

ЩЕМЕЛИНИНА ТАТЬЯНА НИКОЛАЕВНА
БИОТЕХНОЛОГИИ РЕМЕДИАЦИИ И КОНВЕРСИИ УГЛЕВОДОРОДОВ

Специальность 1.5.6. Биотехнология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федеральном исследовательском центре «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук» Институте биологии Коми НЦ УрО РАН (ФИЦ Коми НЦ УрО РАН)

Официальные оппоненты:

Муратова Анна Юрьевна, доктор биологических наук, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, лаборатория экологической биотехнологии, заведующая лабораторией, г. Саратов;

Селивановская Светлана Юрьевна, доктор биологических наук, профессор, Институт экологии и природопользования – обособленное структурное подразделение федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, директор, г. Казань;

Куюкина Мария Станиславовна, доктор биологических наук, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук - обособленное структурное подразделение федерального государственного бюджетного учреждения науки «Пермский Федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, лаборатория алканотрофных микроорганизмов, ведущий научный сотрудник, г. Пермь.

Ведущая организация: Уфимский институт биологии – Обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Уфа

Защита состоится «22» декабря 2023 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская область, 142279, ФБУН ГНЦ ПМБ

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по защите прав потребителей и благополучию человека Российской Федерации по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская область, 142279, ФБУН ГНЦ ПМБ

Автореферат разослан « » _____ 2023 г.
Ученый секретарь
диссертационного совета 64.1.002.01
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Для Арктической зоны и Крайнего Севера характерны экстремальные природные условия. Суровость климата и безлесье создают особые гидротермические и физико-химические режимы в почвах, вызывают криогенные процессы пучения и вымерзания, создающие специфику тундрового почвообразования и тундрового ландшафта в целом (Атлас почв..., 2010). Период активного почвообразовательного процесса равен 2,5–3 месяцам. Особенностью тундровых почв является их малая мощность. Содержание перегноя составляет 1–8 %. Почвенный раствор беден минеральными соединениями (Арчегова, Забоева, 1974; Забоева, 1975). Почвы Крайнего Севера имеют ясную выраженность микробного профиля, прижатость активно протекающих микробиологических и биохимических процессов к самой поверхности почвы (Стенина, 1964). Поэтому общая годовая продукция бактериальной биомассы довольно низкая (Yoshitake et al., 2018). Такое структурное строение биогеоценотической системы обуславливает очень медленное ее возобновление и высокую чувствительность к малейшему техногенному воздействию (Василевская, 1997; Капелькина и др., 1997). Кроме того, высокая обводненность почв Севера определяет высокую контрастность накопления поллютантов в почвенном пространстве. Таким образом, биогеоценозы Крайнего Севера, с одной стороны, обладают крайней уязвимостью к любому рода техногенным нарушениям, низким самовосстановительным потенциалом, слабой естественной микробиологической активностью, с другой стороны – именно на Севере сосредоточены основные месторождения углеводородного сырья, которые будут еще длительное время иметь важное значение в топливно-энергетическом комплексе и в экономике России. Ежегодная добыча нефти в России предполагает и ее ежегодные потери – от 1,5 % до 10 % (10–23 млн т. за год) и, следовательно, катастрофическое загрязнение окружающей среды (Петровский и др., 2018; Лаптева и др., 2019; Имполитов, 2020; Юшков, Подобедова, 2021; Little et al., 2021) и представляет серьезную опасность для биологического разнообразия водных (Коршунова, 2019; Воробьев и др., 2020; Акимова и др. 2022; Carroll et al., 2018; King et al., 2021), почвенных экосистем (Акимова и др., 2022; Al-Hawash et al., 2018; Shaoping et al., 2021; Khatoon et al., 2021) и для здоровья человека (Yang et al., 2021; Kumar et al., 2021; Zhang et al., 2022). Это значит, что проблемы очищения почв от углеводородных загрязнений и последующего восстановления природного равновесия экосистем севера останутся актуальными на протяжении еще десятков лет.

Нефтяной поллютант, в зависимости от его токсичности и концентрации изменяет микробиологическую активность почв, снижая биоразнообразие и

увеличивая численность углеводородоокисляющих микроорганизмов.

В ответ на присутствие в среде специфического субстрата или метаболита микроорганизмы вырабатывают соответствующие ферменты, что необходимо клетке для подготовки и усвоения труднодоступных источников питания, в том числе углеводов нефти (Tindall et al., 2008). Поэтому изменение ферментативной активности почвы может служить индикатором ее экологического состояния (Хазиев, 2019; Tao et al., 2020; Garousin et al., 2021; Cabral et al., 2022). Долгосрочный мониторинг ферментативной активности криогенных нефтезагрязненных почв позволяет выявить закономерности изменения ферментативной активности – индикатора направленности процессов восстановления в условиях Крайнего Севера.

Скорость самоочищения почв от нефти зависит от почвенно-климатических условий (Хазиев, 2012; Мелехина и др., 2015; Sun et al., 2015). В неблагоприятных условиях естественная деструкция углеводов с помощью почвенной микробиоты может растянуться во времени, нанося урон окружающей среде (Маганов и др., 2006). Экономически и экологически оптимальными технологиями ремедиации нефтезагрязненных почвенных и водных объектов, утилизации нефтяных отходов на Крайнем Севере являются биотехнологии с применением психротолерантных микроорганизмов-нефтедеструкторов в свободной (Филонов, 2016; Коршунова, 2019; Bogatyrenko et al., 2022; Saravanan et al., 2023) и иммобилизованной форме (Tarabukin et al., 2017; Liu et al., 2023). Принципиально новым подходом переработки нефтеотходов с извлечением материального и энергетического потенциала следует считать получение биотоплива путем биоконверсии (Shchemelinina et al., 2022). Поэтому актуальны задачи поиска психротолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов и исследования свойств их консорциумов в свободной и иммобилизованной форме, а также создания технологий их применения для ускорения очистки окружающей среды от углеводов на Крайнем Севере. В связи с этим приоритетное значение имеет изучение ферментативной активности криогенных нефтезагрязненных почв и выявление автохтонных микроорганизмов в качестве основы биопрепаратов полифункционального действия, способных к трансформации и биоконверсии углеводов в целевые продукты.

Цель исследования – формирование теоретической и практической базы для создания биопродуктов на основе углеводородоокисляющих микроорганизмов, технологий их производства и применения в ремедиации нефтезагрязненных объектов и биоконверсии нефтесодержащих отходов.

Задачи исследования

1. Исследовать ферментативную активность нефтезагрязненных и восстанавливающихся почв Крайнего Севера в качестве индикатора процессов восстановления и потенциального источника микроорганизмов для получения высокоэффективных биологических продуктов.
2. Выделить из нефтезагрязненных криогенных почв с высокой ферментативной активностью углеводородокисляющие микроорганизмы, обладающие потенциалом для использования в экобиотехнологии. Идентифицировать выделенные микроорганизмы. Определить их биохимические, фенотипические, хемотаксономические свойства.
3. Изучить эффективность очистки от нефти и нефтепродуктов водных и почвенных объектов с помощью селектированных микроорганизмов-нефтедеструкторов.
4. Сконструировать нетоксичный симбиотический альго-бактериально-дрожжевой консорциум, предназначенный для биоконверсии нефтепродуктов.
5. Установить возможность иммобилизации клеток альго-бактериально-дрожжевого консорциума на различных носителях.
6. Проверить эффективность использования консорциума в свободной и иммобилизованной форме для биотехнологий в производственных экспериментах.
7. Разработать и утвердить в соответствии с действующим законодательством нормативно-техническую документацию на производство и технологию применения биопрепарата и биогеосорбента.

Научная новизна и теоретическая значимость. Впервые в результате 20-летних исследований нефтезагрязненных криогенных почв выявлена динамика ферментативной активности и доказана возможность ее использования в качестве индикатора направленности процессов восстановления в условиях Крайнего Севера. Разработана локальная модель, характеризующая связь ферментативной активности криогенных почв с содержанием в них нефтепродуктов. Разработаны алгоритмы моделирования биологических продуктов для использования в экобиотехнологической сфере, основанные на взаимосвязи между ферментами (каталазой, дегидрогеназой, уреазой), содержанием нефтепродуктов и метаболическим потенциалом выделенных микроорганизмов почв старых нефтеразливов.

Сконструирован новый нефтеокисляющий консорциум, состоящий из штамма водорослей *Chlorella vulgaris* IPPAS C-2024, а также выделенных из нефтезагрязненных почв и идентифицированных в ходе настоящего исследования штаммов бактерий *Pseudomonas yamanorum* ВКМ В-3033D и дрожжей *Rhodotorula*

glutinis VKM Y-2998D. Доказана эффективность использования консорциума как в свободной, так и в иммобилизованной форме для очистки почв, грунтов, щебеночного балласта, водной поверхности и производственных сточных вод от нефтяного загрязнения, обезвреживания нефтеотходов. Впервые показано, что консорциум микроорганизмов способен к биоконверсии нефтесодержащих отходов во вторичный продукт – биодизель.

Новизна исследований подтверждена 9 патентами РФ на изобретение: на питательную среду Люка для культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris* (№ 2556126), на штаммы консорциума (№ 2615458, № 2658134, № 2703499), на способ культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris* IPPAS C-2024 в природных условиях с использованием воды из пруда (№ 2774314), на нефтеокисляющий биопрепарат, биосорбент на его основе и способ его приготовления (№ 2703500), на средство для биодеструкции нефтепродуктов в загрязненных почвах (№ 2707815), на способ очистки отходов щебневого балласта, применяемого на железной дороге (№ 2711162), на способ очистки почв от нефтяных загрязнений методом гидропосева биосмеси с применением микроводорослей *Chlorella vulgaris* IPPAS C-2024 (№ 2764305).

Результаты, полученные в процессе идентификации бактерий, дрожжей способствуют установлению видовой принадлежности других микроорганизмов за счет расширения баз данных по нуклеотидным последовательностям генов, кодирующих 16S рРНК, а также имеют большое значение для фундаментальных исследований в различных областях науки (экология, генетика и эволюция микроорганизмов и пр.).

Результаты исследованных биохимических процессов в почве и биогеосорбентах расширят познания в области почвенной энзимологии.

В целом, результаты работы создают теоретическую и практическую базу для управления микробиологическими сообществами и создания биокаталитических систем глубокой переработки промышленных отходов и получения продуктов с высокой добавленной стоимостью.

Материалы диссертации используются при чтении лекций по дисциплине «Основы биотехнологии» в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени С.М. Кирова» (филиал Сыктывкарский лесной институт) по направлению «Химическая технология».

Практическая значимость. Разработанные в процессе исследований биопродукты и технологии их получения и использования имеют прикладное

значение для решения экологических и энергетических задач. Выделенные штаммы микроорганизмов-нефтедеструкторов в свободной (биопрепарат «БИОТРИН») и иммобилизованной (биогеосорбент «ГЕОЛЕКС®») форме предназначены для очистки нефтезагрязненных объектов окружающей среды, обезвреживания жидких нефтесодержащих отходов. Разработанная технология внедрена в производство на базе общества с ограниченной ответственностью «БИОЭКОБАЛАНС» (г. Сыктывкар). Технология применения биогеосорбента успешно апробирована в тестовом и промышленном масштабе для ликвидации последствий нефтяных разливов в Ханты-Мансийском автономном округе, Ямало-Ненецком автономном округе и Республике Коми.

Штаммы *Pseudomonas yamanorum*, *Rhodotorula glutinis* депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, штамм микроводорослей *Chlorella vulgaris* депонирован в коллекции культур микроводорослей (IPPAS) (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН).

Методология и методы исследования. Предмет исследования – штаммы микроорганизмов *Pseudomonas yamanorum* ВКМ В-3033D, *Rhodotorula glutinis* ВКМ Y-2998D, *Chlorella vulgaris* IPPAS С-2024 и их консорциум, глауконитовая порода с иммобилизованными клетками микроорганизмов. Основными объектами исследования явились загрязненные нефтью и нефтепродуктами (НП) почва, вода, щебеночный балласт. Теоретической базой работы явились исследования российских и зарубежных ученых.

Положения, выносимые на защиту

1. Ферментативная активность нефтезагрязненных криогенных почв и нефтяных отходов выступает в качестве индикатора процессов восстановления почв и источника микроорганизмов для получения высокоэффективных биологических продуктов.
2. Штаммы микроорганизмов (*Pseudomonas yamanorum* ВКМ В-3033D, *Rhodotorula glutinis* ВКМ Y-2998D), выделенные из персистентно загрязненных субстратов, обладают высокой нефтеокисляющей способностью, нетоксичны. Сконструирован консорциум, состоящий из бактерий *Pseudomonas yamanorum* ВКМ В-3033D, дрожжей *Rhodotorula glutinis* ВКМ Y-2998D и фотосинтезирующих организмов – микроводорослей *Chlorella vulgaris* IPPAS С-2024, усиливающий биотехнологические свойства.
3. Иммобилизация клеток консорциума на носитель – глауконитовый минерал способствует сохранению жизнеспособности и высокой активности клеток микроорганизмов.

4. Нетоксичный симбиотический альго-бактериально-дрожжевой консорциум в свободной и иммобилизованной форме предназначен для биоремедиации нефтезагрязненных объектов и биоконверсии нефтяных отходов в биодизель.

5. Разработана технология производства и применения жидкой и сухой формы биопрепарата «БИОТРИН» и биогеосорбента «ГЕОЛЕКС®» для очистки нефтезагрязненных объектов промышленной рекультивации.

Личный вклад автора заключается в формулировании цели и задач исследования, решении поставленных задач, планировании и выполнении экспериментов, обобщении и анализе результатов, их сравнение с имеющимися мировыми аналогами, практическое внедрение результатов, формулирование положений диссертационной работы, подготовке и регистрации технических условий биопродуктов. Результаты диссертационной работы получены автором в процессе двадцатилетних научных исследований, проведенных лично или совместно с коллегами ФИЦ Коми НЦ УрО РАН в качестве ответственного исполнителя. Сотрудники, принимавшие непосредственное участие в исследованиях, работающие в ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН к.б.н. М. Ю. Маркарова, к.б.н. Е. Н. Патова, к.б.н. И. В. Новаковская, Е. М. Анчугова, работающие в ИГ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН д.г-м.н., профессор О. Б. Котова, к.г-м.н. Д. А. Шушков.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 44 научные работы, в том числе 15 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, получено 9 патентов на изобретение.

