, а поверхность промывалась струей воды до полного удаления остатков биоминеральной композиции.

Результаты эксперимента приведены на рис. 6.3., где представлена кафельная плитка до и после эксперимента. Экспериментально установлено, что таким способом удаляется до 90% нефтепродуктов.



Рис.6.3. Очистка кафельной плитки от нефтепродуктов. а) загрязненная кафельная плитка; б) кафельная плитка с биоминеральной композицией; кафельная плитка после очистки биоминеральной смесью.

Разработанная биоминеральная смесь также была опробована на бетонной поверхности загрязненной нефтью. Очистка бетонных пластин проводилась следующим образом: на плоские бетонные пластины, загрязненные нефтью наносился слой предварительно подготовленной биоминеральной композиции толщиной 0,5-0,8 см. Подготовленные таким образом образцы бетона помещали в термостат при температуре  $37\pm1^{\circ}\text{C}$  и влажности 98-100% на 21 день. По окончании экспозиции бетонные пластины промывались струей воды для удаления остатков биоминеральной композиции. Качество очистки оценивали визуально рис. 6.4.

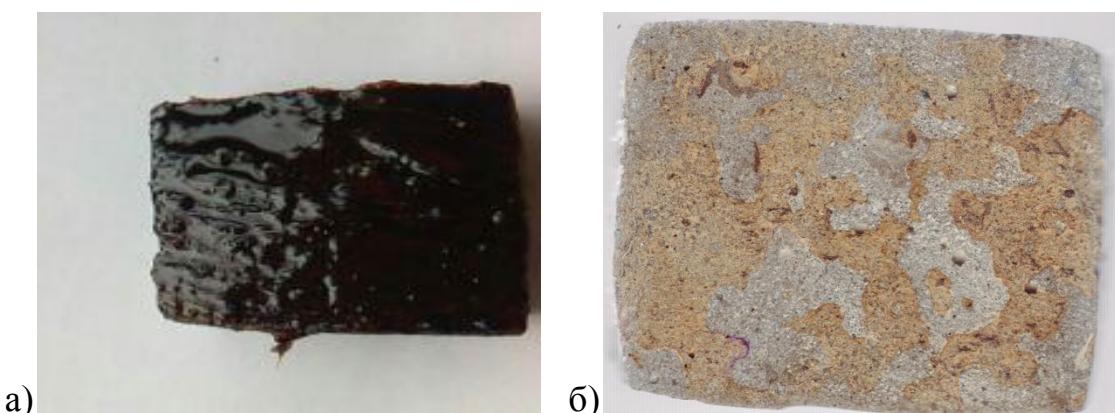


Рис.6.4. Бетонная пластина

а) загрязненная нефтепродуктами; б) после очистки биоминеральной смесью.

По данным визуального исследования с поверхности бетона удаляется до 90% нефтепродуктов. На поверхности бетона остаются только отдельные загрязненные участки, поддающиеся только механическому удалению.

Разработанная биоминеральная композиция не содержит токсических для окружающей среды компонентов, остатки биоминеральной композиции могут сбрасываться непосредственно в городской коллектор.

Предложенный способ очистки минеральных и искусственных поверхностей от нефтепродуктов позволяет эффективно очищать твердые поверхности, изготовленные из различных материалов, специальной биоминеральной композицией, которая состоит из биодеструктора нефтепродуктов и высокодисперсных слоистых силикатов. Высокая эффективность метода определяется стимулирующим действием бентонитовой глины на микроорганизмы, которые разрушают нефть. Дополнительно использование бентонита позволяет значительно улучшить гидрофильтро-гидрофобные свойства композиции, что позволяет использовать ее как на гидрофильтральных, так и на гидрофобных поверхностях.

## 6.1 Выводы раздела 6

1. Разработана биоминеральная композиция, состоящая из биодеструктора бентонитовой глины и воды, в соотношении 10:2:30 способная разрушать нефтесмоляные загрязнения.
2. При нанесении такой композиции на гравий загрязненный нефтепродуктами из расчета 0,5-1мл на 1см<sup>2</sup> поверхности, позволяет удалить до 90% нефтяного загрязнения.
3. Нанесение на поверхность керамической плитки толщиной 0,5 см позволяет удалить 97% загрязнения.
4. При нанесении слоя композиции толщиной 0,5-,8см на поверхность пористого бетона удаляется до 80% загрязнения.
5. Разработанная композиция экологически безопасна для окружающей среды, так как не содержит опасных и токсических веществ.

