

## ТЕХНОЛОГІЇ ЗАХИСТУ ДОВКІЛЛЯ

УДК 502/504

DOI: 10.31471/2415-3184-2021-1(23)-73-83

*І. Ю. Аблєєва, Л. Д. Пляцук,**І. О. Трунова, О. М. Яхненко,**І. О. Бережна**Сумський державний університет*

### ВПЛИВ БІОСТИМУЛЯТОРІВ НА МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ СТАН НАФТОЗАБРУДНЕНИХ ҐРУНТІВ

Застосування науково обґрунтованих підходів до інтенсифікації природних процесів самоочищення ґрунтів від нафтопродуктів набувають все більшого значення. Біоочищення є ефективним, екологічно доцільним методом поліпшення стану середовища. Мета статті полягає у встановленні закономірностей зміни санітарно-мікробіологічного стану ґрунту після забруднення нафтою та визначення ефективних підходів до інтенсифікації природних процесів самоочищення ґрунтів.

У роботі було проведено санітарно-бактеріологічне дослідження нафтозабрудненого ґрунту за санітарно-показовими мікроорганізмами; оцінений санітарно-мікробіологічний стан досліджуваних зразків ґрунту для ідентифікації якісних змін еколого-трофічних груп мікроорганізмів; обґрунтовано ефективність застосування біостимуляторів для інтенсифікації природних процесів самоочищення нафтозабруднених ґрунтів.

Для проведення мікробіологічних досліджень використовували методи посівів на поживні середовища, оцінку ступеня забруднення ґрунту проводили шляхом визначення загального мікробного числа й кількісного аналізу основних індикаторних мікроорганізмів.

Визначено, що зразки ґрунту після надходження нафти є сильно забрудненими за санітарно-бактеріологічними показниками. Для стимулювання розвитку певних груп біотрансформаторів ефективним є внесення спеціальних сорбентів, що містять спектр речовин, необхідних для прискорення росту мікроорганізмів-деструкторів нафти. Виявлено, що використання дигестату біогазових установок як біостимулятора дозволяє покращити фізичні і водно-повітряні властивості ґрунту, та виступає ефективним біостимулятором для підвищення біологічної активності мікроорганізмів за рахунок вмісту макроелементів.

**Ключові слова:** біоочищення, біостимуляція, дигестат, забруднення ґрунту, нафтопродукти, санітарно-мікробіологічна оцінка.

**Постановка проблеми.** Забруднення ґрунтів нафтою та нафтопродуктами (НП) є досить актуальною екологічною проблемою не лише для зони нафтовидобувних та нафтопереробних об'єктів, а й для урбосистем у цілому. Тому вибір методу очищення та оцінка санітарного стану ґрунту вимагають науково обґрунтованого підходу. Ліквідація наслідків розливів нафти часто приводить до необоротного знищення родючого шару ґрунту, наприклад, під час спалювання нафти, або призводить до вторинного забруднення у разі засипки забруднених ділянок піском, ґрунтом, вивезення забрудненого ґрунту у відвали [1]. Крім того, такі технології є затратними в економічному плані і можуть вважатися ефективними тільки за відносно невеликого ступеню забруднення ґрунту НП до 1%.

Обґрунтування методу очищення ґрунту від нафти залежить від кількості і складу нафтопродуктів, ландшафтно-географічних характеристик ділянки, доступності засобів для ліквідації забруднення. З екологічної точки зору більш ефективними є біотехнологічні методи, що ґрунтуються на біогеохімічній ролі природних деструкторів в екосистемі. У такому разі для очищення природних об'єктів, техногенних нафтовмісних стічних вод промислових підприємств

чи поверхонь нафтозабруднених резервуарів використовують природні штами мікроорганізмів, які за рахунок власного метаболізму чи продукування біосурфактантів сприяють поступовому розкладанню НП до менш шкідливих сполук з нижчою молекулярною масою, а потім і до повної їх мінералізації до вуглекислого газу та води.