Объем и структура диссертации. Объем диссертации составляет 437 стр. текста с 17 рисунками, 99 таблицами. Диссертационная работа состоит из введения, 8 глав, заключения, списка используемой литературы, включающего 826 наименований, в том числе 422 иностранных источников, 26 Приложений.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научным сотрудникам Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук – старшему научному сотруднику лаборатории биохимии и биотехнологии, к.б.н., М. Ю. Маркаровой за неоценимую поддержку, постоянное содействие и научно-методическую помощь, младшему научному сотруднику лаборатории биохимии и биотехнологии Е. М. Анчуговой за участие в проведении полевых испытаний и обработке полученных данных, научному сотруднику лаборатории биохимии и биотехнологии К. Г. Уфимцеву за методическую помощь; ведущему научному сотруднику лаборатории экологической физиологии растений, д.б.н., проф. Т. К. Головки за научную консультацию, заместителю директора по научной работе, к.х.н. Б. М. Кондратенку за научную консультацию, ведущему

научному сотруднику отдела флоры и растительности Севера к.б.н., Е. Н. Патовой за научную консультацию и предоставление штаммов микроводорослей, научному сотруднику отдела флоры и растительности Севера к.б.н., И. В. Новаковской за выделение и культивирование штаммов микроводорослей, сотрудникам Института геологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, д. г.-м. н., проф. О. Б. Котовой за научную консультацию; к. г.-м. н., Д. А. Шушкову за предоставление материалов для исследований; коллективу экоаналитической лаборатории за бесценную помощь в проведении количественного химического анализа исследуемых образцов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы (**Глава 1**) рассмотрено воздействие нефти, нефтепродуктов (НП) и отходов нефтяной промышленности на водную и почвенную среды, приведены технологии очистки воды, рекультивации почв с применением сорбентов и микробиологических препаратов, а также обсуждены методы утилизации нефтяных отходов.

В Главе 2 описаны модельные и опытно-промышленные эксперименты, представлены используемые в работе методы исследований: микробиологические, биохимические, хемотоксаномические, методы биотестирования.

Анализ физико-химических характеристик почвы, воды проводили в аккредитованной экоаналитической лаборатории Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук согласно методикам измерений ПНД Ф 14.1:2:4.128; ПНД Ф 14.1:2.116; ПНД Ф 16.1:2.2:2.3:3.62-09; № 88-17641-005-2017; 88-17641-001-2018; 88-17641-004-2018; 88-17641-005-2018; 88-17641-008-2018; 88-17641-002-2019; ГОСТ 54650-2011, ГОСТ 26426-85, ГОСТ 26212-91, методами потенциометрии, фотометрии, турбидиметрии, флуориметрии, газовой хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, газовой хроматографией-масс-спектрометрией, атомно-эмиссионной спектрометрией с индуктивно связанной плазмой.

Хемотоксаномические методы выполнены в рамках договорных работ в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук.

Токсикологическую оценку микроорганизмов, входящих в состав биопрепарата проводили в рамках договорных работ с «НИЦ Токсикологии гигиенической регламентации биопрепаратов» – филиале ФГБУ «ГНЦ «Институт

иммунологии» Федерального медико-биологического агентства.

Статистические методы. Обработку данных осуществляли с применением пакета прикладных программ Statistica 10.0. При статистической обработке данных использовали t-критерий Стьюдента и расчет доверительных интервалов средних арифметических значений, регрессионный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Глава 3 посвящена оценке ферментативной активности (ФА) объектов исследований, как индикатора качества почв, содержащих микроорганизмы для создания высокоэффективных биологических продуктов. Точные знания территориально-климатических условий, биологической активности и продуктивности нефтезагрязненных почвенных и водных объектов необходимы как для оценки временных и пространственных сукцессионных процессов, так и для разработки эффективных биопрепаратов, биосорбентов и других биопродуктов, используемых в качестве биоремедиантов, технологий их использования. Биохимическая активность – важнейший показатель окислительно-восстановительных и гидролитических ферментов, определяющий максимальный доступ минерального питания растений, способности почвы к ответной реакции на токсиканты. Способность диагностировать большое количество различных процессов, происходящие в почве, как плодородной и окультуренной, так и загрязненной можно по ферментативной активности (Хазиев, 2005). Оценка фоновых почв Крайнего севера на примере Усинского района по данным ФА, полученным за двадцатилетний период наблюдений показала, что степень обогащенности почвенными ферментами (каталазой, дегидрогеназой, уреазой и фосфатазой) по шкале Звягинцева (1977) *очень бедная*, степень обогащенности инвертазой – *бедная*. В вегетационный период происходит рост ФА и степень обогащенности почв каталазой, уреазой повышается до уровня *средней*. Степень обогащенности почв дегидрогеназой – *очень богатая* (Щемелинина и др., 2007, Щемелинина, 2008; Киреева и др., 2008; Мелехина и др., 2015, 2016; Anchugova et al., 2016).

Зависимость ферментативной активности почв от содержания нефтепродуктов в криоморфной почве

Согласно теории индуцированного синтеза ферментов, в ответ на присутствие в среде специфического субстрата или метаболита, в нашем случае нефти или нефтепродуктов (НП) микроорганизмы и растения вырабатывают соответствующие

ферменты (Фёршт, 1980). При загрязнении поллютантом повышается биологическая активность почвы в результате увеличения ферментного пула внеклеточных и внутриклеточных ферментов и происходит возврат нарушенной системы в состояние гомеостаза (Kozlova et al., 2015; Yang et al., 2020; Zamulina et al., 2021).

В результате 20-летних исследований нефтезагрязненных почв Усинского района Республики Коми был накоплен массив данных о каталазной, дегидрогеназной, уреазной, фосфатазной, протеазной, липазной, инвертазной сульфит- и сульфатредуктазной, нитратредуктазной активности. Применение метода множественного регрессионного анализа позволило рассмотреть зависимость содержания нефтепродуктов от комплекса показателей ферментативной активности в качестве предикторов. Путем последовательного исключения из анализа показателей ферментативной активности, для которых уровень значимости превышал $p = 0,05$, была предложена локальная прогностическая модель для оценки состояния нефтезагрязненных почв Усинского района Республики Коми:

$$\text{НП} = 406,629 - 75,693 \times \text{Cat} - 12,783 \times \text{Deh} - 2,246 \times \text{Ure},$$

где НП – содержание нефтепродуктов, мг/г;

Cat – каталазная активность, мл /1 г;

Deh – дегидрогеназная активность, мг / 1 г;

Ure – уреазная активность, мг /10 г;

Коэффициент детерминации $R^2 = 0,944$.

Динамика ферментативной активности и содержание остаточных нефтепродуктов в почве

ФА отражает интенсивность процессов очищения почвы от нефти. На протяжении долгосрочного мониторинга криогенных почв, как нефтезагрязненных самовосстанавливающихся, так и в процессе восстановления с помощью проведенной биоремедиации, были выявлены наиболее показательные ферменты-индикаторы: каталаза, дегидрогеназа и уреазы, данные которых за 20 лет наблюдения свели в комплексный показатель – средний геометрический. Участниками эксперимента были апробированы собственные технологии с применением методов биоаугментации и биостимуляции (таблица 1) на Пермокарбонском месторождении Усинского района. Почвы участка торфяно-глеевые, $pH_{\text{сол}} 4,2-4,8$. Почвы криоморфные, образуются в условиях влияния вечной и многолетней мерзлоты, находятся в мерзлом состоянии 7-7,5 месяцев. Содержание нефти в почве составляло 87-468 мг/г. Участок перед закладкой опыта очищали от поверхностного слоя нефти, фрезеровали по промерзшей почве в марте-апреле на глубину 25-30 см. Избыток воды и высачивающуюся из

торфяного слоя нефть отводили с помощью дренажных канав. Испытание было начато в июне 2002 г. Обработку препаратами проводили дважды за сезон.

Влияние примененных методов биостимуляции (Агрохимические методы) и биоаугментации («Петролан», «Иниполь», «Омуг», «Универсал», «Деконтам», «Родер») на деградацию НП почвы оценивали по значениям ферментативной активности (GMea) и содержанию НП.

Таблица 1 – Описание, вносимых в почву эксперимента препаратов

Название препарата	Сокращение	Организация	Технология	Титр клеток,
НЗП	НЗП		Нефтезагрязненная почва	
Агрохимические методы	А	ФГУП НИПИИ «Комимелиовод хозпроект» (Сыктывкар)	Минеральное удобрение, доломитовая мука	–
«Петролан»	П	НТО Приборсервис» (Томск)	Коммерческая тайна	1,6×10 ⁸ КОЕ/мл
«Иниполь ЕАР 22»	И	Французская компания «Тоталь»	Коммерческая тайна	–
«Универсал»	У	Институт биологии Коми НЦ УрО РАН (Сыктывкар)	<i>Variovorax paradoxus</i> , <i>Kurthia sibirica</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Rhodococcus equi</i>	5,7×10 ⁸ КОЕ/мл
«Универсал» на лигносорбенте и БАГ	УЛБ		У на лигносорбенте (воздушно-сухой лигнин) + биологически-активный гранулированный удобрительно-посевной материал (БАГ) на основе компоста, минеральных удобрений и семян многолетних трав	10 ⁸ КОЕ/мл
«Омуг-15»	О	НТЦ «НИКА» (Санкт-Петербург)	<i>Clavibacter michiganense</i> , <i>Bacillus amylo lignefaciens</i> , <i>Micrococcus varians</i> , выращенная на подстилочном птичьим помете	10 ¹² КОЕ/г
«Деконтам-3»	Д	Чешская фирма «Деконта»	Коммерческая тайна	10 ⁸ – 10 ¹⁰ КОЕ/мл
«Родер»	Р	МГУ (Москва)	<i>Rhodococcus ruber</i> Ac-1513 D и <i>Rhodococcus erythropolis</i> Ac-1514 D	10 ¹¹ – 10 ¹² КОЕ/мл

Дегидрогеназа – фермент, катализирующий реакции отщепления водорода и выполняющий роль промежуточных переносчиков водорода (Хазиев 2005; Zhang et al., 2010) принимает непосредственное участие в деградации углеводов.

Окисление углеводов в микроорганизмах приводит к огромному

количеству пероксида водорода – побочному продукту, повреждающему клетки. Фермент каталаза способствует разложению этого побочного продукта осуществляется с помощью фермента – каталазы (Хазиев, 2005).

Уреаза преобразует органический азот в аммонийный азот, катализируя гидролиз амидосвязи в органическом веществе, тем самым улучшая азотное питание почвы (Wu et al., 2013).

В почве нерекультивированной площадки **НЗП** ферментативная активность в первые годы исследований была подавлена, к 5 году произошло ее увеличение (таблица 2).

В условиях биоаугментации (**У, УЛЬ, Д, Р**) в течение 3-4 лет от начала эксперимента происходило повышение среднего геометрического **ФА** в почве площадок, что было вызвано усиленной микробной деградацией углеводов. Далее происходило снижение активности. В период с 14 по 20 годы исследований произошло активное зарастание участков аборигенными травами, кустарниками и деревьями. Ферментный пул почвы был пополнен за счет ферментов прикорневых микроорганизмов.

Метод биостимуляции (**А**) также активировал биологические процессы (таблица 2).

Химическое, фото- и биоокисление являются составляющими деградации нефти в почве (Truskewycz et al., 2019). Ключевую роль при рекультивации могут сыграть как отдельные, так и совместные процессы диспергирования, испарения, растворения, сорбции, автоокисления, катаболизма углеводов растениями и микробами. Однако, среди множества методов восстановления биоремедиация была признана экономически эффективной технологией очистки (Wu et al., 2016).

Метод **биостимуляция** (**А**) предполагал добавление питательных веществ в почву во избежание метаболических ограничений микроорганизмов (Kaczuńska, et al., 2015; Wu et al., 2016) и был направлен на стимулирование углеводородокисляющей способности местного микробного сообщества, адаптированного к конкретной почвенной среде. Высокое содержание **НП** в почве подавляло жизнедеятельность микроорганизмов и метод **А** был малоэффективным в очистке. Снижение содержания **НП** к концу эксперимента составило 35 %.

Метод **биоаугментации** показал, что использование для деградации микроорганизмов эффективно, особенно, в первые, 2-5 лет исследований. Скорость деградации снизилась после пятого года, предположительно потому, что большинство из доступных углеводов были удалены, и присутствовали соединения с более высокой молекулярной массой (Riveroll-Larios et al., 2015), подавляющие

микроорганизмы почвы. В последующие годы скорость биodeградации остается неизменной за счет накопления ингибирующих метаболитов и отсутствие факторов роста микроорганизмов (Silva-Castro et al., 2015). Эффективность очистки почв, с применением методов биоаугментации к 20 году составила от 70 % до 89 %. Биodeградация нефти и НП экзогенными естественными популяциями микроорганизмов хорошо известна, поскольку многие бактерии и грибы могут минерализовать углеводороды (Wu et al., 2016; Marchand et al., 2017). Штаммы биопрепарата «Универсал» были выделены из нефтезагрязненных почв месторождений Усинского района Республики Коми и в процессе исследований, высокую эффективность деградации нефтепродуктов почвы показал этот биопрепарат (таблица 2). Снижение содержания нефти в почве вариантов: У; УЛБ за 20 лет исследований составило 86,1 % и 89,3 %, соответственно.

Таким образом, полученные результаты доказывают возможность использования показателя ферментативной активности в качестве индикатора процессов восстановления загрязненных нефтью почв Крайнего Севера.