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что минеральный состав донных отложений прибрежной зоны представлен высокодисперсной кальцитом, кварцем и глинистыми минералами (монтмориллонит, иллит, хлорит, каолинит). В иловой части донных отложений количество органического вещества не превышает 3% и на 80% представлено гуматами, а на 20% - углеводородами.

Количество органического вещества в песчаной фракции донных отложений не превышает 0,1%.

2. Существенная часть тяжелых металлов (около 40%) в донных отложениях находится в виде нерастворимых гуминоподобных полимеров, образовавшихся в результате биогеохимических преобразований неполярных углеводородов. Около 30% тяжелых металлов находятся в виде низкомолекулярных соединений, до 20% - сорбированы на высокодисперсных минералах.

3. Содержание марганца в донных отложениях на выходе из Севастопольской бухты составляет 600 мг / кг и соизмеримо с его количеством в иловых отложениях прибрежной зоны Карадагского заповедника, что обусловлено пребыванием соединений марганца в коллоидной форме. При столкновении слабосоленых вод бухты с более солеными водами открытого моря коллоидные частицы марганца теряют кинетическую устойчивость и выпадают в осадок.

4. Доминирующими микроорганизмами в донных отложениях являются нефтеокисляющие бактерии и микромицеты. Среди бактерий доминирует род *Pseudomonas*. В микологическом составе донных отложений преобладают виды *Aspergillus* и *Penicillium*.

5. Биохимическое моделирование трансформации углеводородов в лабораторных условиях, имитирующих донные отложения, показало, что высокодисперсные глинистые минералы, которые составляют основную массу минеральной части иловых донных отложений, ускоряют рост и развитие микроорганизмов.

6. Неполярные углеводороды в присутствии глинистых минералов и биодеструкторов (бактерии и микромицеты) окисляют нефтепродукты с образованием кислородсодержащих радикалов (спирты, альдегиды, кислоты) и частично превращают углеводороды в сложные гуминоподобные соединения. В присутствии ионов аммония этот процесс смещается в сторону образования гуминовых веществ. На спектрах это выражается появлением полос поглощения в области  $1170\text{ cm}^{-1}$ ,  $1270\text{ cm}^{-1}$ ,  $1715\text{ cm}^{-1}$  и  $1735\text{ cm}^{-1}$ , которые соответствуют валентным колебаниям кислородсодержащих групп.

7. Инфильтрация нефтяных углеводородов через слой почвы, в котором содержатся микроорганизмы, сопровождается их трансформацией и связана с внедрением кислорода в углеродную цепь. В ИК-спектрах появляются полосы, отвечающие за функциональные группы спиртов, кислот, простых и сложных эфиров, а также происходит частичное образование ароматических циклов и высокомолекулярных гуминоподобных полимеров.

В этих условиях меняется микологический состав среды. Наиболее устойчивыми являются меланин-синтезирующие микромицеты семейства *Aternaria tenuissima*, *Cladosporium sp.*, Которые могут быть индикаторами углеводородного загрязнения.

8. Сорбция поливалентных катионов возрастает на продуктах биодеградации нефтяных углеводородов, взаимодействуя с активными центрами минеральных наночастиц донных отложений, увеличивают активную поверхность частиц, образуют новые активные центры, что способствует повышению их сорбционных свойств по отношению к тяжелым металлам.

9. Ионы  $Mn^{2+}$  как в естественных, так и в лабораторных опытах, лишь частично (не более 50%) поглощаются продуктами биотрансформации нефтепродуктов, так как в основном находятся в виде коллоидных частиц.

10. На основе экспериментально полученных результатов разработана биоминеральная композиция и способ ее использования для очистки минеральных и искусственных твердых поверхностей. Биоминеральная