Потрапляння НП до ґрунту впливає на весь комплекс морфологічних, фізичних, фізико-хімічних та біологічних властивостей ґрунту. Внаслідок нафтового забруднення ґрунт втрачає здатність вбирати й утримувати вологу, має більш низькі значення водопроникності, вологоємності, змінений склад ґрунтового поглинального комплексу та зменшену кількість обмінних катіонів [2], що негативно впливає на протікання природних процесів за участі ґрунтової мікробіоти. Нафтове забруднення ґрунту супроводжується закономірними змінами еколого-трофічних груп мікроорганізмів, у результаті чого виникають конкурентні відносини в угрупованні, які характеризуються такими взаємодіями: для низького і середнього рівня забруднення – конкуренція за типом нестійкої рівноваги; для високого рівня забруднення – облігатне заміщення [3].

Однак ефективне застосування біоремедіаційних підходів до очищення ґрунтів від нафти потребує більш детального вивчення природи процесів та змін у мікробіологічному, зокрема санітарно-бактеріологічному стані ґрунту, що дозволить інтенсифікувати природне самоочищення, а, отже, і вирішить важливу наукову-прикладну проблему у галузі екологічної безпеки нафтогазового комплексу.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Токсична дія НП на мікроорганізми збільшується у послідовності: парафіни, циклопарафіни, ароматичні нафтопродукти. НП, що містять переважно важкі вуглеводні, в силу своєї високої щільності і в'язкості створюють анаеробні умови в ґрунті, перешкоджаючи тим самим нормальному протіканню окиснювальних реакцій. У результаті зміни чисельності мікроорганізмів й активності ферментів змінюється і швидкість емісії CO<sub>2</sub>. Дослідження показали, що в результаті забруднення ґрунту нафтою і НП спостерігається зростання інтенсивності базального дихання ґрунту, *тобто без збагачення доступними джерелами енергії*, за рахунок збільшення вмісту доступного для мікробіоти органічного вуглецю. Збільшення вмісту забруднювача в ґрунті призводить до зниження інтенсивності дихання [4].

Зниження концентрації кисню у ґрунті сприяє розвитку анаеробних мікроорганізмів. Однією з причин анаеробіозиса може бути інтенсивне споживання кисню зростаючою на початку кількістю аеробних мікроорганізмів, що окиснюють вуглеводні. У свіжозабруднених ґрунтах чисельність ґрунтових мікроорганізмів найчастіше досить висока з переважанням амоніфікаторів та бактерій, що окиснюють вуглеводні, зокрема бактерії родів *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium* [5]. На тлі стимуляції розвитку вуглеводнеокиснювачів відбувається пригнічення гетеротрофної мікробіоти, а за високих концентрацій нафти відзначено зниження розвитку обох груп мікроорганізмів. На більш пізніх термінах після забруднення збільшується чисельність оліготрофної мікрофлори, олігонітрофілів і мікроорганізмів, що руйнують целюлозу [6].