Таблица 2– Комплексная оценка состояния участка нефтяного разлива № 20 Пермоярбонского месторождения в ходе эксперимента

Вариант эксперимента	Год исследования						
	2002		2003	2004	2006	2009	2021
	июнь	сентябрь					
НЗП	$\frac{1,786 \pm 0,028}{87 \pm 30}$	$\frac{0,287 \pm 0,007}{85 \pm 30}$ (2,5 ± 0,5) *	$\frac{0,493 \pm 0,003}{85 \pm 30}$ (2,5 ± 0,5)	$\frac{0,473 \pm 0,005}{83 \pm 27}$ (4,11 ± 1,24)	$\frac{1,44 \pm 0,03}{80 \pm 26}$ (7,87 ± 0,12)	$\frac{1,54 \pm 0,03}{78 \pm 25}$ (9,78 ± 0,15)	$\frac{1,49 \pm 0,08}{76 \pm 24}$ (12,0 ± 1,7)
П	$\frac{2,83 \pm 0,06}{177 \pm 9}$	$\frac{2,17 \pm 0,06}{- **}$	$\frac{1,53 \pm 0,03}{-}$	$\frac{1,953 \pm 0,022}{-}$	$\frac{0,533 \pm 0,016}{46,1 \pm 2,3}$ (73,93 ± 0,11)	-	$\frac{1,90 \pm 0,12}{32 \pm 10}$ (82,2 ± 2,6)
И	$\frac{-}{341 \pm 17}$	-	$\frac{1,396 \pm 0,007}{-}$	$\frac{0,483 \pm 0,014}{-}$	$\frac{0,236 \pm 0,009}{130 \pm 6}$ (61,83 ± 0,11)	-	$\frac{1,29 \pm 0,06}{100 \pm 30}$ (70,5 ± 0,3)
У	$\frac{0,796 \pm 0,014}{212 \pm 11}$	$\frac{1,09 \pm 0,04}{-}$	$\frac{1,168 \pm 0,006}{-}$	$\frac{1,728 \pm 0,009}{-}$	$\frac{0,880 \pm 0,006}{45,0 \pm 2,2}$ (78,82 ± 0,11)	-	$\frac{1,51 \pm 0,06}{30 \pm 9}$ (86,1 ± 2,0)
О	$\frac{2,64 \pm 0,04}{468 \pm 23}$	$\frac{1,60 \pm 0,03}{-}$	$\frac{1,483 \pm 0,021}{-}$	$\frac{1,884 \pm 0,003}{-}$	$\frac{1,24 \pm 0,03}{140 \pm 7}$ (79 ± 9)	-	-
УЛБ	$\frac{1,372 \pm 0,021}{420 \pm 130}$	$\frac{1,61 \pm 0,04}{380 \pm 125}$ (9,92 ± 0,11)	$\frac{1,903 \pm 0,010}{210 \pm 70}$ (50,3 ± 0,8)	$\frac{1,917 \pm 0,026}{130 \pm 40}$ (68,8 ± 0,8)	$\frac{1,09 \pm 0,04}{120 \pm 30}$ (71,2 ± 0,6)	$\frac{1,34 \pm 0,05}{65 \pm 20}$ (84,52 ± 0,10)	$\frac{1,40 \pm 0,10}{45 \pm 13}$ (89,31 ± 0,10)
А	$\frac{0,263 \pm 0,007}{315 \pm 110}$	$\frac{0,785 \pm 0,006}{310 \pm 110}$ (1,8 ± 0,6)	$\frac{0,929 \pm 0,003}{280 \pm 90}$ (12,2 ± 1,3)	$\frac{1,238 \pm 0,010}{250 \pm 80}$ (20,4 ± 0,5)	$\frac{2,04 \pm 0,04}{240 \pm 80}$ (22,780 ± 0,018)	$\frac{1,75 \pm 0,07}{210 \pm 70}$ (33,1 ± 0,7)	$\frac{0,99 \pm 0,03}{200 \pm 60}$ (34,9 ± 2,1)
Д	$\frac{1,63 \pm 0,05}{446 \pm 22}$	$\frac{1,563 \pm 0,006}{-}$	$\frac{1,786 \pm 0,006}{-}$	$\frac{1,862 \pm 0,014}{-}$	$\frac{2,92 \pm 0,04}{180 \pm 9}$ (59,54 ± 0,10)	-	$\frac{1,65 \pm 0,06}{95 \pm 29}$ (79 ± 3)
Р	$\frac{1,208 \pm 0,021}{460 \pm 160}$	$\frac{1,307 \pm 0,008}{450 \pm 150}$ (3,23 ± 0,10)	$\frac{1,789 \pm 0,007}{280 \pm 90}$ (39,6 ± 2,4)	$\frac{2,090 \pm 0,010}{230 \pm 60}$ (49,6 ± 2,4)	$\frac{1,9 \pm 0,4}{210 \pm 70}$ (54,84 ± 0,10)	$\frac{1,11 \pm 0,03}{110 \pm 40}$ (76,5 ± 0,5)	$\frac{1,52 \pm 0,08}{100 \pm 30}$ (87,5 ± 0,5)

Примечание: в числителе – среднее геометрическое ферментативной активности; в знаменателе – содержание нефтепродуктов в почве, мг/г; * в скобках – снижение содержания нефтепродуктов относительно исходного для каждого варианта, %; ** – не определено.

Исследование ферментативной активности нефтезагрязненных почв в качестве индикатора потенциального источника микроорганизмов для получения высокоэффективных биологических продуктов

В образцах почв с территорий, загрязненных нефтью и НП старых нефтеразливов, определяли уровень загрязнения, каталазную, дегидрогеназную и уреазную активности, а также выделяли штаммы микроорганизмов (таблица 3). Содержание НП в образцах почв варьировало от 6,6 и до 450 мг/г. В почве с низким (6,6 мг/г) и средним (87 мг/г) уровнем загрязнения ФА окислительно-восстановительных и гидролитических процессов была не высокой и, напротив, с высоким уровнем загрязнения ФА увеличивалась (таблица 3).

В таблицах 3 и 4 дана сравнительная характеристика штаммов микроорганизмов, выделенных из загрязненных НП почв старых разливов в зависимости от активности почвенных ферментов. Так, штамм L18-3, выделенный из почвы с низким уровнем загрязнения и невысокой ФА, несмотря на хорошую скорость накопления биомассы, характеризовался слабой эмульгирующей активностью при низких стабильности эмульсии и эффективности очистки от НП за 3 суток. Другой штамм 13-1, выделенный из почвы со средним уровнем загрязнения и ФА (таблица 3), не был приспособлен к условиям соленой среды, отличался длительной работой биомассы, слабой эмульгирующей активностью и низкой эффективностью очистки от НП. Штамм 4-1P(15), выделенный из почвы с уровнем загрязнения выше среднего и повышенной ФА обладал повышенными биоэмульгирующими свойствами, но невысокой эффективностью очистки. Штаммы 3/2, 4/1, 7/2, 15/2, Ф4, Ф6, выделенные из одного источника – почвы, загрязненной дизельным топливом (25,5 мг/г) с невысокой ФА (таблицы 3, 4) по характеристике сильно отличались друг от друга, но в целом ни один из штаммов не подходил для использования в составе биопрепаратов: штамм 3/2 – был не галотолерантен, обладал слабой эмульгирующей активностью, низкой эффективностью очистки; штамм 4/1 – был не галотолерантен, не способен к образованию поверхностно-активных веществ; штамм 7/2 – был не галотолерантен, с длительным сроком накопления биомассы, низкой эффективностью очистки; штамм 15/2 – был не способен к образованию поверхностно-активных, с низкой эффективностью очистки; штамм Ф4 – был не галотолерантен с длительным сроком накопления биомассы, не способен к образованию поверхностно-активных; штамм Ф6 – был не галотолерантен. Кроме того, у штаммов 4/1, Ф4 и Ф6 был отмечен переход в некультивируемую форму в стрессовых условиях, что не позволило определить их эффективность очистки (таблица 4).

Таблица 3 – Ферментативная активность почв – индикатор потенциального источника микроорганизмов-нефтедеструкторов

Штамм	Источник	Показатели в нефтезагрязненной почве				Оптимальная среда культивирования
		НП, мг/г	<i>Cat</i> *	<i>Deh</i> **	<i>Ure</i> ***	
3/2	Почва, загрязненная дизельным топливом, Ненецкий автономный округ	25,5	0,1	2,9	12,3	МПА
4/1						МПА
7/2						Чапика
15/2						МПА
Ф4						Чапика
Ф6						МПА
L18-3	Нефтезагрязненная почва, Западная Сибирь, 2018г.	6,6	0,09	2,53	10,1	МПА
S1-09.15	Загрязненный грунт железнодорожного полотна, г. Сыктывкар, 2015 г.	245	2,9	48	55	МПА
13-1	Загрязненная нефтью почва Усинского района Республики Коми, 2002г.	87	1,5	2,5	23,1	Чапика
2SR-14	Нефтяной шламонакопитель Усинского района Республики Коми, 2014 г.	450	2,9	87,3	42,7	Чапика
4-1P(15)	Загрязненный грунт железнодорожного полотна, г. Сыктывкар, 2015 г.	134	2,8	46,6	53,0	Чапика

Примечание: единицы измерения: * – мл $KMnO_4$ / 1 г почвы; ** – мг формазана / 10 г почвы; *** – мг $N-NH_4$ /1 г почвы.

Штаммы S1-09.15, 2SR-14, выделенные из сильно загрязненных почв, обладали повышенной ФА и высокой скоростью накопления биомассы, галотолерантны, образовывали биоПАВ, имели стабильную эмульсию и высокую эффективность очистки от НП (таблица 4). Эти штаммы были рекомендованы для дальнейшего их изучения с целью разработки на их основе биопрепаратов, биосорбентов и других биопродуктов нефтеокисляющего действия. Для усиления свойств выбранных штаммов в состав консорциума ввели штамм микроводорослей *Chlorella vulgaris* SYKOA Ch-011-10 в качестве источника молекулярного кислорода.

Таблица 4 – Характеристика штаммов, выделенных из загрязненных нефтью и нефтепродуктами почв

Штамм	Способность к прямому росту на нефти	Галотолерантность	Скорость накопления биомассы до 10 ⁸ КОЕ, дней	Эмульгирующая активность, %	Стабильность эмульсии за 24 часа, %	Эффективность очистки от НП за 3 суток при загрязнении 5 %, %
3/2	+	-	4	17±6,1	82	14
4/1	-	-	6	0	0	-
7/2	+	-	8	45±3,5	100	9
15/2	+	+	7	0	0	9
Ф4	-	-	9	0	0	-
Ф6	-	-	6	47±0,5	94	-
L18-3	+	+	3	27±1,7	40	28
S1-09.15	+	+	3	71±3,1	100	69
13-1	+	-	7	14±0,9	63	25
2SR-14	+	+	4	54±2,2	93	72
4-1P (15)	+	+	4	66±1,4	97	36

Таким образом, на примере исследованных почв, показана взаимосвязь между содержанием НП, ФА и характеристикой штаммов, выделенных из этих почв.

Глава 4 посвящена результатам выделения и идентификации микроорганизмов-нефтедеструкторов, их биохимическим и биотехнологическим свойствам.

Штамм бактерий *Pseudomonas yamanorum* VKM В-3033D

Выделение, культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства. Штамм (S1-09.15) *P. yamanorum* был выделен из загрязненного грунта, отобранного с участка железнодорожного полотна в г. Сыктывкаре Республики Коми. Загрязненная почва характеризовалась высокой каталазной, дегидрогеназной и уреазной активностью (таблица 3). Колонии на среде МПА точечные Ø < 1 мм, со слизистым чехлом (до 5 мм), палево-желтые, непрозрачные, блестящие, круглые, профиль выпуклый, край ровный. В среду диффундирует неоновно-желтый пигмент. Аэроб с окислительным типом метаболизма. Не нуждается в факторах роста. Каталазаположительный. Способен к нитрификации. Обладает амилолитической активностью. Использует как единственный источник углеводов сахарозу, глюкозу, лактозу, маннит.

Генотипическая характеристика штамма *Pseudomonas yamanorum*. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК и *gyrB* штамма с известными структурами из GenBank свидетельствует о высоком его

сходстве с типовыми штаммами видов *Pseudomonas yamanorum* 8H(T) (Arnau et al., 2015) и *P.brenneri* CFML 97-391 (T) (Baïda et al., 2001), 99,92 % и 99,62%, соответственно. В результате сравнительного анализа фрагмента гена 16S рНК штамма доказана его принадлежность к роду *Pseudomonas*, к филогенетически плотной «*Pseudomonas fluorescens* – группе». На основании филогенетического анализа фрагмента гена *gyrB* и 16S рНК штамм идентифицирован как *Pseudomonas yamanorum* (Arnau et al., 2015) (рисунок 1).



Рисунок 1 – Филогенетическое положение штамма *Pseudomonas yamanorum* S1-09.15 на основании нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК и *gyrB* с известными структурами из GenBank. Программа BLAST (NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), программа MEGA 6.

Состав жирных кислот клетки штамма *Pseudomonas yamanorum*. Оценка жирнокислотного состава (ЖК) клеток имеет важное значение для прогнозирования пригодности штаммов в качестве сырья для получения биодизеля. Клетки штамма *P. yamanorum* ВКМ В-3033D, культивированного на разных средах МПА – с пептоном содержат насыщенные и ненасыщенные ЖК с четным числом атомов углерода от C₁₂ до C₂₄. Доминирующими жирными кислотами для штамма, культивированного на среде МПА с пептоном являются пальмитиновая (C_{16:0}) (53,1 %), олеиновая (C_{18:1(9)}) (11,7 %), меристиновая (C_{14:0}) (8,7 %), стеариновая (C_{18:0}) (5,9 %) и вакценовая кислота (C_{18:1(11)}) (5,9 %), Остальные ЖК, выявлены в незначительном количестве.

Штамм дрожжей *Rhodotorula glutinis* VKM Y-2998D

Выделение, культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства. Штамм (2SR-14) *Rhodotorula glutinis* был выделен из пробы нефтяного шламонакопителя Усинского района Республики Коми. Загрязненная почва характеризовалась высокой каталазной, дегидрогеназной и уреазной активностью (таблица 3). Колонии штамма красные слизистые выпуклые блестящие гладкие, край ровный. Клетки почкующиеся округлые, овальные, $2,5-6,0 \times 4,0-8,5$ мкм, с небольшой капсулой. Баллистоспоры и псевдомицелий отсутствуют. Сахара не сбраживает. Ассимилирует глюкозу, мальтозу, мелецитозу (слабо), L-арабинозу (слабо), рамнозу (медленно), сорбит, маннит, этанол. Не ассимилирует лактозу, эритрит, арабит, дульцит, инозит, глюкуронат. Усваивает нитраты, нитриты (медленно), лизин, этиламин (слабо). Крахмалоподобные вещества не образует. При $+37$ °C не растет.

Генотипическая характеристика штамма *Rhodotorula glutinis*. Проведена генетическая характеристика штамма Y-2998D с помощью анализа нуклеотидных последовательностей регионов рДНК (малой субъединицы 18S, региона ITS1-5.8S-ITS2 и D1-D2-D3 доменов большой субъединицы 26S, а также гена фактора элонгации транскрипции 1α (*tef-1\alpha*). Регион малой субъединицы 18S рДНК: сходство 99,76% с *R. glutinis* CBS 20 (GenBank X69853). ITS1-5.8S-ITS2 регион рДНК: сходство 99,49% с *R. glutinis* CBS 20 (GenBank AF444539). D1-D2-D3 домены большой субъединицы 26S рДНК: сходство 99,88% с *R. glutinis* CBS 20 (GenBank NG_055728). Ген фактора элонгации транскрипции 1α (*tef-1\alpha*): сходство 90,14% с *R. glutinis* JCM 8208 (= CBS 20) (GenBank KJ707869). Ген *tef-1\alpha* отражает штаммовую специфику и рассматривается как ген «домашнего хозяйства» (housekeeping gene) (рисунок 2).