композиция состоит из биодеструктора, бентонитовой глины и воды и способна разрушать нефтяные загрязнения. При нанесении такой композиции на гравий, загрязненный нефтепродуктами, удается удалить до 90% нефтяного загрязнения; с поверхности керамической плитки - 97%, с поверхности бетона - 80%. Разработанная композиция является экологически безопасной для окружающей среды, так как не содержит токсичных веществ. На основе экспериментальных данных получен патент Украины №107757 от 24.06.2016.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Трофимов С.Я. Актуальные проблемы рекультивации нефтезагрязненных почв таежной зоны Западной Сибири // Современные проблемы загрязнения почв: II междунар. науч. конф. Сб. мат. — М., 2007. — Т. 1. — С. 36—37.
2. Бахвалов А.В. Влияние нефтяного загрязнения на свойства дерново-подзолистой почвы / А.В. Бахвалов, М.С. Розанова, Т.И. Мушаева // Современные проблемы загрязнения почв: II междунар. науч. конф. Сб. мат. — М., 2007. — Т.1. — С. 311—314.
3. Алексин В.Г. Почвоутомление сероземов Чуйской долины. Дисс. на соиск. уч. ст. д.с/х.н. М., 1996.
4. Будников Г.К. Тяжелые металлы в экологическом мониторинге водных систем. // Соросовский образовательный журнал. 1998. — №5. — С. 23—29
5. Луковникова Л.В. Металлы в окружающей среде, проблемы мониторинга /Л.В. Луковникова, А.Д. Фролова, М.П. Чекунова // Эфферентная терапия. — Т.10. — 2004. — С.74—79.
6. Никаноров А.М. Биомониторинг металлов в пресноводных экосистемах /А.М. Никаноров, А.В. Жулидов // СПб.: Гидрометеоиздат. — 1991. — 312 с.
7. Шилов В.В. Токсикология свинца / В.В. Шилов, Е.В. Полозова, А.С. Богачева, Н.М. Фролова // Пособие для врачей. СПб: Издательство Политехнического университета. 2010. — С. 4—5.
8. Антонова Ю.А., Сафонова М.А. Тяжёлые металлы в городских почвах //Фундаментальные исследования. — 2007. — № 11. — С. 43—44
9. Израэль Ю.А. Экология и контроль состояния природной среды / Ю.А. Израэль. — М.: Гидрометеоиздат, 1984. — 560 с.
10. Грищенко Л.И., Акбаев М. Ш. Васильков Г.В., Болезни рыб и основы рыболовства. — М.: Колос, 1999. — 456 с.

11. Стравинская Е.А. Роль контактной зоны «вода- донные отложения» в круговороте железа и марганца, Эвтрофирование мезотрофного озера. — Л.: Наука, 1980, — 248 с.
12. Новиков Б.И. Донные отложения Днепровских водохранилищ. — Киев: Наукова думка, 1985, — 170 с.
13. Манихин В.И., Никаноров А.М. Растворенные и подвижные формы тяжелых металлов в донных отложениях пресноводных экосистем. — С.-П.: Гидрометеоиздат, 2001, — 181 с.
14. Майстренко В.Н., Хамитов Р.З., Будников Г.К. Эколого-аналитический мониторинг супертоксикантов. — Химия, 1996. — 319 с.
15. Карюхина Т.А., Чурбанова И.Н. Химические воды и микробиология. — М.:Стройиздат, 1974. — 215 с.
16. Денисова А.И. Формирование гидрохимического режима водохранилищ Днепра и методы его прогнозирования / А.И. Денисова. — Киев: Наук. думка. 1979. — 290 с.
17. Nriagu J.O. Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere/ Nature 279, 1979, 409—411.
18. Young D.R., J.H. Johnson, A. Soutar, and J.D. Isaacs. Mercury concentrations in dated varved marine sediment collected off southern California. — 1973, Nature 244: 273—274.
19. Линник П.Н., Набиванец Б.Н. Формы миграции металлов в пресных поверхностных водах. — Л.: Гидрометеоиздат, 1986, — 268 с.
20. Линник П.Н. О содержании и формах миграции тяжелых металлов в донных отложениях пресных и солоноватых водоемов, взаимодействие между водой и седиментами в озерах и водохранилищах. — Л.: Наука, 1984. — 256 с.
21. Schafer H.A. Characteristics of municipal wastewater discharges, 1975/ Annual Report, Southearn California Coastal Water Research Project, El Segund. 1976. — pp. 57—60.