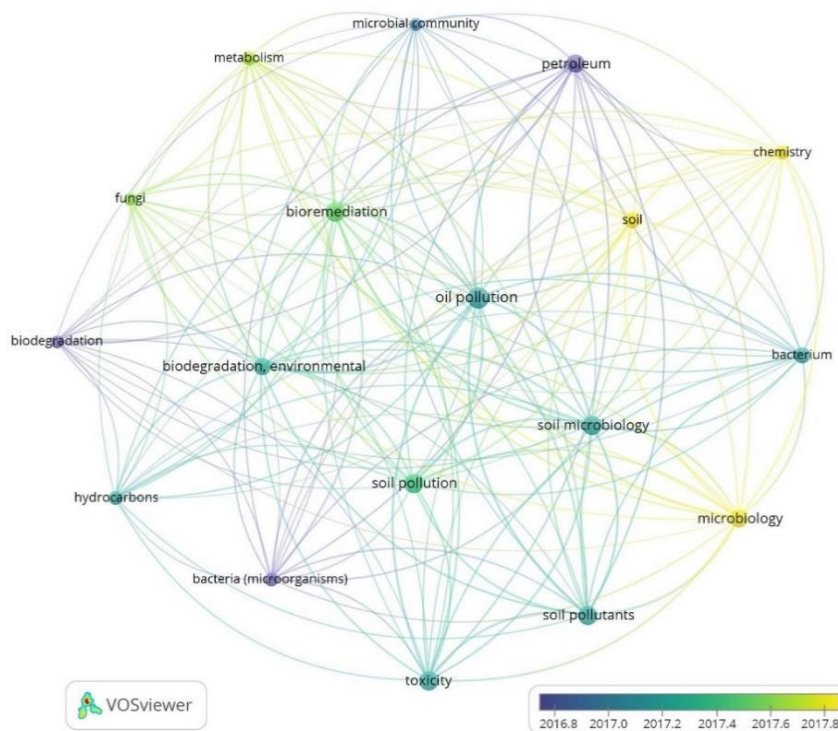
Найбільш чутливими до дії нафти є нітрифікуючі бактерії, а чисельність й активність мікроорганізмів, що беруть участь у процесі азотфіксації, амоніфікації і денітрифікації, навпаки збільшується. Інгібуючи або активізуючи дію ґрунтової мікробіоти, НП впливають ще на два важливих показники біологічної активності ґрунту – ферментативну активність й інтенсивність виділення CO<sub>2</sub>. Потрапляючи в ґрунт нафта і НП можуть впливати на активність ферментів, що дає можливість використовувати ці показники поряд з інтенсивністю емісії CO<sub>2</sub>, як діагностичну ознаку забруднення ґрунту НП.

Ферментативна активність ґрунтів обумовлюється як різною кількістю мікроорганізмів, так і їх різноманітністю і фізіологічною активністю. Мікробіологічну деградацію нафти обумовлюють два чинники: наявність складних ферментів – оксидоредуктаз, що здійснюють окисно-відновні процеси всіх типів, і наявність в клітинах мікроорганізмів пристосувань, що забезпечують поглинання гідрофобного субстрату. Деякі штами мікроорганізмів здатні продукувати біосурфактанти, які повинні бути високомолекулярними біоемulgаторами, такими як позаклітинний біоповітряний ліпополісахарид, вироблений *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter radioresistens* KA53 [7]. Штами *Pseudomonas aeruginosa*, що виробляють біоповітряні речовини з найкращими фізико-хімічними властивостями, антимікробною та антиадгезивною активністю, здатні руйнувати сиру нафту навіть за умов засоленості [8, 9].

Дослідження, проведені різними авторами, показують, що активність багатьох ґрунтових ферментів зростає до певного рівня концентрації вуглеводнів у ґрунті, а після його перевищення відзначено зниження. Активність мікробіологічних процесів, що протікають в ґрунті, характеризується активністю ферментів дегідрогенази і каталази. Каталаза прискорює окиснення вуглеводнів, руйнуючи перекис водню, що утворюється у процесі життєдіяльності мікроорганізмів до необхідного для цієї реакції кисню, а дегідрогеназа каталізує реакцію дегідрування – відщеплення водню від вуглеводнів і продуктів їх розкладання. Парафінові і циклопарафінові вуглеводні активізують, а ароматичні вуглеводні інгібують активність уреаз, амілази, інвертази, ксиланази, целюлази, фосфатази, каталази і дегідрогенази [10].