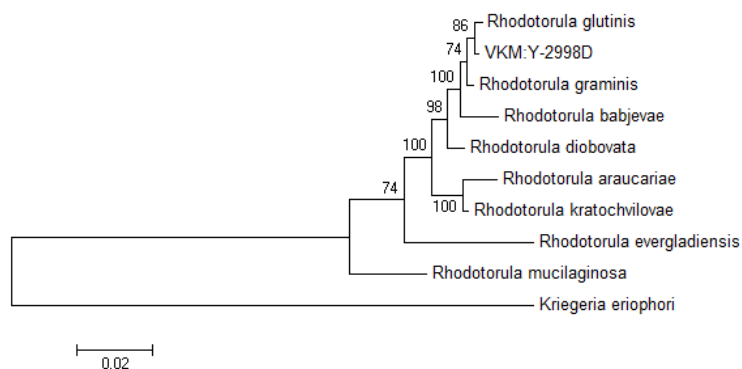


Рисунок 2 – Филогенетический анализ (ML) для представителей клада *Rhodotorula glutinis* и штамма VKM Y-2998D на основе нуклеотидных последовательностей регионов 18S, ITS1-5.8S-ITS2, D1-D2-D3 доменов 26S рДНК и гена *tef-1\alpha*. Бутстрэп более 55% (отмечен на древе) получен для 100 альтернативных построений. Шкала показывает число нуклеотидных замен на 1 нуклеотид. *Kriegeria eriophori* – внешняя группа.

Состав жирных кислот клетки штамма *Rhodotorula glutinis*.

Доминирующими жирными кислотами для штамма *R. glutinis* являются насыщенные и ненасыщенные ЖК с четным числом атомов углерода от C12 до C24: олеиновая (C_{18:1(9)}) (60,7 %), пальмитиновая (C_{16:0}) (20,9 %), вакценовая кислота (C_{18:1(11)}) (6,4 %) и пальмитолеиновая (C_{16:1(9)}) (4,6 %). Содержание остальных ЖК в клеточной стенке штамма было незначительно.

Патогенность ассоциации *Pseudomonas yamanorum* VKM В-3033D и *Rhodotorula glutinis* VKM Y-2998D (вирулентность, токсичность, токсигенность, диссеминация) для млекопитающих. В соответствии с методическими указаниями Минздрава СССР № 2620-82 и № 4263-87 было установлено, что ассоциация микроорганизмов *R. glutinis* VKM Y-2998D и *P. yamanorum* VKM В-3033D по показателям вирулентности, диссеминации, токсичности и токсигенности не является патогенной для теплокровных животных.

Гигиеническая характеристика штаммов. Содержание токсичных и опасных веществ. В консорциуме не обнаружены патогенные и болезнетворные микроорганизмы (КОЕ/г), в том числе *E.coli*, сальмонеллы, протеи, стафилококки, колиморфные бактерии, бациллы, энтерококки.

Штамм *Chlorella vulgaris* IPPAS С-2024

Выделение, культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства. Штамм микроводоросли *Chlorella vulgaris* был выделен в 2010 г. из почвы на стоянке оленеводов на Приполярном Урале. Форма клеток штамма шаровидная, размер от 3,3 до 13,3 мкм в диаметре. Периноид округлый с 2 – 4 крахмальными зернами, хорошо заметный. Хроматофор чашевидный, зеленый. Жгутиков нет, автоспоры освобождаются путем разрыва материнской оболочки и имеют форму от неправильно шаровидной до тетраэдрической, пустые оболочки материнских клеток двух-трехдольчатые. В условиях оптимального роста большая часть клеток имеет размер в диапазоне от 6 до 8 мкм.

Состав жирных кислот клеточной стенки штамма *Chlorella vulgaris*. В составе ЖК стенок штамма *C. vulgaris* IPPAS С-2024, культивированного на среде Болда доминируют насыщенные и ненасыщенные ЖК с четным числом атомов углерода от C12 до C24: пальмитиновая (C_{16:0}) (37,2 %), олеиновая (C_{18:1(9)}) (29,9 %), стеариновая (C_{18:0}) (11,0 %) меристиновая (C_{14:0}) (8,7 %). Остальные ЖК, выявлены в незначительном количестве.

Биотехнологические характеристики монокультур

Важными метаболитами микроорганизмов являются биосурфактанты, которые способны повышать биологическую доступность углеводов, переводя их в водную фазу (Бектурова, Масалимов, 2013).

Высокие показатели индекса эмульгирования, стабильности эмульсии, эффективности очистки от НП штаммов бактерий *P. yamanorum*, дрожжей *R. glutinis* представлены в таблице 4.

Штаммы значительно снижают поверхностное натяжение: бактерии *P. yamanorum* – с 75 до 31 мН/м; дрожжи *R. glutinis* – с 67 мН/м до 34 мН/м.

Монокультуры обладают высокой степенью биотрансформации НП при загрязнении 10 % (таблица 5) за короткое время и могут использоваться для дальнейших исследований в составе консорциума.

Таблица 5 – Эффективность очистки от НП штаммами микроорганизмов *P. yamanorum* и *R. glutinis* по критериям «время обработки/виды загрязнений» при уровне загрязнения 10 %

Микроорганизмы	Время обработки, сутки	Эффективность очистки, %		Трансформация ПАУ, % флуорен, фенантрен, пирен, бенз[а]антрацен, флуорантен
		Масло	Нефть	
<i>R. glutinis</i>	7	Не опр.	46	72
<i>P. yamanorum</i>	14	37	69	45

Фитотоксичность штаммов

Штаммы дрожжей *R. glutinis*, бактерий *P. yamanorum*, микроводорослей *C. vulgaris*) не проявляли отрицательного воздействия и не угнетали семена кресс-салата, горчицы, красного клевера, овса.

Таким образом, монокультуры (*R. glutinis*, *P. yamanorum*, *C. vulgaris*) не токсичны, не патогенны и могут использоваться в качестве биотехнологических агентов для очистки загрязненных НП почвы и воды, а также для создания полифункциональных препаратов.

Глава 5 посвящена результатам оценки биотехнологических свойств альго-бактериально-дрожжевого консорциума. Биокаталитическое окисление углеводов до воды и углекислого газа большинством микроорганизмов происходит с помощью адаптивных и конститутивных ферментов путем длительного процесса каталитических реакций (Тимергазина, Переходова, 2012). Препараты, состоящие из ассоциации штаммов микроорганизмов, обладают ускоренной биотрансформацией токсичных углеводов. Консорциум, содержащий в своем составе микроводоросли

имеет более широкие адаптационные и экологические возможности для использования. При общих взаимодействиях микроводоросли выделяют растворенный органический углерод, который становится доступным для бактерий. В свою очередь, бактерии минерализуют серу, азот и фосфор, чтобы поддерживать дальнейший рост микроводорослей, производят сидерофоры для связывания железа, также используемые микроводорослями (Ashraf, 2023). Концентрация клеток в альго-бактериально-дрожжевом консорциуме составляла: штамм бактерий *Pseudomonas yamanorum* – 10^{12} КОЕ/мл, штамм дрожжей *Rhodotorula glutinis* – 10^9 КОЕ/мл, штамм микроводорослей *Chlorella vulgaris* – 10^8 кл./мл.

Биотехнологические свойства альго-бактериально-дрожжевого консорциума

Синергетический эффект. Степень синергизма – это количественная оценка способности двух или более компонентов (Van Dyk, 2012), в нашем случае, микроорганизмов консорциума, усиливать взаимодействие на субстрат (нефть и нефтепродукты).

Сравнительная оценка монокультур и консорциума в двух средах модельной воды при загрязнении сырой нефтью 0,5 % и 1 % показала, что окислительная способность консорциума оказалась значительней, чем монокультур. Расчет количественной оценки эффективности (коэффициента синергизма) можно провести по формуле, предложенной Шарифуллиним и соавторами (Шарифуллин и др. 2007), применённой с учетом полученных результатов содержания НП в среде, после обработки среды микроорганизмами консорциума:

$$K_{\text{син.}} = C/(A+B),$$

где C – эффективность очистки нефтезагрязненной воды при внесении консорциума, A – эффективность очистки нефтезагрязненной воды при внесении бактерий, B – эффективность очистки нефтезагрязненной воды при внесении дрожжей. При этом, что если $K_{\text{син.}} > 1$, то проявляется синергетический эффект. Исходя из данных рисунка 3 были проведены расчеты $K_{\text{син.}}$. Максимальный синергетический эффект в обоих случаях был выше 1 и при концентрации НП в воде 5 г/дм^3 составил 1,48, а при 10 г/дм^3 – 1,28.

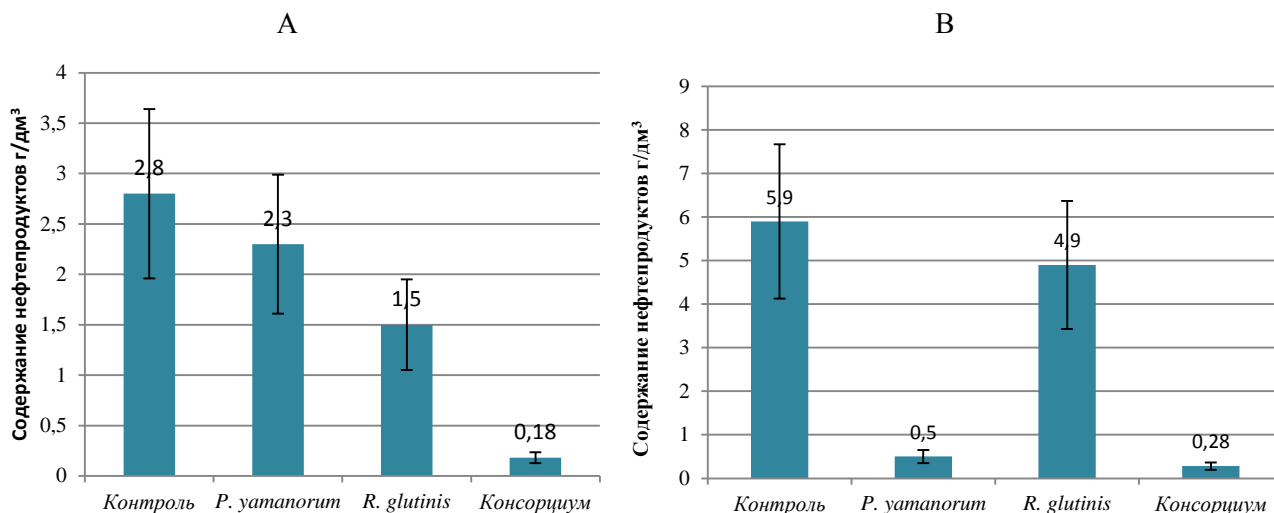


Рисунок 3 – Содержание НП после очистки: А: 5 г/дм³; В: 10 г/дм³

Способность к деструкции нефтепродуктов консорциума с разным соотношением микроорганизмов. Универсальность консорциума заключается в высокой вариативности состава штаммов, в зависимости от конкретной задачи (таблица 6). При необходимости очистки от трудноразлагаемых загрязнителей в консорциум входят все 3 составляющих штамма в соотношении, определяемом в зависимости от типа почвы, состава НП, концентрации загрязнения.

Таблица 6 – Свойства альго-бактериально-дрожжевого консорциума в зависимости от концентрации микроорганизмов

Культуры микроорганизмов	Соотношение, %	Свойства
Бактерии <i>P. yamanorum</i> / дрожжи <i>R. glutinis</i>	50/50	Снижение концентрации растворенных в воде НП на 53 %, снижение до 80 % низкомолекулярных ПАУ (от C ₁₃ H ₁₀ до C ₁₆ H ₁₀) за 14 суток. Снижение содержания нефтепродуктов в грунте (ПГС железнодорожного полотна) за 3 суток – 40 %.
Бактерии <i>P. yamanorum</i> / дрожжи <i>R. glutinis</i>	60/40	Снижение концентрации растворенных в воде НП на 50 %, снижение до 75 % низкомолекулярных ПАУ (от C ₁₃ H ₁₀ до C ₁₆ H ₁₀) за 14 суток. Снижение содержания НП в грунте (ПГС железнодорожного полотна) за 3 суток – 42%.
Бактерии <i>P. yamanorum</i> / дрожжи <i>R. glutinis</i>	0,1/99,9	Снижение концентрации растворенных в воде НП на 46 %, снижение до 72 % низкомолекулярных ПАУ (от C ₁₃ H ₁₀ до C ₁₆ H ₁₀) за 14 суток. В значительной степени происходило снижение доли отдельных ПАУ: C ₁₃ H ₁₀ , C ₁₄ H ₁₀ , C ₁₆ H ₁₀ и C ₁₈ H ₁₂ за 7 суток.
Бактерии <i>P. yamanorum</i> / дрожжи <i>R. glutinis</i>	99,9/0,1	Снижение содержания НП в воде, загрязненной отработанным маслом на 36,8 %, загрязненной нефтью на 96% за 14 суток. В грунте снижение содержания НП на 35% за 90 суток.

Продолжение таблицы 6.

Культуры микроорганизмов	Соотношение, %	Свойства
Бактерии <i>P. yamanorum</i> дрожжи <i>R. glutinis</i> / микроводоросли <i>C. vulgaris</i>	50/50	Снижение концентрации растворенных в воде НП на 90–92 %, снижение на 83 % низкомолекулярных ПАУ (от C ₁₃ H ₁₀ до C ₁₆ H ₁₀), снижение доли отдельных ПАУ: C ₁₃ H ₁₀ , C ₁₄ H ₁₀ , C ₁₆ H ₁₀ за 14 суток.
Бактерии <i>P. yamanorum</i> дрожжи <i>R. glutinis</i> / микроводоросли <i>C. vulgaris</i>	70/30	Снижение концентрации растворенных в воде НП на 84 % за 30 суток. Метаболизировались 81 % низкомолекулярных ПАУ (от C ₁₃ H ₁₀ до C ₁₆ H ₁₀), в значительной степени происходило снижение доли отдельных ПАУ: C ₁₃ H ₁₀ , фенантрена, флуорантена и C ₁₆ H ₁₀ за 7 суток.

В главе 6 приведены результаты лабораторных экспериментов по исследованию основных параметров иммобилизованных клеток микроорганизмов на различных носителях, дана сравнительная оценка биологической активности и нефтеокисляющей способности биогеосорбента в зависимости от условий и срока хранения и оценка сорбционных и деструктивных свойств биогеосорбента при использовании на различных объектах.

Иммобилизация альго-бактериально-дрожжевого консорциума на разных носителях. Клетки микроорганизмов, иммобилизованные на носителях стабильны и ингибируются более высокими концентрациями загрязнителей, нежели свободные (Юрин, 2014). Условиями иммобилизации и подбора носителей является обеспечение минимальными повреждениями клеток и препятствование диффузии, простота изготовления биосорбентов.