22. Nriagu J.O., 1979b. The global copper cycle. In: J.O. Nriagu (Ed.), Copper in the environment, Part I, Ecological cecling/ Wiley, New York, pp. 1—17.
23. Прохорова Н.В., Матвеев Н.М. Тяжёлые металлы в почвах и растениях в условиях техногенеза // Вестник СамГУ. 1996. — Спец. Выпуск. — С. 125—147.
24. Forstner U. Sediment oxygen demand chemical substances / U.Forstner // Water Res. 1983. — Vol. 9. №17. — P. 1081—1093.
25. Тарновский А.А. Геохимия донных отложений современных озер / Тарновский. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1980. — 172 с.
26. Кузнецов С.И. Микрофлора озер и ее геохимическая деятельность — Л.: Наука, 1970. — 440 с.
27. Пряткова М.Я. Осадконакопление в малых водохранилищах / М.Я. Пряткова. — Л.: Наука, 1981. — 152с.
28. Кадошников В.М. О взаимодействии гуминовых кислот с каолинитами различной степени кристалличности / Кадошников В.М., Куковский Е.Г. / Укр. хим. журн., 1973. Т.39, №2. — С.168-171.
29. Лейбович П.З. Закономерности пространственного распределения растворенных форм железа и марганца в донных отложениях Байкал / П.З. Лейбович. — Лимнол. ин-т СО АН СССР. Листвиничное на Байкале. —1980. — 20 с.
30. Геоэкология черноморского шельфа Украины/ В.А. Емельянов, А.Ю. Митропольский, Е.И. Наседкин и др. — К.: Академпериодика, 2004. — 296 с.
31. Даувальтер В.А. Концентрации металлов в донных отложениях заиленных озер / В.А. Даувальтер // Водные ресурсы. — 1998. — Т.25, №3. — С. 358—365.
32. Осадчий Н.И. Химия и микробиология природных и сточных вод / Н.И. Осадчий. — М.: Мир, 1987. —285 с.
33. Нахимина Т.А., Белоконь А.В. Водная токсикология. — М.: Стройиздат, 1987. — 120 с.

34. Мур Дж. Тяжелые металлы в тяжелых водах / Дж. Мур. — М.: Мир, 1985. — 280 с.
35. Хрустав Ю.П., Ганичева Л.З., Волкова З.Н. Геохимия взвеси Азовского моря // Географические аспекты изучения гидрологии и гидрохимии Азовского бассейна. — Л.:Гидрометеоиздат,1981. — С.76—78.
36. Некоторые особенности осадконакопления в северо-западной части Черного моря/ Черноусов С.Я., Морозов В.М., Соловых И.А. и др. — К.: ИГН АН УССР, 1987. — 55 с.
37. Особенности геоэкологических исследований морских отложений // Геоэкология рекреационных зон Украины / Под ред. О.П. Кравчука — К.: Изд.-во Киев. ун-та, 1996. — С. 79—86.
38. Огляд результативності природоохоронної діяльності: Європейська економічна комісія. — Нью-Йорк, Женева: Комітет Екологічної Політики ООН, 2000. — 232с.
39. Ларченков Е.П., Чередниченко А.П. Влияние геологических процессов на экологическое состояние северо-западного шельфа Черного моря // Геоэкология рекреационных зон Украины. — К.: Изд.-во Киев. ун-та, 1996. — С. 71—78.
40. Митропольский А.Ю., Безбородов А.А., Овсянний И.И. Геохимия Черного моря. — К.: Наукова думка, 1982. — 144 с.
41. Некоторые особенности осадконакопления в северо-западной части Черного моря / С.Я. Черноусов, В.М. Морозов, И.А. Соловых и др. — К.: ИГН АН УССР, 1987. — 55 с.
42. Мур. Дж.В., Рамарутти С. Тяжелые металлы в природных водах / Пер. с англ. — М.: Мир, 1987. — 310 с.
43. Доброваольский В.В. География микроэлементов. Глобальное рассеяние. — М.: Мысль, 1983. — 271 с.
44. Никаноров А.М. Гидрохимия. — Л.: Гидрометиздат, 1989. — 351 с.
45. Хільчевський В.К. Роль агрохімічних засобів у формуванні якості вод басейну Дніпра. — К.: Вид-во Київ. Ун-та ,1996. — 222 с.