Не існує жодного виду мікроорганізмів, здатного деградувати всі компоненти сирової нафти, а її повне розкладання вимагає участі консорціуму мікроорганізмів-деструкторів різних таксономічних груп. Біоочищення проходить як тривалий багатостадійний процес, в який поступово включаються різноманітні мікробні угруповання деструкторів карбонових сполук, при чому протікання у часі всього процесу та окремих стадій, домінування тих чи інших штамів мікроорганізмів визначається природно-кліматичними умовами і типом ґрунтів. Під час проведення біоремедіації нафтозабруднених ґрунтів одним із найбільш ефективних підходів є застосування біостимуляції, оскільки внесення органічних та/або неорганічних речовин (зазвичай добрив чи відходів) забезпечує нормалізацію фізико-хімічних та біологічних властивостей ґрунту, зокрема покращення водного й NPK режимів. Результати останніх досліджень стосовно цієї проблеми висвітлені у працях відомих закордонних учених [11–15].

На підставі проведеного аналізу стає очевидним, що більшість досліджень пов'язана із змінами еколого-трофічних груп мікроорганізмів після забруднення ґрунту нафтою, ферментативною активністю ґрунту та ідентифікацією бактерій і грибів, які володіють окиснювальною здатністю по відношенню до НП. Однак, поза увагою вітчизняних та закордонних учених залишається питання дослідження санітарно-бактеріологічного стану нафтозабруднених ґрунтів. Пошук публікацій за останні сім років у виданнях, які індексуються міжнародними наукометричними базами даних Scopus та Web of Science Core Collection, за такими кодами дав результати: “soil oil pollution AND sanitary AND microbial” – 0, “soil oil pollution AND sanitary” – 3, “soil oil pollution AND toxicity AND microbial” – 15. Бібліометрична мережа щодо спорідненості та відповідності ключових слів за останнім кодом, побудована та візуалізована за допомогою програмного інструменту VOSviewer (версія 1.6.15), засвідчує опосередкованість досліджень за цією проблематикою (рис. 1).



**Рис. 1. Мережа зустрічальності найбільш часто використовуваних ключових слів (частота >5)**

Таким чином, не вирішеними залишаються питання оцінки динаміки санітарно-мікробіологічного стану нафтозабруднених ґрунтів як індикатора змін ґрунтових еколого-трофічних груп мікроорганізмів. З позицій екологічної безпеки актуальним завданням є застосування науково обґрунтованих підходів до інтенсифікації природних процесів самоочищення ґрунтів. Підвищенню ефективності очищення сприяє внесення на спеціальних сорбентах комплексу штамів мікроорганізмів, між якими виникають симбіотичні взаємодії на основі використання метаболітів одних як субстрату для інших.

**Постановка завдання.** Метою статті є встановлення закономірностей зміни санітарно-мікробіологічного стану ґрунту після забруднення нафтою та визначення ефективних підходів до інтенсифікації природних процесів самоочищення ґрунтів.

Для досягнення зазначеної мети поставлено такі завдання дослідження:

- провести санітарно-бактеріологічні дослідження нафтозабрудненого ґрунту за санітарно-показовими мікроорганізмами;
- оцінити санітарно-мікробіологічний стан досліджуваних зразків ґрунту, який ідентифікує якісні зміни еколого-трофічних груп мікроорганізмів;
- обґрунтувати ефективність застосування біостимуляторів для інтенсифікації природних процесів самоочищення нафтозабруднених ґрунтів.

**Методика проведення експерименту.** Санітарно-показовими мікроорганізмами ґрунту є бактерії групи кишкової палички, ентерококи, *Clostridium perfringens* і термофільні мікроби. За умови повного аналізу встановлюють такі показники: загальну кількість мікробів (ЗМЧ), число бактерій групи кишкових паличок (титр БГКП), титри ентерококів, *C. perfringens* і термофільних мікроорганізмів, загальне число і процент спор, кількість актиноміцетів, грибів, аеробних целюлозних і амоніфікуючих бактерій. До категорії БГКП належать бактерії родини *Enterobacteriaceae*, що об'єднує роди *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*. Це грамнегативні, безспорові, оксидазонегативні палички, які ферментують глюкозу і лактозу до кислоти й газу за температури 37°C.