Иммобилизация альго-бактериально-дрожжевого консорциума, его основные научно-технические параметры были испытаны на различных носителях (рисунок 4), характеристика которых приведена в таблице 7.

Таблица 7 – Основные научно-технические параметры исследованных биосорбентов

Биосорбент	Срок плавучести на поверхности воды, сутки	Сорбционная нефтеемкость, кг (нефть/ сорбент)	Биодеструкция НП в аэробных условиях при температурах +20-23°C, %	Биоразлагаемость	Стоимость носителя, руб./кг (на 2022г.)
Обезвоженный осадок активного ила	постоянно	10–14/1	88–96	Нет	-
Глауконитовый	60	7–10/1	65–99	Да	10
Аргиллитовый	60	6–8/1	71–77	Да	20
Катионный полиакриламид	30	7–8/1	40–60	Да	130



Рисунок 4 – Биосорбенты (носители с иммобилизованным альго-бактериально-дрожжевым консорциумом): А: Обезвоженный осадок активного ила; Б: Глауконитовый минерал (**Биогеосорбент ГЕОЛЕКС®**); В: Аргиллитовый минерал; Г: Катионный полиакриламид.

Иммобилизация клеток консорциума на минеральный носитель – глауконит. По ряду показателей в качестве носителя микроорганизмов был выбран глауконитовый минерал – наиболее доступный, безвредный и экономически выгодный (таблица 7). Биогеосорбент получали путем обработки сорбента (глауконита) крупностью 0,1–0,25 мм альго-бактериально-дрожжевым консорциумом (титр клеток 10^{12}) в соотношении 1 часть консорциума к 10 частям сорбента.

Микроскопирование биогеосорбента показало наличие клеток альго-бактериально-дрожжевого консорциума на поверхности минерала (рисунок 5).

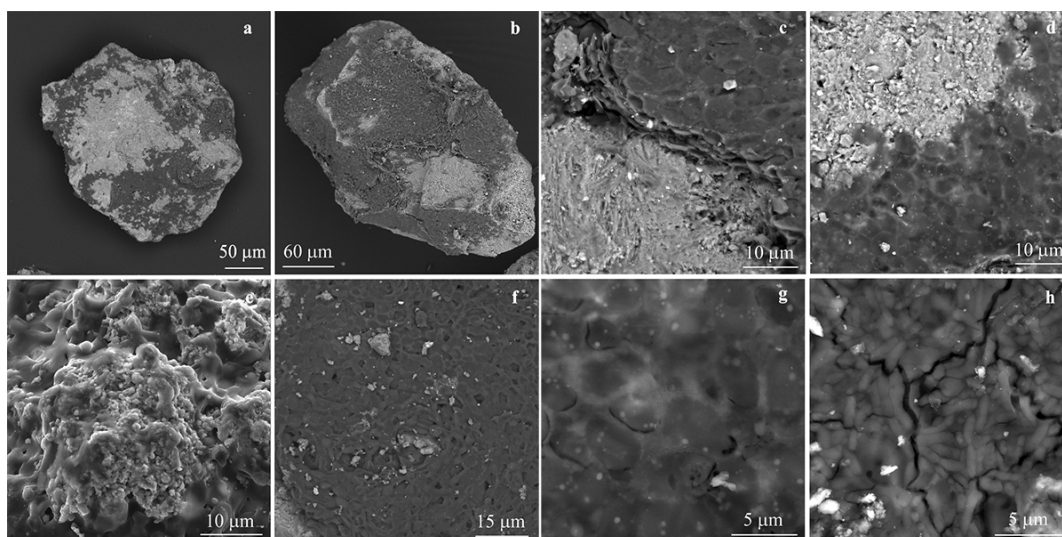


Рисунок 5 – СЭМ-изображения поверхности биогеосорбента (светлое – порода, темное – клетки консорциума), е – режим вторичных электронов, остальное – режим упруго-отраженных электронов

Наибольшее влияние на связывание клеток микроорганизмов с носителем оказывают диполь-дипольные взаимодействия.

Биологическая активность и нефтеокисляющая способность биогеосорбента в зависимости от условий и срока хранения. Для определения функционального состояния (Юрин, Дитченко, 2014) иммобилизованных на глауконите клеток были проведены исследования биохимических процессов и анализы микробиологической активности (МА) в биогеосорбенте. Сравнительная оценка биологической активности биогеосорбентов разных сроков изготовления и условий хранения производилась относительно свежеприготовленного образца биогеосорбента (7 суток) (таблица 8). Эффективность очистки воды от НП оценивалась относительно загрязненного образца.

Исследование функционального состояния иммобилизованных на глауконите клеток альго-бактериально-дрожжевого консорциума показало, что ферментативная и микробиологическая активности биогеосорбентов разного срока изготовления и условий хранения достаточно высокие и сравнимы со свежеприготовленным образцом (таблица 8). Следовательно, иммобилизация клеток микроорганизмов на глауконит способствует сохранению их активности длительное время. Таким образом, глауконит является носителем пролонгированного действия, обеспечивая клеткам биопрепарата повышение стрессоустойчивости, что ведет к увеличению срока хранения, а также снижает риски, связанные с условиями хранения. При попадании в среду, загрязненную нефтью и НП, клетки выходят из состояния анабиоза, активно разлагая НП.

Таблица 8 – Функциональное состояния иммобилизованных на глауконите клеток

Срок изготовления	Условия хранения	Микробиологическая активность от свежеприготовленного образца, %	Ферментативная активность от свежеприготовленного образца, %	Эффективность очистки воды от НП, %
7 суток	комнатная температура	100	100	50,5
1 год	-35 °С – +25 °С	94	42,6	43,6
2 года		96	85,5*	49,7
1 год	комнатная температура	96	37,6	48,9
2 года		93	37,2	42,6
Глауконит			0,11	31,4

* - Образец отличался повышенной влажностью

Глава 7 посвящена оценке влияния консорциума и биогеосорбента на очистку от нефти и НП в водных и почвенных объектах, биоконверсии НП в прекурсор биодизеля.

Опытно-промышленные испытания технологии очистки нефтесодержащих водных объектов. Альго-бактериально-дрожжевой консорциум и биогеосорбент однократно вносили соответственно в сточную воду очистных сооружения АО «КомиАвиаТранс» и загрязненную нефтью воду шламового амбара в Ямало-Ненецком автономном округе, периодически аэрируя с помощью насоса. Оценку дегидрогеназной активности и нефтеокисляющей способности проводили спустя 30 минут и 60 суток.

При внесении консорциума в загрязненную воду активность процессов дегидрирования усиливалась за счет жизнедеятельности бактерий, дрожжей и микроводорослей, окисляющих НП (таблица 9). Уменьшение в конце эксперимента количества клеток консорциума и, соответственно, снижение дегидрогеназной активности обусловлено окислением НП.

В условиях опытно-промышленного эксперимента на очистных сооружениях АО «КомиАвиаТранс» была показана возможность оптимизации технологии очистки содержащих нефтепродукты сточных вод путем однократного внесения альго-бактериально-дрожжевого консорциума в летний период. Эффективность очистки составила 91 % (таблица 9).

На шламовом амбаре Ямало-Ненецкого автономного округа, несмотря на то, что комплекс работ согласно разработанному проекту очистки загрязненной нефтью воды был осуществлен в октябре при температуре от -3 °С до +5 °С, технология использования биогеосорбента для очистки воды зарекомендовала себя. Содержание НП в воде было доведено до уровня ПДК (таблица 9).

Таблица 9 – Условия и результаты опытно-промышленных испытаний альго-бактериально-дрожжевого консорциума и биогеосорбента на водных объектах

Объект	НП	Дегидрогеназная активность, мг формазана / 1 мл			Содержание НП, мг/дм ³	
		До очистки	Промежуточный результат	После очистки	До очистки	После очистки
Очистные сооружения АО «КомиАвиаТранс» г. Сыктывкара	Керосин рН воды 4,2	0,36± 0,015	1,08±0,05	0,01	850±85	78±19
Шламовый амбар Ямало-Ненецкий автономный округ	Нефть рН воды 3,84	0,28± 0,01	0,97±0,04	0,02	69±17	0,023±0,008

Опытно-промышленные испытания технологии очистки нефтесодержащих почвенных объектов. При применении биопрепаратов и биосорбентов необходимо учитывать особенности климатической зоны и подходить к каждому объекту рекультивации индивидуально с учетом климата, вида почв, нефтяного загрязнения, состава и содержания нефти в почве или воде в результате разлива. Объекты, вид почвы, содержание поллютанта и примененные технологии описаны в таблице 10.

Таблица 10 – Условия и технологические материалы опытно-промышленных испытаний

ОПИ	Объект	Характеристика пробы	Поллютант, содержание в почве	Технологические материалы
1	Ямало-Ненецкий автономный округ на 76 км трассы «Новый Уренгой – Сургут» в районе кранового узла	Торф (1м×1м) рН _{вод.} 3,96-5,61	Газолин, до 20 мг/г	Биогеосорбент. Минеральные удобрения (N ₁₄ P ₁₄ K ₁₄) – 12 г; Семена трав-рекультивантов (мятлик, овес, канареечник, клевер)
2	Ханты-Мансийский автономный округ в районе трассы Лангепас–Покачи	Торф (1м×1м) рН _{вод.} 3,92-4,93	Нефть, до 6,6 мг/г	Биогеосорбент. Минеральные удобрения (N ₁₄ P ₁₄ K ₁₄) – 12 г. Семена трав-рекультивантов (мятлик, овес, канареечник, клевер)
3	Насосная подстанция предприятия АО «КомиАвиаТранс» г. Сыктывкар	Насыпной грунт из песчано-гравийной смеси (1м×1м) рН _{вод.} 5,74-6,29	Керосин до 32 мг/г	Биогеосорбент. Минеральные удобрения (N ₁₄ P ₁₄ K ₁₄) – 12 г.
4	Республика Коми, п. Ярега в районе демонтированного резервуарного парка	Насыпной грунт – тяжелый суглинок 100 м ² рН _{вод.} 6,86-7,32	Нефть до 11 мг/г	Биогеосорбент. Минеральные удобрения (N ₁₄ P ₁₄ K ₁₄). Кордревесная смесь (покрытие поверхности загрязненного участка не более 5 см). Семена трав-рекультивантов (мятлик, овес, канареечник, клевер)

Повышение дегидрогеназной активности в почве участков экспериментов свидетельствовало об активных нефтедеструкционных процессах за счет применяемых биотехнологий (рисунок 6 А). Снижение содержания НП в почве к концу эксперимента приводило к снижению активности дегидрогеназы, что свидетельствовало о восстановительном характере сукцессии.

При среднем уровне загрязнения почвы на ОПИ-1 и ОПИ-3 содержание НП в конце эксперимента не достигло фоновых и уровня допустимого остаточного содержания нефти в почве (ДОСНП). Биотехнологии примененные в почве участков с невысоким загрязнением поллютанта на ОПИ-2 и ОПИ-4 способствовали окислению НП до уровня ДОСНП.

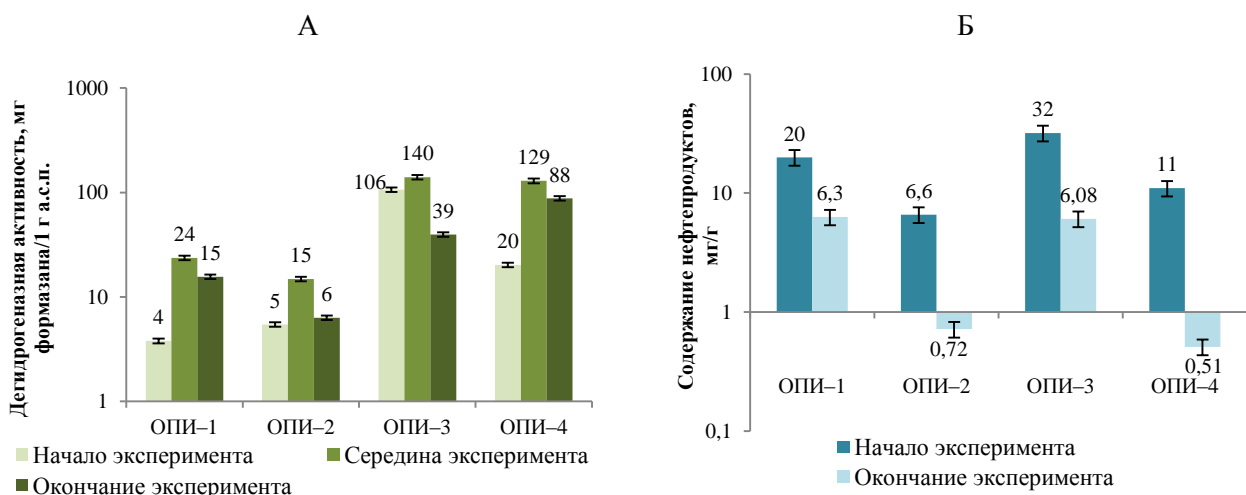


Рисунок 6 – А: Дегидрогеназная активность почвы до и после проведения опытно-промышленных испытаний технологий; Б: Содержание НП в почве до и после проведения опытно-промышленных испытаний технологий

В результате примененных биотехнологии на ОПИ-2, ОПИ-3 и ОПИ-4 содержание НП в почве к концу экспериментов снизилось на 89 %, 81 % и 95 %, соответственно. В почве участка ОПИ-1 эффективность очистки составила 68 %. Такой невысокий результат связан с токсичностью нефтепродукта – газаolina, которым был загрязнен этот участок. При проведение повторной обработки почвы биогеосорбентом или альго-бактериально-дрожжевым консорциумом можно достичь более высокой эффективности очистки.

Очистка щебеночного балласта от нефтепродуктов. Щебеночный балласт, получаемый из прочных магматических пород, является лучшим из современных балластных материалов (Jing et al., 2020). При эксплуатации железной дороги происходит загрязнение щебеночного балласта органическими веществами. Наиболее распространёнными загрязнителями балластного слоя являются органические, в том числе нефть, нефтепродукты, мазут, топливо, смазочные материалы. Содержание органических загрязнений варьирует в диапазоне значений от 5 до 20 г/кг грунта. Для механической очистки на полигонах может применяться высокопроизводительная щебнеочистительная машина (ЩОМ-1400) (Федасов, 2021). В этом случае органические загрязнители не полностью удаляются со щебня. Альтернативой механической очистке щебеночного балласта может послужить биологическая обработка с помощью микроорганизмов-деструкторов.