46. Геоэкология черноморского шельфа Украины [Текст]: научное издание/ В.А.Емельянов, А.Ю. Митропольский, Е.И. Наседкин и др. - К.: Академпериодика, 2004. — 296 с.
47. Добровольский В.В. Глобальные циклы миграции тяжелых металлов в биосфере // Тяжелые металлы в окружающей среде и охрана природы. — М.: Наука 1988. — С. 4—13.
48. Пилипенко Т.А. Влияние тяжелых металлов на лишайники [Текст] / Т.А. Пилипенко, В.И. Закутнова // Вестник Оренбургского государственного университета. — Оренбург. — 2004 г. — №12. — С. 112—116.
49. Безвербная И.П., Бузолева Л.С., Христофорова Н.К., Металлоустойчивые гетеротрофные бактерии в прибрежных акваториях Приморья. Биология моря, 2005 — т. 31, №2 — С.89—93.
50. Илялетдинов А.Н. Микробиологические превращения металлов, АН Казахской ССР, Институт микробиологии и вирусологии. — Алма-Ата: Наука, 1984. — 268 с.
51. Сенцова О.В., Максимова В.Н. Действие тяжелых металлов на микроорганизмы. //Успехи микробиологии, 1985. — С. 227—252.,
52. Работнова И.Л., Позмогова И.Н. Хемостатное культивирование и ингибирование роста микроорганизмов. — М.: Наука, 1979. — 207 с.
53. Рыльский, А.Ф. Действие тяжелых металлов на пигментсинтезирующие грамотрицательные бактерии / А.Ф. Рыльский // Вісник Донецького Національного Університету. Сер. А: Природничі науки, 2009, — вип. 2, — С. 260—264.
54. Wood J.M. Biological cycles for toxic elements in the environment / J.M. Wood // Science. 1974. —Vol.183. — P. 1049—1059.
55. Экология озера Большое Миассова. Под редакцией А.Г. Рогозина, В.А. Ткачева. — Миасс: ИГЗ Уро РАН, 2000. — 318 с.
56. Безвербная И.П., Бузолёва Л.С., Ковковдова Л.Т. Влияние тяжёлых металлов на некоторые физиологические свойства морских микроорганизмов // Оценка современного состояния микробиологических исследований в

восточно-сибирском районе. Мат. Росс. Научн.-практ. Конф. — Иркутск. — 2002. — С. 85—86.

57. Бузолева Л.С., Безвербная И.П., Христофорова Н.К. Металлоустойчивые гетеротрофные бактерии в прибрежных акваториях Приморья. Биология моря. — 2005. т. 31 №2, — С. 89—93.
58. Лавриненко И.А., Лавриненко О.В., Николаева Н.М., Уваров С.А. Особо охраняемые природные территории Ненецкого автономного округа. — Архангельск: Лоция, 2015. — 80 с.
59. Мархасин И.Л. Физико-химическая механика нефтяного пласта. — М.: «Недра», 1977 — 214с.
60. Нуманов И.У., Насыров И.М. Гетероатомные компоненты нефти Таджикской депрессии. — Душанбе: «Дониш», 1973 — 259 с.
61. Покровская С.В. Химия нефти и газа 1 часть. — Новополоцк: ИПК УО ПГУ, 2003 — 99 с.
62. Карцев А. А. Основы геохимии нефти и газа. — М.: Недра, 1969. — 272с.
63. Фукс Г.И. О течении жидкостей в узких зазорах между сближающимися плоскими телами. — «Доклады АН СССР», 1957, т. 113, — №3, с 635—638.
64. К изучению микроэлементов нефти Грузии Л.Д. Меликадзе, К. Г. Годердзишвили, Дж. И. Зульфугарлы. — Изд.: «МЕЦНИРЕБА» Тбилиси, 1976. — 98с.
65. Химия нефти. Руководство к лабораторным занятиям: Учеб. Пособие для вузов/ И. Н. Дияров, И.Ю.Батуева, А.Н. Садыков, Н.Л. Солодова. — Л.: Химия, 1990. — 240 с.
66. И. А. Немировская, Нефтяные углеводороды в океане // Природа. — 2008. — № 3. — С. 17—27.
67. Atlas R. M., Cerniglia C. E. Bioremediation of petroleum pollutants: diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation // BioScience. 1995. Vol. 45. — P. 332–338.