Дослідженню підлягали 3 зразки ґрунту: №№ 1, 2 – ґрунт, забруднений НП, до внесення біодеструктора; № 3 – через 21 добу після внесення біопрепарату «Еконадін». Відбір проб ґрунту проводили у 5 точках забрудненої нафтопродуктами ділянки на глибині 10 см. У стерильну банку брали по 200 г із кожної точки, змішували, відбирали наважку в 30 г і вносили у колбу, що містила 300 см<sup>3</sup> стерильної води. Суміш ретельно збовтували протягом 10 хв, потім відстоювали 2–3 хв для осідання грубих частинок. Досліджувані показники визначали за різними методиками (табл. 1).

Таблиця 1

#### Методики проведення санітарно-бактеріологічних досліджень

Показник	Назва методики, що застосовувалася
ЗМЧ	Посів ґрунтової суспензії на МПА глибинним методом
Титр БГКП	Прямий посів ґрунтової бовтушки на середовище Ендо та на середовище Кеслера
Перфрінгенс-титр	Посів ґрунтової суспензії на середовище Вільсона-Блера
Кількість термофільних бактерій в 1 г	Поверхневий посів на МПА
Плісневі гриби	Прямий посів ґрунтової суспензії на середовище Сабуро

Із отриманої суспензії готували серійні десятикратні розведення від 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-6</sup> і більше. Проби об'ємом 1 см<sup>3</sup> із останніх двох розведень вносили на дно двох стерильних чашок Петрі, які заливали розтопленим й охолодженим до 45 °С м'ясо-пептонним агаром (МПА) об'ємом 15 см<sup>3</sup>. Після застигання середовища чашки інкубували протягом 48 год за температури 28-30°C. Із суми колоній, що виростили на двох чашках одного розведення, вираховували середнє арифметичне й визначали ЗМЧ. Під час визначення титру БГКП застосовували методику прямого посіву на середовище Ендо ґрунтової бовтушки та на середовищі Кеслера. По 1 см<sup>3</sup> різних розведень ґрунту засівали у 9 см<sup>3</sup> глюкозо-пептонного або лактозо-пептонного середовища. Висів на середовище Ендо робили у зв'язку з розкладом зазначених цукрів до кислоти й газу, темно-червоні колонії, що виростили, мікроскопували, ставили пробу на оксидазу й вираховували титр БГКП.

Титр ентерококів визначали шляхом посіву відповідних розведень на середовище Каліні; перфрінгенс-титр вираховували посівом розведень суспензії на середовище Вільсона-Блера; кількість грибів – на середовище Сабуро, актиноміцетів – на крохмально-аміачний агар. Для

визначення титру термофільних бактерій різні розведення суспензії ґрунту вносили у чашки Петрі, заливали розтопленим і охолодженим МПА. Посіви інкубували протягом 24 год за температури 60°C, підраховували кількість вирослих колоній і виконували перерахунок на 1 г ґрунту.

Оцінку ступеня забруднення ґрунту проводили шляхом визначення загального мікробного числа й кількісного аналізу основних індикаторних мікроорганізмів (табл. 2).

Таблиця 2

Санітарно-мікробіологічна оцінка ґрунту

Характеристика ґрунту	ЗМЧ, КУО/г	Титр БГКП	Перфрінгенс-титр	Кількість термофільних бактерій в 1 г
Чистий	$<5 \cdot 10^5$	$\geq 1,0$	$\geq 0,01$	$10^4-10^5$
Помірно забруднений	$5 \cdot 10^6$	0,9–0,01	0,009–0,0001	$10^3-10^5$
Сильно забруднений	$>5 \cdot 10^6$	$\leq 0,009$	$\leq 0,00009$	$10^2-10^1$

**Виклад основного матеріалу.** Найбільш активне (до 40–50%) зниження вмісту нафти у ґрунті відмічається у перші місяці після забруднення, після чого процес істотно уповільнюється. Узагальнена схема поступових перетворень нафтових вуглеводнів у ґрунті наведена на рис. 2. Основна частина легких вуглеводнів (від 20% до 40%) видаляється з поверхні ґрунтів шляхом випаровування та вимивання. Важкі вуглеводні і смолисто-асфальтенові компоненти найчастіше затримуються у верхніх горизонтах ґрунтів, тому їх деградація можлива у разі внутрішньогрунтового оброблення та частково біоаккумуляції.