Консорциум и активированный биогеосорбент (замачивание на сутки в воде с небольшим количеством поллютанта) активно экстрагировали нефтяное загрязнение с поверхности щебня. Эффективность очистки щебеночного балласта составила 97 – 98 %.

Как при продолжительной экспозиции в роторе (72 ч), так и при небольшом промежутке времени (1 ч) происходит эффективная экстракция НП с поверхности щебеночного балласта в суспензию консорциума. Экстракция НП в суспензию активированного биогеосорбента эффективнее за 1 час, чем за 0,25ч.

Таблица 11 – Содержание НП в суспензиях, мг/г

Вариант	Время экспозиции в роторе, ч	Содержание НП в суспензии, мг/г
Суспензия консорциума	1	0,8
	72	1,8
Суспензия активированного биогеосорбента	0,25	0,19
	1	2,2

Биоконверсия отработанной суспензии в биодизель. Актуальным в настоящее время является вовлечение промышленных отходов в хозяйственный оборот в качестве вторичных сырьевых ресурсов (Ho et al., 2014; Ghosh et al., 2016). Предложено технологическое решение, основанное на получении биодизеля из липидных метаболитов – ЖК, накопленных микроорганизмами в суспензии в процессе наработки биомассы альго-бактериально-дрожжевого консорциума, иммобилизованного на глауконите. Определение экстрагированных ЖК в суспензии проводилось через 5, 60 минут, 9, 24 и 36 часов периодического перемешивания в роторе щебеночного балласта в биомассе альго-бактериально-дрожжевого консорциума, иммобилизованного на глауконите. Глауконит выступал в качестве катализатора для лучшего выхода масел в процессе биоконверсии углеводов (Gaide et al., 2021).

Важной характеристикой получаемого энергетического продукта является его выход в зависимости от начальной биомассы суспензии (таблица 12). В ходе экспозиции в роторе было отмечено снижение биомассы суспензии. Максимальный выход биодизеля, определяемый как отношение массы метиловых эфиров ЖК к массе нейтральных липидов, выделенных из образца, составил 54-58 % в суспензии после 60 минут и 9 часов экспозиции, что свидетельствовало о высокой степени пригодности липидов в качестве источника биодизеля. При этом содержание липидов в биомассе не претерпело достоверных изменений в ходе эксперимента и варьировало в диапазоне 10,6 – 12,2 %. Уменьшение биомассы и столь низкое содержание липидов может объясняться значительным влиянием неблагоприятных факторов среды, препятствующим липогенезу в клетках.

Таблица 12 – Эффективность липогенеза в суспензии

Показатель	Время экспозиции				
	5 мин	60 мин	9 ч	24 ч	36 ч
Биомасса суспензии, г/дм ³	0,24±0,02	0,132±0,013	0,12±0,03	0,11±0,04	0,079±0,006
Содержание липидов, %	12,2±3	10,8±3,6	12±3	11,8±3	10,6±3,2
Выход биодизеля, %	36,3±6	54±14	58±9	31,0±6	39±4

Оценка изменений жирнокислотного состава имеет значение для прогнозирования качества и стабильности хранения конечного продукта. Жиры, входящие в состав продукта, в наибольшей степени подвержены окислению по двойным связям, в результате которого меняется ненасыщенность жирных кислот. Показано, что суспензия содержит насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты с четным числом атомов углерода от C₁₂ до C₂₀ (таблица 13). Во всех экстрактах преобладала олеиновая кислота (C_{18:0} 46,65 – 69,7 % от суммарного содержания ЖК), содержание которой уменьшалось после экспозиции щебеночного балласта в роторе в течение 24 – 36 часов. Наблюдалось увеличение содержания пальмитиновой (C_{16:0}) с 17,0 до 26,9 % и пальмитолеиновой (C_{16:1}) ЖК с 2,8 до 7,5 %.

Таблица 13 – Жирнокислотный состав прекурсоров в образцах суспензии

Компонент	Время экспозиции				
	5 мин	60 мин	9 ч	24 ч	36 ч
C _{12:0} , %	0,31	0,61	0,19	0,38	0,40
C _{14:0} , %	2,06	2,98	2,17	2,25	3,46
C _{15:0} , %	0,63	1,12	0,67	0,87	1,28
C _{16:0} , %	17,03	19,36	17,90	19,01	26,86
C _{16:1} , %	2,77	5,07	6,23	8,06	7,54
C _{17:0} , %	0,22	0,29	0,22	0,31	0,40
C _{18:0} , %	1,48	1,81	1,58	1,61	3,17
C _{18:1} , %	69,7	57,90	59,13	56,00	46,65
C _{18:2 (cis-cis)} , %	4,29	8,92	9,91	9,71	9,26
C _{18:3} , %	1,52	1,74	1,91	1,70	0,75
C _{20:0} , %	0,00	0,17	0,10	0,10	0,22
Насыщенные ЖК, %	21,45	26,34	22,83	24,53	35,80
Мононенасыщенные ЖК, %	72,46	62,97	65,36	64,06	54,19
Полиненасыщенные ЖК, %	5,81	10,66	11,82	11,41	10,01

В таблице 14 приведен ряд параметров (цетановое число, йодное число, теплота сгорания, вязкость и плотность) прекурсоров биодизеля из образцов, экстрагированных за 5, 60 мин, 9, 24 и 36 часов, рассчитанных на основе данных по жирнокислотному составу (Talebi et al., 2014).

Таблица 14 – Ключевые параметры прекурсора биодизеля, полученного из различных экстрактов суспензии

Показатель	Время экспозиции				
	5 мин	60 мин	9 ч	24 ч	36 ч
Цетановое число	55,7	55,3	54,4	54,7	57,2
Йодное число, г/100г	77,4	78,1	82,6	80,1	68,3
Теплота сгорания, МДж/кг	39,5	39,4	39,4	39,4	39,4
Вязкость (ν), мм ² /с	3,92	3,83	3,84	3,8	3,8
Плотность (ρ), г/см ³	0,87	0,87	0,88	0,88	0,87

Цетановое число, йодное число, теплота сгорания, вязкость и плотность полученных прекурсоров биодизеля независимо от времени экспозиции соответствовали требованиям европейского стандарта EN 14214 и межгосударственного стандарта ГОСТ 33131 – 2014.

В Главе 8 описываются технологии производства и применения биопрепарата «БИОТРИН» и биогеосорбента «ГЕОЛЕКС®».

Биопрепарат «БИОТРИН» – биотехнологический нетоксичный продукт, обладающий высокой деструктивной активностью в отношении нефти и НП. Биопрепарат «БИОТРИН» состоит из клеток бактерий *Pseudomonas yamanorum* VKM В-3033D, дрожжей *Rhodotorula glutinis* VKM Y-2998D, микроводорослей *Chlorella vulgaris* IPAS С-2024. Выпускается в форме жидкой суспензии светло-коричневого цвета с титром клеток – 10^{10} - 10^{12} КОЕ/мл. Срок годности 30 суток при температуре +5 – +7° С.

Биогеосорбент «ГЕОЛЕКС®» – биотехнологический нетоксичный самоутилизируемый продукт, обладающий высокой поглощающей способностью и деструктивной активностью в отношении нефти и НП. В состав биогеосорбента «ГЕОЛЕКС®» входит биопрепарат «БИОТРИН», клетки микроорганизмов которого иммобилизованы на глауконите. Биогеосорбент представляет собой сухой сыпучий препарат светло-зеленого цвета. Срок годности не менее 2 лет.

Согласно заключению по токсикологической оценке, биопрепарат «БИОТРИН» и биогеосорбент «ГЕОЛЕКС®» относятся к 4 классу опасности – вещества малоопасные.

Технологическая схема промышленного производства

биопрепарата «БИОТРИН» и биогеосорбента «ГЕОЛЕКС®»

На биопрепарат «БИОТРИН» и биогеосорбент «ГЕОЛЕКС®» имеется следующая техническая документация: технические условия (ТУ 39.00.11-001-24941753-2017), инструкция на применение биогеосорбента, технологические карты, паспорт безопасности, регламент полупромышленного получения.

Создана и внедрена технология полупромышленного производства на биопрепарат «БИОТРИН» и биогеосорбент «ГЕОЛЕКС®» в жидкой и сухой форме. Производитель: ООО «БИОЭКОБАЛАНС» (г. Сыктывкар). С 2016 г. было получено более 1 м³ биопрепарата «БИОТРИН» в виде суспензии и 3000 кг биогеосорбента «ГЕОЛЕКС®» в сухом виде.

Схема производства биопрепарата «БИОТРИН» и биогеосорбента «ГЕОЛЕКС®» представлена на рисунке 7.

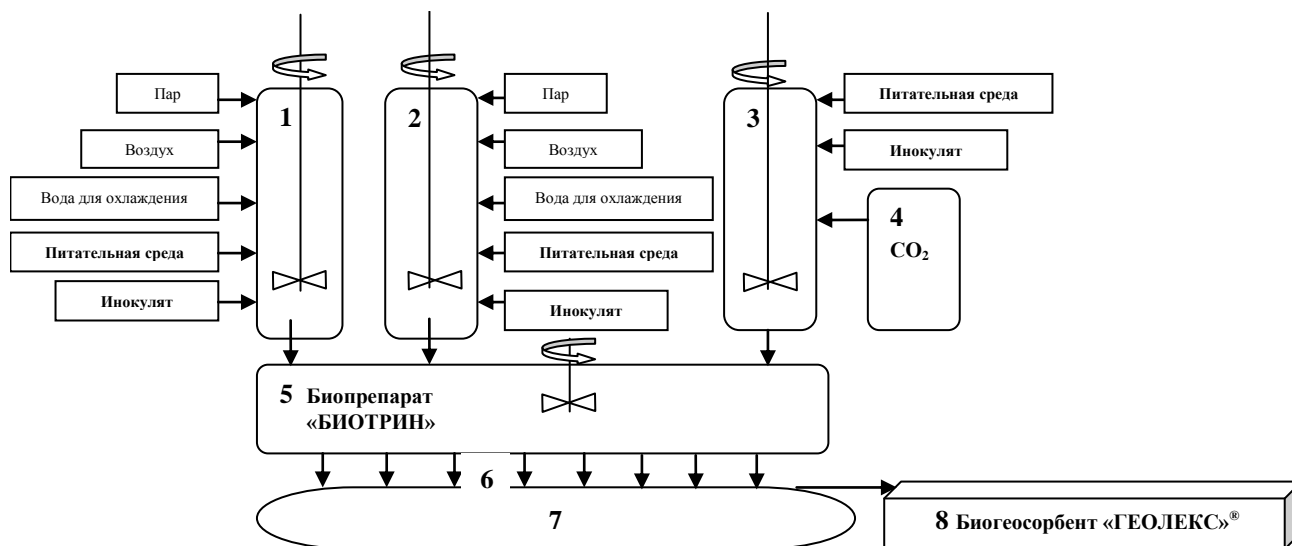


Рисунок 7 – Принципиальная технологическая схема полупромышленного производства биопрепарата «БИОТРИН» и биогеосорбента «ГЕОЛЕКС®». 1 – ферментер для производства биомассы бактерий *P. uataporum*; 2 – ферментер для производства биомассы дрожжей *R. glutinis*; 3 – хемостат для производства биомассы микроводорослей *C. vulgaris*; 4 – баллон с углекислотой; 5 – камера смешения; 6 – распылительные трубы; 7 – транспортерная лента; 8 – емкость фасовки биогеосорбента «ГЕОЛЕКС®».

Инокулят штамма бактерий *P. uataporum* объемом 100 мл из емкости подают в ферментер (1) со стерильной и охлажденной питательной средой МПА (4,5 дм³). Режим: естественное освещение, комнатная температура, аэрация, 3 суток. Концентрация клеток не менее 10¹² КОЕ/мл.

Инокулят штамма дрожжей *R. glutinis* объемом 100 мл из емкости подают в ферментер (2) со стерильной и охлажденной питательной средой Чапека (4,5 дм³). Режим: естественное освещение, комнатная температура, аэрация. 5 суток.

Концентрация клеток не менее 10^9 КОЕ/мл.

Инокулят микроводорослей *C.vulgaris* объемом 100 мл из емкости подают в стеклянный хемостат вместимостью 5 литров (3). Режим: фитоосвещение, комнатная температура, аэрация и насыщение CO₂. 3 суток. Концентрация клеток не менее 10^8 кл./мл.

Смешивание биомассы бактерий, дрожжей и, в частном случае, микроводорослей осуществляется в камере смешения (5) и далее по трубам (6) происходит разбрызгивание биопрепарата «БИОТРИН» на носитель – глауконит (минеральный ионит «Ionsorb™»), который подается транспортной лентой (7) насыпной плотностью не толще 1 см. После высушивания биогеосорбент поступает в емкость для фасовки. Биогеосорбент «ГЕОЛЕКС®» массой от 1 до 5 кг в мешки.

Технология применения биогеосорбента «ГЕОЛЕКС®». Способы внесения биогеосорбента в загрязненный нефтью и НП грунт, почву, воду как в сухом виде, так и в активированном, путем замачивания на сутки в воде с небольшим добавлением поллютанта. Биогеосорбент вносится и в вегетационный период и на снег и лед зимой в недоступных в летнее время загрязненных НП территориях (болотах, водоемах), а также для обработки в зимний период аварийных площадей, для локализации разливов, упрощения сбора разлитой нефти, блокировки распространения загрязнения при снеготаянии, предотвращения вторичного загрязнения. Глауконит является базой-транспортом микроорганизмов, сохраняет их в анабиозе в неблагоприятных условиях (температура, влажность и т.д.). В период таяния снега и льда происходит активация ферментных систем углеводородокисляющих микроорганизмов биогеосорбента, начинается их динамичный рост и размножение за счет наличия источника питания – НП, макро- и микроэлементов ионита. Вследствие интенсивного роста активности ферментов при повышении температуры, нефтедеструкция происходит в 2 раза активнее, чем при внесении биогеосорбента в середине вегетационного периода. Инструкция применения биогеосорбента «ГЕОЛЕКС®» представлена в технологических картах.