68. Fingas M. Oil spills and their cleanup // Chem. Ind. 1996. — Vol. 24. — P. 1005–1008.
69. Osuji L. C., Ozioma A. Environmental degradation of polluting aromatic and aliphatic hydrocarbons: a case study // Chem. Biodivers. 2007. — Vol. 4. — P. 424–430.
70. Van Hamme J. D., Singh A., Ward O. P. Recent Advances in Petroleum Microbiology // Microbiology and molecular biology reviews. 2003. — Vol. 67. No 4. — P. 503–549.
71. Prince R. C., Parkerton T. F., Lee C. The primary aerobic biodegradation of gasoline hydrocarbons // Environ. Sci. Technol. 2007. — Vol. 41. — N 9. — P. 3316–3321.
72. Frazer A. C., Coschigano P. W., Young L. Y. Toluene metabolism under anaerobic conditions: a review // Anaerobe. 1995. — Vol. 1. — P. 293—303.
73. Musat F., Widdel F. Anaerobic degradation of benzene by a marine sulfate-reducing enrichment culture, and cell hybridization of the dominant phylotype // Environ. Microbiol. 2008. — Vol. 10. N 1. — P. 10–19.
74. Burland S., Edwards E. Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction // Appl. Environ. Microbiol. 1999. — Vol. 65. — P. 529–533.
75. Takahata Y., Kasai Y., Hoaki T., Watanabe K. Rapid intrinsic biodegradation of benzene, toluene, and xylenes at the boundary of a gasoline-contaminated plume under natural attenuation // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. — Vol. 73. N 3. — P. 713–722.
76. Bossert I., Bartha R. The fate of petroleum in soil ecosystems. In R. M. Atlas (ed.), Petroleum microbiology. Macmillan Publishing Co., New York, 1984. — P. 434—476.
77. Berridge S. A., Dean R. A., Fallows R. G., Fish A. The properties of persistent oils at sea. In P. Hepple (ed.), Scientific aspects of pollution of the sea by oil. Institute of Petroleum, London, 1968. — P. 35–59.
78. Миронов О.Г. Взаимодействие морских организмов с нефтяными углеводородами. Л.: Гидрометеоиздат. 1985. — 127 с

79. Миронов О.Г., Щекатурина Т.Л. Углеводороды в морских организмах // Гидробиол. журн. 1976. — Т. 12, № 6. — С. 5—14
80. Копытов Ю.П., Миронов О.Г., Цуканова А.В. Влияние некоторых экофакторов на самоочищение морской воды от нефти // Водные ресурсы. 1982. — № 2. — С. 129—136.
81. Миронов О.Г., Кирюхина Л.Н., Алемов С.В., Санитарно-биологические аспекты экологии Севастопольской бухты в XX веке. Севастополь, 2003. — С.29—41.
82. Boszczyk-Maleszak H., Zabost A., Wolicka D., Kaciszczczenko J. Effectiveness of biodegradation of petroleum products by mixed bacterial populations in liquid medium at different pH values // Pol. J. Microbiol. 2006. — Vol. 55. — N 1. — P. 69—73.
83. Atlas R. M., Bartha R. Biodegradation of petroleum in seawater at low temperatures // Can. J. Microbial. 1972. — Vol. 18. — P. 1851—1855.
84. Margesin R. Alpine microorganisms: useful tools for low-temperature bioremediation // J. Microbiol. 2007. — Vol. 45. N 4. — P. 281—285.
85. Bossert I., Bartha R. The fate of petroleum in soil ecosystems. In R. M. Atlas (ed.), Petroleum microbiology. Macmillan Publishing Co., New York, 1984. — P. 434—476.
86. Klug M. J., Markovetz A. J. Thermophilic bacteria isolated on n-tetradecane // Nature. 1967. — Vol. 215. — P. 1082—1083.
87. Atlas R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective // Microbiol. Rev. 1981. — Vol. 45. — P. 180—209.
88. Cooney J. J. The fate of petroleum pollutants in freshwater ecosystems. In R. M. Atlas (ed.), Petroleum microbiology. Macmillan Publishing Co., New York, 1984. — P. 399—434.
89. Jobson A., McLaughlin M., Cook F. D., Westlake D. W. S. Effect of amendments on the microbial utilization of oil applied to soil // Appl. Microbiol. 1974. — Vol. 27. — P. 166—171.