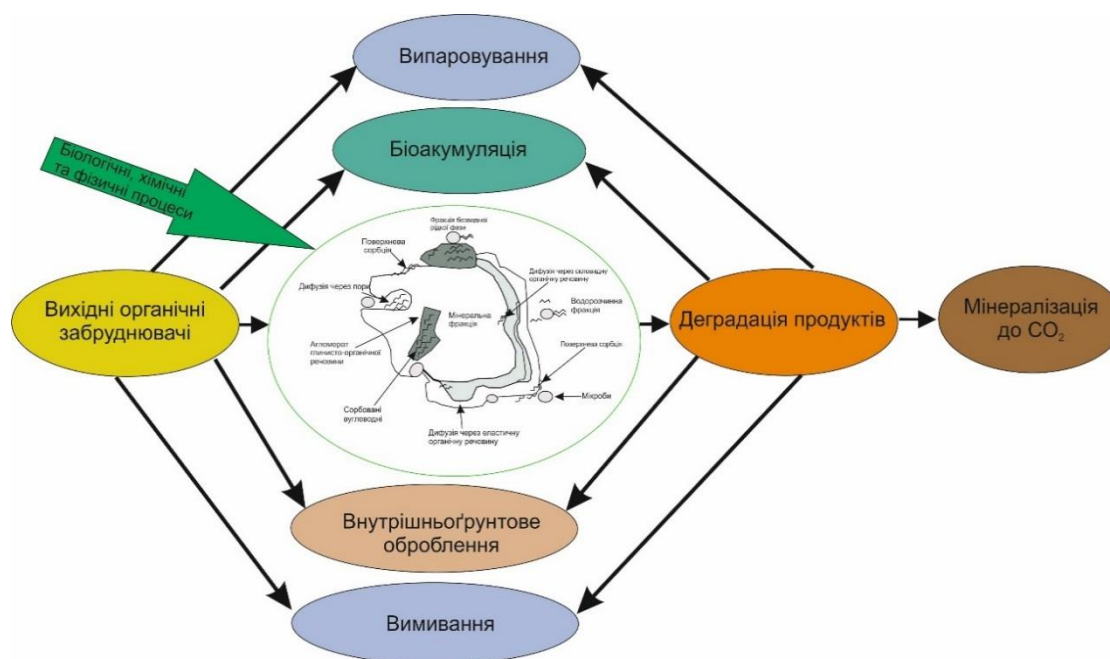


Рис. 2. Схема деградації нафти у ґрунті під впливом різних чинників

Найбільшу екологічну небезпеку становлять вуглеводні, які проникають всередину ґрунтового профілю і досягають рівня ґрунтових вод, оскільки їх міграція у водному середовищі значно вища, ніж у ґрунті. Основна частина вихідних компонентів нафти підлягає руйнуванню у результаті біологічних, хімічних та фізичних процесів. Відбуваються паралельно такі процеси: поверхнева сорбція НП, сорбція ґрунтовими часточками та агломератами глинисто-органічної речовини, дифузія через пори та органічну речовину з наступним окисненням вуглеводнів мікроорганізмами та мінералізацією до вуглекислого газу і води (див. рис. 2).

Рівень забруднення ґрунту визначали згідно з описаною вище методикою проведення експерименту. Виконані дослідження засвідчують, що зразки ґрунту після надходження нафти є сильно забрудненими за санітарно-бактеріологічними показниками (табл. 3).