Подготовительные мероприятия технологии применения биогеосорбента «ГЕОЛЕКС®»: проектно-изыскательские работы, организация рекультивационных работ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В условиях Крайнего Севера при низких температурах почвы и короткого теплого сезона, все метаболические процессы, связанные с ростом и жизнедеятельностью биоты, протекают чрезвычайно медленно. Загрязненные углеводородами криогенные почвы характеризуются низким микробным разнообразием и высокоселективным таксономическим составом (Chong et al., 2018), что предопределяет очень низкие темпы самовосстановления. На сегодняшний день наиболее эффективными, экологически безопасными и предпочтительными для северных экосистем являются биологические методы (Rike et al., 2005). Особенности физико-химического состава почв, местного микробного сообщества диктуют необходимость планирования восстановительных мер индивидуально для каждого конкретного региона. Внесение аборигенных углеводородокисляющих микроорганизмов в загрязненные нефтью почвы во время восстановительных мероприятий снижает риск разрушения существующих в этих почвах микробных сообществ (Margesin, Schinner, 2001), что особенно важно для арктических регионов с холодным климатом (Primitz et al., 2021). Комплексное изучение ферментативной активности почв имеет большое теоретическое и практическое значение, поскольку позволяет оценить состояние почв в криолитической зоне до интенсивного техногенного вмешательства и после него, а также влияние методов биостимуляции и биоаугментации. Для выявления нефтяного загрязнения, как «свежего», так и «старого» нефтяного разлива, разработки эффективных методов очистки нарушенных земель, оценки качества принимаемых мер необходимо исследование направленности изменения ферментативной активности, потенциала ферментов-индикаторов качества почв.

Проведена комплексная оценка каталазной, дегидрогеназной, уреазной, фосфатазной, протеазной липазной, инвертазной сульфит- и сульфатредуктазной, нитратредуктазной активности фоновых, нефтезагрязненных почв и почв, подвергнутых рекультивационным мероприятиям в Усинском районе Республики Коми. В результате многолетних исследований выявлены закономерности соотношения содержания нефтепродуктов и наиболее информативных ферментов – каталазы, дегидрогеназы и уреазы и предложена локальная прогностическая модель для оценки состояния почв данного района по первичным данным ферментативной активности (рисунок 8).

Выявлена роль ферментов как индикатора потенциала нефтезагрязненных почв и нефтяных отходов для выделения микроорганизмов и дальнейшего получения высокоэффективных биологических продуктов.

Выделены и с помощью биохимических, фенотипических, хемотаксономических, биотехнологических методов исследования идентифицированы микроорганизмы-нефтедеструкторы, разработан альго-бактериально-дрожжевой консорциум и определены его свойства в свободной и иммобилизованной форме, значимые для экологической и энергетической биотехнологии.

Разработана теоретическая и практическая база для создания биопродуктов на основе углеводородокисляющих микроорганизмов для очистки окружающей среды в природно-климатических условиях Крайнего Севера и биоконверсии нефтеотходов в биотопливо, схема которой приведена на рисунке 8.

В ходе научно-исследовательской работы был выполнен целый комплекс практических задач: создан биопрепарат, биогеосорбент, проведена токсикологическая экспертиза, разработаны и утверждены технические условия, технологический регламент; биопродукты введены в производство; разработаны технологические карты и технология применения. Выпуск биопродуктов осуществляет ООО «БИОЭКОБАЛАНС» (г. Сыктывкар). С 2016 г. произведены 1 м³ биопрепарата «БИОТРИН» и 3000 кг биогеосорбента «ГЕОЛЕКС®», с помощью которых было очищено 45 га загрязненных почв.

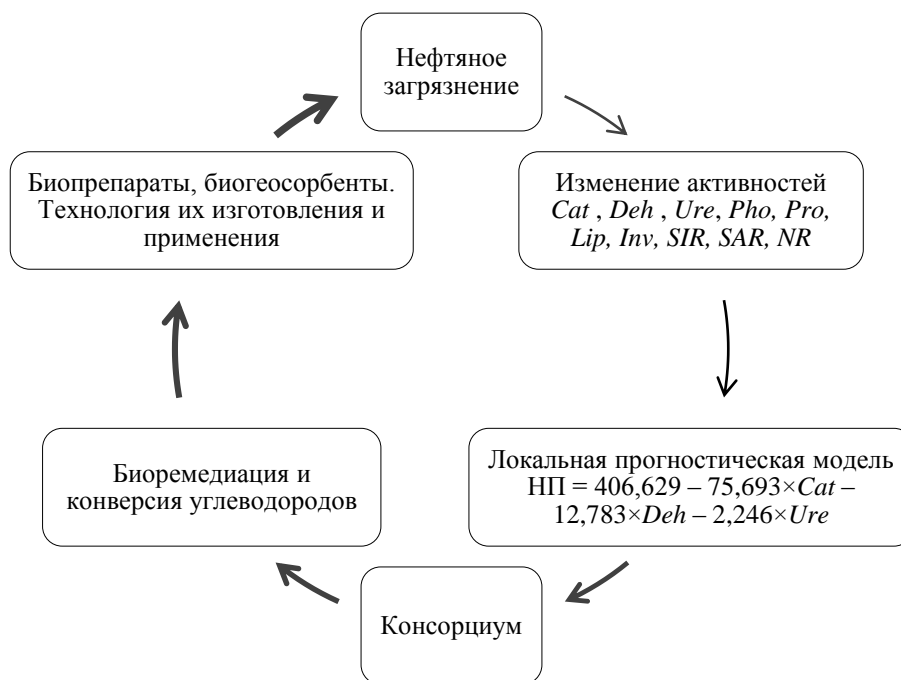


Рисунок 8 – Схема теоретической и практической базы создания биопродуктов на основе углеводородокисляющих микроорганизмов

ВЫВОДЫ

1. Выявлены индикаторы направленности процессов восстановления криогенных почв и потенциального источника микроорганизмов-нефтедеструкторов в условиях Крайнего Севера – каталазная, дегидрогеназная, уреазная активности.

2. Выделены и идентифицированы штаммы бактерий *Pseudomonas yamanorum* S1-09.15 (VKM В-3033D) и дрожжей *Rhodotorula glutinis* 2SR-14 (VKM Y-2998D) из сильнозагрязненных нефтепродуктами почв и грунтов с высокими каталазной (2,9 мл КМnO₄/ 1 г почвы), дегидрогеназной (48–87,3 мг формазана / 10 г почвы) и уреазной (42,7–55 мг N-NH₄/1 г почвы) активностью. Штаммы обладают высокой скоростью (3–4 суток) накопления биомассы – концентрация клеток 10⁸ КОЕ/мл, галотолерантны, образуют биологические поверхностно-активные вещества, стабильную эмульсию 93–100 %. Описаны свойства штаммов.

3. Оценена эффективность очистки почвы от нефти и нефтепродуктов при загрязнении 5–10 % после внесения штаммов монокультур. В модельных экспериментах с водой, загрязненной сырой нефтью, получена высокая степень очистки в течение трех суток, равная 69–72 % при исходном загрязнении 5 % по объему. Установлено, что при 10 % загрязнения по объему штамм *Pseudomonas yamanorum* в течение 14 суток окисляет от 37 % до 69 % углеводов, штамм *Rhodotorula glutinis* в течение 7 суток – 46 %. Показано, что трансформация полиаренов достигает 72 % от исходного количества.

4. Сконструирован нетоксичный нефтеокисляющий консорциум, включающий штаммы бактерий *Pseudomonas yamanorum* VKM В-3033D, дрожжей *Rhodotorula glutinis*, микроводорослей *Chlorella vulgaris*, проявляющий синергетический эффект. Консорциум разлагает до 96 % углеводов, до 80 % низкомолекулярных полиаренов (от флуорена до пирена) за 14 суток.

5. Установлено, что глауконитовый минерал, является оптимальным носителем пролонгированного действия, который обеспечивает клеткам консорциума повышение стрессоустойчивости, высокую степень биодеструкции нефти и нефтепродуктов (65–99 %), обладает хорошими показателями биоразлагаемости.

6. Доказана высокая эффективность очистки в опытно-промышленных испытаниях (от 89 % до 98 %) нефтезагрязненной сточной воды, почвы и щебеночного балласта с применением альго-бактериально-дрожжевого консорциума в свободной или иммобилизованной форме в континентальных климатических условиях Западной Сибири и Республики Коми. Установлено, что отход очистки щебеночного балласта – эмульгированная нефтепродуктами суспензия является вторичным сырьем для получения биодизеля с максимальным выходом 58 %.

Расчетные технические параметры биодизеля позволяют прогнозировать получение биотоплива, соответствующего требованиям межгосударственного стандарта ГОСТ 33131 – 2014.

7. Разработана нормативно-техническая документация на производство альго-бактериально-дрожжевого консорциума и биогеосорбента (биопрепарат «БИОТРИН», биогеосорбент «ГЕОЛЕКС[®]»), утверждена в Федеральном бюджетном учреждении «Государственный региональный центр стандартизации, метрологии и испытаний в Республике Коми». Разработана технология применения биопрепарата и биогеосорбента.

Рекомендации по использованию результатов работы

Разработанную локальную прогностическую модель зависимости ферментативной активности криоморфных почв от содержания в них нефтепродуктов рекомендуется применять в процессе дальнейшего мониторинга как данных почв, так и торфяных почв Усинского района Республики Коми для оценки их состояния по первичным показателям ферментативной активности.

Биопрепарат «БИОТРИН» и биогеосорбент «ГЕОЛЕКС[®]» рекомендованы для очистки почв, грунтов, водных поверхностей, щебеночного балласта от нефти и нефтепродуктов, биоконверсии нефтесодержащих отходов в биотопливо.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, индексируемых Web of Science, Scopus и ВАК

1. Киреева, Н. А. Ферментативная и микробиологическая активность загрязненных нефтью глееподзолистых почв на разных стадиях их восстановления / Н. А. Киреева, М. Ю. Маркарова, **Т. Н. Щемелинина**, Г. Ф. Рафикова // Вестник Башкирского университета. – 2006. – №4. – С. 57-60. **(ВАК)**, цит.: 9.
2. **Щемелинина, Т. Н.** Диагностирование степени загрязненности почв нефтью по показателям ферментативной активности / **Т. Н. Щемелинина**, Е. И. Новоселова, Н. А. Киреева, М. Ю. Маркарова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2007. – № 75. – С. 432-434. **(ВАК)**, цит.: 9.
3. Киреева, Н. А. Биологическая активность загрязненных нефтью и рекультивируемых торфяно-глеевых почв Республики Коми / Н. А. Киреева, Г. Ф. Рафикова, **Т. Н. Щемелинина**, М. Ю. Маркарова // Агрехимия. – 2008. – №8. – С. 68–75. **(ВАК)**, цит.: 10.
4. Киреева, Н. А. Оценка эффективности биоремедиации нефтезагрязненных почв с использованием биопрепарата Универсал / Н. А. Киреева, А. С. Григориади, **Т. Н. Щемелинина**, А. Р. Гареева, А. Б. Якупова // Вестник Оренбургского гос. университета. – 2009. – С. 454-455. **(ВАК)**.
5. **Щемелинина, Т. Н.** Влияние микробного и ферментного препаратов на очистку нефтезагрязненных почв / **Т. Н. Щемелинина**, М. Ю. Маркарова, Е. М. Анчугова, С. М. Надежкин, Л. Г. Емельянова. // Изв. Самарского НЦ РАН. – 2013. – Т. 15. – № 3(6). – С. 2035-2039. **(ВАК)**.
6. Мелехина, Е. Н. Восстановительные сукцессии биоты в торфяной почве с нефтяным загрязнением при различных методах биологической рекультивации / Е. Н. Мелехина, М. Ю. Маркарова, **Щемелинина Т.Н.**, Е. М. Анчугова, В. В. Канев // Почвоведение. 2015. № 6. С. 740-750. DOI: 10.7868/S0032180X15060076 **(WoS/Scopus)**, цит.: 22.
7. Anchugova, E. M. Approaches to the assessment of the efficiency of remediation of oil-polluted soils / E. M. Anchugova, E. N. Melekhina, M. Yu. Markarova, **T. N. Shchemelinina** // Eurasian Soil Science. – 2016. – Vol. 49. – No. 2. – P. 234–237. DOI: 10.1134/S1064229316020022 **(WoS, IF=1.374)**, цит.: 13.
8. **Shchemelinina, T. N.** Microfungal strains—potential lipid producers for biodiesel / **T. N. Shchemelinina**, N. V. Matistov, V. A. Kovaleva, M. Yu. Markarova, I. V. Gruzdev, V. V. Volodin, E. M. Anchugova // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2017. – V. 53. – P. 441–447. DOI: 10.1134/S0003683817040135 **(WoS, IF=1.065)**. Цит.: 5.

9. Tarabukin, D. V. Biosorbents based on esterified starch carrying immobilized oil-degrading microorganisms / D. V. Tarabukin, M. A. Torlopov, **T. N. Shchemelinina**, E. M. Anchugova, N. N. Shergina, E. I. Istomina, V. A. Belyy // Journal of Biotechnology. – 2017. Vol. 260. – P. 31-37. DOI:[10.1016/j.jbiotec.2017.08.024](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.08.024) (**WoS, IF=3.595**), **цит.: 11**.
10. **Shchemelinina, T. N.** Bioconversion of oil sludge into biomass of lipid metabolites for use as a source of biofuel / **T. N. Shchemelinina**, N. V. Matistov, M. Yu. Markarova, E. M. Anchugova // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 107 (2018) 012074 DOI:[10.1088/1755-1315/107/1/012074](https://doi.org/10.1088/1755-1315/107/1/012074) (**Scopus, SJR=0.202**).
11. **Shchemelinina, T. N.** Clay- and zeolite-based biogeosorbents: modelling and properties / **T. N. Shchemelinina**, L. A. Gömze, O. B. Kotova, J. E. F. M. Ibrahim, D. A. Shushkov, M. Harja, G. V. Ignatiev, E. M. Anchugova // Épitóanyag – Journal of Silicate Based and Composite Materials. – 2019. – Vol. 71. – No. 4. – P. 131–137. DOI:[10.14382/epitoanyag-jsbcm.2019.23](https://doi.org/10.14382/epitoanyag-jsbcm.2019.23) (**WoS/Scopus**), **цит.: 13**.
12. **Shchemelinina, T. N.** Modeling of the contour water flooding technology in microcosms / T. N. Shchemelinina, E. M. Anchugova, E. M. Lapteva, R. S. Vasilevich, M. Yu. Markarova, E. N. Glazacheva, M. V. Uspenskaya // Eurasian Soil Science. – 2020. – V. 53. – P. 230–239. DOI:[10.31857/S0032180X20020112](https://doi.org/10.31857/S0032180X20020112) (**WoS, IF=1.374**), **цит.: 7**.
13. **Shchemelinina, T. N.** The analcime-bearing rock immobilized microalgae: stress resistance, psychrotolerance, phenol removal / **T. N. Shchemelinina**, E. M. Anchugova, O. B. Kotova, D. A. Shushkov // Bioresource Technology. 2021. – V. 322. – 124560. DOI:[10.1016/j.biortech.2020.124560](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124560) (**WoS, IF=11.889**). **цит.: 8**.
14. **Shchemelinina, T. N.** Petroleum sludge as a feedstock for the microbial biodiesel production: emerging prospects / **T. N. Shchemelinina**, E. M. Anchugova, M. Yu. Markarova, K. G. Ufimtsev, I. V. Beshley // Waste and Biomass Valorization. – 2023. – V. – 14. – P. 903–913. DOI:[10.1007/s12649-022-01894-8](https://doi.org/10.1007/s12649-022-01894-8) (**WoS, IF=3.449**).
15. **Щемелинина Т. Н.** Комплексная биотехнология очистки нефтезагрязнённой почвы / **Т. Н. Щемелинина**, Е. М. Анчугова // Поволжский экологический журнал. – 2023. – № 2. – С. 246-256. <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2023-2-246-256> (**ВАК, Scopus**).