90. Van Hamme J. D., Singh A., Ward O. P. Recent Advances in Petroleum Microbiology // Microbiology and molecular biology reviews. 2003. — Vol. 67. No 4. — P. 503—549.
91. Г.С. Фомин., А.Г. Фомин, Почва. Контроль качества и экологической безопасности по международным стандартам. — Москва, Изд-во «Протектор»,2001. — 304с.
92. Виноградова Н. Н. Донные отложения Сенежского водохранилища и их влияние на его экологическое состояние // Водные ресурсы. — 2001 — 28, № 1 — С. 82 — 87.
93. Павлова Е. В., Овсяный Е. И., Гордина А. Д. Современное состояние и тенденции изменения экосистемы Севастопольской бухты / Акватория и берега Севастополя: экосистемные процессы и услуги обществу. — Севастополь: Аквавита, 1999. — С. 94.
94. Миронов О.Г., Кирюхина Л.Н., Алемов С.В. Санитарно-биологические аспекты экологии Севастопольской бухты в XX веке. — Севастополь 2003. — С.29—41.
95. Кузяхметов Г.Г., Миахахова А.М., Киреева Н.А., Новоселова Е.И. Практикум по почвоведению // Учебное пособие. — Уфа: РИО БашГУ, 2004. — С. 120.
96. Химия почв: органическое вещество почв : учеб.-метод. пособие / Н. А. Мартынова. — Иркутск : Изд-во ИГУ, 2011. — 255 с.
97. Миронов О. Г., Кирюхина Л. Н., Дивавин И. А. Санитарно-биологические исследования в Чёрном море — С-Пб: Гидрометеоиздат. — 1992. — 115 с.
98. Meyers P.A., Quinn J.G., Assotiation of hydrocarbons and minerals particles in saline solution / Nature, 1973. — 244, № 5410. — Р. 87 — 94
99. Соботович Э.В., Задвернюк Г.П, Кадошников В.М., Злобенко Б.П., Писанская И.Р., Федоренко Ю.Г. Природа взаимодействие бентонита с полярными и неполярными органическими веществами // Мин. журнал, №4 — 2008 — С.32—41

100. Кульчицкий Л.И., Усьяров О.Г., Физико-химические основы формирования свойств глинистых пород. — М.: Недра, 1981. — 178с.
101. Кадошников В.М., Задвернюк В.П., Злобенко Б.П., Спасова Л.В., Писанская И.Р. Природні дисперсні силікати – матеріал для руйнування плівок нафтопродуктів на поверхні води / Т.2 V Міжнародна науково-практична конференція. Екологічна безпека: Проблеми і шляхи її вирішення. (м. Алушта, АР Крим, Україна, 7-11 вересня 2009 р.) — С.255—258.
102. Овсяный Е. И., Романов А. С., Игнатьева О. Г. Распределение тяжелых металлов в поверхностном слое донных осадков Севастопольской бухты (Черное море). Морской гидрофизический институт НАНУ. — Севастополь, Украина, Морской экологический журнал, 2003. — Т. II. — С.88—93.
103. Химия океана. Т. 2. Геохимия донных осадков / Отв. ред. И.И. Волков. М.: Наука, 1979. — 536 с.
104. Кадошников В.М., Горлицкий Б.А., Шкапенко В.В., Писанская И.Р., Смирнова Ю.Д. Тяжелые металлы в донных отложениях севастопольской бухты / Мінерал. журн. — 2011. — 33, №4. — С. 73—80.
105. Розанов А.Г. Марганец и другие окислители органического вещества донных отложений Белого моря. // Материалы XVIII Международной научной конференции по морской геологии (Москва, 16–20 ноября 2009 г.). — Том IV. — М: ГЕОС, 2009. — С. 139.
106. Родина А.Г. Методы водной микробиологии. — М.: Наука, 1965. — с.197
107. Кириленко Т.С. Атлас родов почвенных грибов. — Киев:, Наукова думка, 1977. — 248 с.
108. Пидопличко Н.М. Пенициллины. — Киев: Наукова думка, 1972. — 152с.
109. Natanabe T. Pictoral atlas of soil and seed fungi. Morphologies and cultured fungi and species – Florigia, 2000. — 411p.