Монографии

16. Барсегян, А. Г. Экологическое нормирование и управление качеством почв и земель: монография / А. Г. Барсегян, В. М. Гендугов, Г. П. Глазунов, В. С. Горбатов, А. С. Горленко, Е. Л. Воробейчик, М. В. Евдокимова, Л. П. Капелькина, Е. И. Ковалева, Н. А. Кузнецова, Н. Н. Левицкая, О. А. Макаров, М. Ю. Маркарова, И. А. Мартыненко, О. Е. Медведева, С. М. Надежкин, И. О. Плеханова, Л. С. Пономарева, Т. В. Прокофьева, Т. В. Решетина, Т. М. Самухина, А. П. Сизов, А. В. Смагин, В. А.

Терехова, Р. П. Титарев, С. Я. Трофимов, А. С. Фрид, А. А. Чендева, Т. В. Черненькова, **Т.Н. Щемелинина**, А. С. Яковлев; под общ. ред. С. А. Шобы, А. С. Яковлева, Н. Г. Рыбальского. – Москва: НИА-Природа, 2013. – 310 с. **цит.:** 35.

Статьи, опубликованные в прочих изданиях

17. **Щемелинина, Т. Н.** Новые тренды в механизмах повышения производительности материалов на минеральной основе / **Т. Н. Щемелинина**, О. Б. Котова, М. Хария, Е. М. Анчугова, И. Пеловский, И. Кретеску // Вестник ИГ Коми НЦ УрО РАН. – 2017. – №6. – С.40-42.
18. **Щемелинина, Т. Н.** Цеолитовое и глинистое сырье: экспериментальное моделирование биогеосорбентов / **Т. Н. Щемелинина**, О. Б. Котова, Е. М. Анчугова, Д. А. Шушков, Г. В. Игнатьев // Вестник ИГ Коми НЦ УрО РАН. – 2018. – № 9. – С. 50-57.
19. **Shchemelinina, T. N.** Why mineral carriers are needed for microalgae / **T. N. Shchemelinina**, E. M. Anchugova, O. B. Kotova, S. SUN, D. A. Shushkov, A. V. Gogonin, N. V. Likhanova, O. M. Zueva, Yu. S. Korchagina // Vestnik of Geosciences. – 2020. – No. 2. – P. 25-29.

Патенты

20. **Патент РФ 2556126**, МПК С12N 1/12. Питательная среда Люка для культивирования микроводорослей [Текст] / Михайлюк А. В., Щемелинина Т. Н., Анчугова Е. М. ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук. – № 2014100232/10 ; заявл. 09.01.2014. ; опубл. 10.07.2015, Бюл. **цит.:** 3.
21. **Патент РФ 2615458**, С12N 1/20, С02F 3/34, С02F 101/32, В09С 1/10, С12R 1/38. Штамм бактерий *Pseudomonas yamanogum* ВКМ В-3033D для активизации биодеструкции нефти и нефтепродуктов в воде, а также в масляных грунтах на участках железной дороги [Текст] / Мешкело С. М., **Щемелинина Т. Н.**, Анчугова Е. М., Маркарова М. Ю., Желудкова С. В. ; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью "БИОЭКОБАЛАНС". – № 2016139425 ; заявл. 08.10.2016. ; опубл. 4.04.2017, Бюл. № 10. – 6 с. **цит.:** 4.
22. **Патент РФ 2658134**, МПК С12N 1/16, С12N 1/26, С02F 3/34, В09С 1/10, СПК С12N 1/16, С12N 1/26, С02F 3/34, В09С 1/10. Штамм дрожжей *Rhodotorula glutinis* для очистки нефтезагрязненных почв, водоемов и сточных вод от нефтяных углеводородов, в том числе для окисления полиароматических соединений [Текст] / Мешкело С. М., **Щемелинина Т. Н.**, Маркарова М. Ю., Анчугова Е. М. ; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью

"БИОЭКОБАЛАНС". – № 2016126521 ; заявл. 02.07.2016. ; опубл. 20.06.2018, Бюл. № 17. – 5 с. **цит.: 1.**

23. **Патент РФ 2703499**, МПК C12N 1/12, C02F 3/34, C12R 1/89, СПК C12N 1/12, C02F 3/34, C12R 1/89. Штамм микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer. f. *globosa* V. Andr. для очистки природных водоемов и сточных вод промышленных предприятий [Текст] / **Щемелинина Т. Н.**, Анчугова Е. М., Гогонин А. В., Тарабукин Д. В., Шапенков Д. М. ; заявитель и патентообладатель Щемелинина Татьяна Николаевна, Анчугова Елена Михайловна, Гогонин Александр Владимирович, Тарабукин Дмитрий Валерьянович, Шапенков Данила Михайлович. – № 2018120704 ; заявл. 05.06.2018. ; опубл. 17.10.2019, Бюл. № 29. – 9 с. ил.

24. **Патент РФ 2774314**, МПК C12N 1/12, C12R 1/89, СПК C12N 1/12. Способ культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer. f. *globosa* V. Andr. IPAS C-2024 в природных условиях с использованием воды из пруда [Текст] / Турьева М.М., Лужикова С.А., Вальковец О.А., Лиханова Н.В., Щемелинина Т.Н. ; заявитель и патентообладатель Турьева Мария Максимовна, Лужикова Светлана Алексеевна, Вальковец Ольга Александровна, Лиханова Надежда Владимировна, Щемелинина Татьяна Николаевна. – № 2021106546 ; заявл. 14.03.2021. ; опубл. 17.06.2022, Бюл. № 17. – 6 с.

25. **Патент РФ 2703500**, МПК C12N 1/26, C02F 3/34, B09C 1/10, C02F 101/32, C12R 1/38, C12R 1/89, СПК C12N 1/26, C02F 3/34, B09C 1/10, C12R 1/38, C12R 1/89. Нефтеокисляющий биопрепарат, биосорбент на его основе и способ его приготовления [Текст] / **Щемелинина Т. Н.**, Анчугова Е. М. ; заявитель и патентообладатель Щемелинина Татьяна Николаевна, Анчугова Елена Михайловна. – № 2018120922; заявл. 06.06.2018. ; опубл. 17.10.2019, Бюл. № 29. – 14 с. ил. **цит.: 1.**

26. **Патент РФ 2707815**, МПК C12N 1/12, B09C 1/10, C12R 1/89, СПК C12N 1/12, B09C 1/10, C12R 1/89. Средство для биодеструкции нефтепродуктов в загрязненных почвах [Текст] / Щемелинина Т.Н., Корчагина Ю.С., Анчугова Е.М. ; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью "БИОЭКОБАЛАНС", Общество с ограниченной ответственностью "Основа". – № 2019114494, ; заявл. 14.05.2019. ; опубл. 29.11.2019, Бюл. № 14. – 11 с. ил.

27. **Патент РФ 2711162**, МПК E01B 27/06, B08B 3/08, СПК E01B 27/06, B08B 3/08. Способ очистки отходов щебневого балласта, применяемого на железной дороге [Текст] / Некрасова В. Н., Щемелинина Т. Н., Анчугова Е. М. ; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью

"БИОЭКОБАЛАНС". – № 2019102645 ; заявл. 30.01.2019. ; опубл. 15.01.2020, Бюл. № 2. – 10 с. **цит.: 1.**

28. **Патент РФ 2764305**, МПК В09С 1/10, С12N 1/20, СПК В09С 1/10, С12N 1/20. Способ очистки почв от нефтяных загрязнений методом гидропосева биосмеси с применением микроводорослей *Chlorella vulgaris globosa* IPPAS С-2024 [Текст] / Корчагина Ю.С., Щемелинина Т.Н. ; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью "ЭкоАльянс", Общество с ограниченной ответственностью "БИОЭКОБАЛАНС". – № 2021101265 ; заявл. 22.01.2021. ; опубл. 17.01.2022, Бюл. № 2. – 7 с.

Избранные тезисы докладов и материалов конференций

29. Киреева, Н. А. Мониторинг ремедиации нефтезагрязненных почв Республики Коми по ферментативной активности / Н. А. Киреева, М. Ю. Маркарова, **Т. Н. Щемелинина** // Материалы докладов Международной научной конференции «Экология и биология почв: проблемы диагностики и индикации». – Ростов-на-Дону: Ростиздат, 2006. – С.250-252.

30. **Щемелинина, Т. Н.** Активность некоторых ферментов как индикаторов процесса биodeградации нефти в почве / **Т. Н. Щемелинина**, Е. М. Анчугова // Материалы докладов тринадцатой Молодежной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии». – Сыктывкар, 2006. – С. 282-285.

31. **Щемелинина, Т. Н.** Влияние источника углеродного питания на интенсивность продуцирования ферментов нефтеокисления алканотрофными микроорганизмами / **Т. Н. Щемелинина**, Е. М. Анчугова // Материалы докладов четырнадцатой Молодежной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии». – Сыктывкар, 2007. – С.299-301.

32. **Щемелинина, Т. Н.** Ферментативная активность фоновых и загрязненных нефтью торфяно-глеевых почв Усинского района Республики Коми / **Т. Н. Щемелинина**, М. Ю. Маркарова, Е. М. Анчугова, И. Э. Шарапова, Н. А. Киреева // Материалы докладов V Всероссийской научной конференции с международным участием «Отражение биогео-антропосферных взаимодействий в почвах и почвенном покрове». – Томск, 2010. – С. 264-267.

33. Мелехина, Е. Н. Долговременный комплексный мониторинг восстановительных сукцессий почвенной биоты в загрязненных нефтью экосистемах Крайней северной тайги / Е. Н. Мелехина, М. Ю. Маркарова, **Т. Н. Щемелинина**, Е. М. Анчугова, В. А. Канев // Материалы докладов X Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем». – Киров, 2012. – С. 115-116.

34. **Щемелинина, Т. Н.** Влияние биопрепаратов на ферментативную активность в нефтезагрязненной почве / **Т. Н. Щемелинина**, М. Ю. Маркарова, Е. М. Анчугова, Е. Н. Мелехина // *Материалы докладов III Международной научно-практической конференции North Charleston «Фундаментальная наука и технологии - перспективные разработки».* – USA, 2014. – Т.1. – С. 16-18.
35. **Щемелинина, Т. Н.** Оценка методов рекультивации нефтезагрязненных почв по сводным индексам / **Т. Н. Щемелинина**, Е. М. Анчугова, М. Ю. Маркарова, Е. Н. Мелехина // *Материалы докладов Всероссийской конференции с международным участием «Биотехнология – от науки к практике».* – Уфа, 2014. – Т.1. – С. 61-64.
36. **Щемелинина, Т. Н.** Оценка влияния микробного и ферментного препаратов на очистку почв от нефтепродуктов по среднему геометрическому показателю ферментативной активности (GMea) / **Т. Н. Щемелинина**, М. Ю. Маркарова, Д. В. Тарабукин, Е. Н. Мелехина // *Материалы докладов Всероссийской научно-практической конференции, посвящено 15-летию кафедры экологии СурГУ «Экология и природопользование в Югре».* – Сургут, 2014. – С.101-102.
37. Anchugova, E.M. Biofilter for treatment of oily water effluents / E. M. Anchugova, M. Yu. Markarova, D. V. Tarabukin, V. V. Volodin, **T. N. Shchemelinina** // *Nano, Bio and Green – technologies for sustainable future*: proceedings of The 16 international multidisciplinary scientific geoconference SGEM 2016. – Albena, Bulgaria, 2016. – Vol. I. – P. 451 – 457.
38. **Щемелинина, Т. Н.** Утилизация нефтяных шламов с применением микроорганизмов в биомассу липидных метаболитов, используемых в качестве источника биотоплива / **Т. Н. Щемелинина**, Е. М. Анчугова, Н. В. Матистов, М. Ю. Маркарова // *Труды III Международной конференции «Окружающая среда и устойчивое развитие регионов: Экологические вызовы XXI века».* – Казань: Изд-во АН РТ, 2017. – С. 499-502.
39. **Shchemelinina, T.** Biogeo sorbents for Solving Ecological Problems / **T. Shchemelinina**, O. Kotova, M. Harja, E. Anchugova // *5th International Conference on Competitive Materials and Technology Processes.* – Miskolc-Lillafüred, Hungary, 2018. – P. 199.
40. **Щемелинина, Т. Н.** Биопрепарат «БИОТРИН» и биогеосорбент «ГЕОЛЕКС» для очистки грунтов железнодорожного полотна / **Т. Н. Щемелинина**, Е. М. Анчугова // *Материалы докладов Международной научной экологической конференции «Отходы, причины их образования и перспективы использования».* – Краснодар : КубГАУ, 2019. – С.353-355.
41. **Щемелинина, Т. Н.** Биопрепарат «БИОТРИН» и биогеосорбент «ГЕОЛЕКС»:

- от идеи до внедрения / **Т. Н. Щемелинина**, Е. М. Анчугова // Материалы докладов Международной научно-практической конференции в рамках III Республиканского форума, посвященного Дню Интеллектуальной собственности «Интеллектуальная собственность – будущее Республики Коми». – Сыктывкар, 2019. – С. 422-428.
42. **Shchemelinina, T.** Experimental Modeling of Biogeosorbents / **T. Shchemelinina**, O. Kotova, E. Anchugova, D. Shushkov, G. Ignatyev, M. Markarova // 14th International Congress for Applied Mineralogy (ICAM2019), 2019. – P. 281-285.
43. **Щемелинина, Т. Н.** Биогeосорбент «ГЕОЛЕКС» в очистке нефтезагрязненных почв / **Т. Н. Щемелинина**, Е. М. Анчугова. // Материалы докладов VI Всероссийской конференции с международным участием. – Уфа, 2019. – С. 349-353.
44. **Щемелинина, Т. Н.** Нефтеокисляющей биогeосорбент «ГЕОЛЕКС» / **Т. Н. Щемелинина**, Е. М. Анчугова // Материалы докладов II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Утилизация отходов производства и потребления: инновационные подходы и технологии». – Киров: ВятГУ, 2020. – С.317-320.