110. Зеленько Ю.В., Плахотник В.Н. Кинетика миграции дизельного топлива через грунты во время технологических проливов и транспортных аварий // Вісник ДНУЗТ . — Дніпропетровськ, 2004. - Вип. 3. — С. 30—33.
111. Огняник Н.С., Парамонова Н.К., Брикс А.Л. Эколо-гидрологический мониторинг территории загрязнения геологической среды легкими нефтепродуктами. — К:LAT&K. — 2013. — 254с.
112. Огняник Н.С., Парамонова Н.К., Брикс А.Л., Пашковский И.С., Коннов Д.В. Основы изучения загрязнения геологической среды легкими нефтепродуктами. — К.:[А.П.Н.], 2006. — 278 с. ил.- Тит. л., аннот. парал. англ.
113. Пиковский Ю.И., Солнцева Н.П. Геохимическая трансформация дерново-подзолистых почв под влиянием потока нефти // Техногенный поток веществ в ландшафтах и состояние экосистем. — М., 1981.
114. Кириленко Т.С. Атлас родов почвенных грибов. — Киев: Наукова думка, 1977. — 248 с.
115. Почвоведение. В 2-х частях/ Г.ДБелицина, В.Д.Василевская, Л.А.Гришина и др. М.: Высш. школа, 1988.-Т.1. 400с. Пидопличко Н.М. Пенициллины. — Киев: Наукова думка, 1972. — 152с.
116. Мименко А.К. Регулирование биологической активности дерново-подзолистых почв// автореф.дисс.док. биол. наук – Москва, ТХСА, 1991—41с.
117. Коваль Э.Е. Микодеструкторы промышленных материалов – Киев, Наукова думка, 1989. — 192с.
118. Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. Под ред. М.А. Глазковской // Москва, — 1983. — 350 с.
119. Стригалева И.В., Шманова Н.И. , Шакс И.А. и др. Преобразование нефти микроорганизмами / Труды ВНИГРИ, М.,1970. — вып. 281, — с. 1—286.

120. Feist C.F., Hegeman G.D. Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida* of tangential pathways // Journal of Bacteriology. — 1969. — Vol. 100. — P. 869—877.
121. Успехи микробиологии под редакцией Имшеницкого. А.А. — М.: «Наука», 1968. — Т. 5. — 165 с.
122. Лысак В.В. Микробиология. — Минск: БГУ, 2007. — 426 с.
123. Федоренко Ю.Г. Рентгеновское изучение особенностей тонкой структуры природных и модифицированных каолинов/ Федоренко Ю.Г., Куковский Е.Г., Кадошников и др. // Кристаллохимия и структурные особенности минералов. Л. «Наука», 1976, С 71—75.
124. Звягинцев Д.И. Взаимодействие микроорганизмов с твердыми поверхностями. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1973.
125. Гвоздев В.Д., Ксенофонтов Б.С. Очистка сточных вод и утилизация осадков. — М.: Химия, 1998. — 112 с ил.
126. Глоба Л.И./Химия и технология воды. — 1985. — Т.7, № 1. С. 73—78.
127. Глоба Л.И., Никовская Г.Н. // Химия и технология воды. — 1985. — Т.7, № 2. — С. 70—72.
128. Ротмистров М.Н., Гвоздяк П.И., Ставская С.С. Микробиология очистки воды. — Киев: Наукова думка, 1978. — 268 с.
129. Илларионов С.А. Трансформация углеводородов нефти в почвах гумидной зоны. Автореф. дисс. д-ра биол. наук. — Сыктывкар. ИБ КНЦ УрО РАН. 2006. — 29 с.
130. Паничева Л.П., Моисеенко Т.И., Кремлева Т.И., Волкова С.С. Биохимическая трансформация нефтяных углеводородов в водах Западной Сибири // Вестник Тюменского государственного университета. — 2012. — №12. — С. 38-48.
131. Браунштейн А.Е. На путях к познанию реакций и ферментов переноса амино-групп: Доклад на пленарном заседании III Всесоюзного биохимического съезда. — М.: 1974. — 37 с.

132. Писарчук А.Д. Эффективность применения углеводородокисляющих бактерий *Pseudomonas putida* и сорбента на основе модифицированного вермикомпоста для детоксикации нефтезагрязненной почвы / А.Д. Писарчук, Н.Н. Терещенко, С.В. Лушников // Вестник Томского государственного университета. Биология. — 2011. — № 3 (15). — С. 180—182.
133. Патент RU 2173578 від 20.09.2001.
134. Патент RU 2191066 від 20.10.2002.
135. Патент США 4154684 від 14.11.2010.
136. Патент RU 2268934 від 27.01.2006.
137. Патент RU 2312891 від 20.12.2007.
138. ТУ У 37.2-30171732-001:2008.
139. Миронов О.Г., «Нефтеокисляющие организмы в море». — Киев: Наукова думка, 1971, — 233 с.
140. Кадошников В.М., Шехунова С.Б., Задвернюк Г.П., Маничев В.И «Аутигенные минералы бентонитовой глины Черкасского месторождения» // Минерал. журн.— 2013. — 35, №3 — С.54—60.

**Приложение 1**