Визначена динаміка пояснюється тим фактом, що стан угруповання ґрунтових мікроорганізмів змінюється не тільки залежно від початкової концентрації забруднювача, а й від часу, що пройшов з моменту забруднення. Можливе виділення трьох етапів сукцесії на підставі зміни чисельності домінантів ґрунтової мікробіоти. На першому етапі відбувається перебудова мікробіоценозів і активізація групи мікроорганізмів, що окиснюють вуглеводні. На другому етапі,

у міру зниження вмісту вуглеводнів в ґрунті, активізуються сприйнятливі до забруднення групи мікроорганізмів, життєдіяльність яких раніше була пригнічена. Третій етап – це поступове і тривале повернення мікробного угруповання до вихідного або близького до такого стану.

Таблиця 3

### Результати санітарно-бактеріологічного дослідження зразків ґрунту

Показник	Зразок нафтозабрудненого ґрунту		
	№1	№2	№3
ЗМЧ, КУО/г	$9,2 \cdot 10^8$	$3,6 \cdot 10^7$	$5,1 \cdot 10^7$
Титр БГКП	0,009	0,004	0,8
Перфрінгенс-титр	0,00009	0,00009	0,009
Кількість термофільних бактерій в 1 г	$5 \cdot 10^5$	$10^6$	$5 \cdot 10^4$
Плісеневі гриби, КУО/г	$1,3 \cdot 10^2$	$10^7$	$2,5 \cdot 10^2$
Усреднений рівень забруднення	Сильно забруднений	Сильно забруднений	Помірно забруднений

З метою ініціації процесів природного самоочищення ефективно застосовувати один із способів біоремедіації – біостимуляцію. Вона передбачає внесення поживних речовин для активації діяльності нативних мікроорганізмів-нафтодеструкторів забрудненої території. Біогенні елементи (P, K, N і т.д.) можуть бути отримані з органічних та неорганічних відходів, рослинних решток, навозу великої рогатої худоби, відходів птахівництва тощо. У такому випадку відходи підлягають ефективному способу утилізації, тобто використанню як вторинної сировини для біотехнологічних процесів, зокрема для біоремедіації нафтозабруднених ґрунтів.

Досліджено ступінь деградації нафти та нафтопродуктів за рахунок внесення у забруднену ділянку різних видів відходів. Їх об'єднано в групи: тваринні відходи (коров'ячий, свинячий, кінський, козячий, пташиний гній), рослинні відходи (шкірка картоплі, чайне листя, соєва макуха та ін.), неорганічні відходи (неорганічне добриво, пиломатеріали з колотого дерева) та інші (шлам стічних вод, відходи стічних вод пивоварної промисловості, грязьовий фільтрувальний шар процесів переробки цукрової тростини, стічні води заводу з виробництва пальмової олії).

Результати досліджень у графічному вигляді візуалізовано на рис. 3 та 4.

Графіки на рис. 3 ілюструють закономірність вищого ступеню деградації нафти за умови нижчого рівня забруднення ґрунту. Незалежно від виду біостимулятора, що використовувався, прослідковується зменшення рівня деградації нафти у ряду концентрації нафти у ґрунті: 2% > 4% > 6%. Найбільш ефективним біостимулятором виявилось неорганічне добриво (3), а застосування лушпиння пальмового ядра (2) найменше інтенсифікує природний процес деградації нафти, коров'ячий гній (1) займає проміжне місце. Варто зауважити, що зміна фізичних властивостей ґрунту під час забруднення призводить до витіснення повітря нафтою, погіршення надходження води та поживних речовин, зміни гумусного стану, порушення аерації і створення анаеробних умов у товщі ґрунту, що викликає зміни окисно-відновних умов і є причиною гальмування розвитку живих організмів або їх загибелі. Вміст органічної речовини з розрахунку на загальний вуглець і гумус у забруднених ґрунтах зростає за рахунок вуглецю нафти, але йде процес якісної зміни бітумінозних речовин і групового складу гумусу. Найбільш сприятливим для мікробного гідролізу сполук є значення співвідношення C:N від 10 до 20, а у забрудненому НП ґрунті C:N зростає від 50 до 400 залежно від кількості привнесеного вуглецю і типу ґрунту, що призводить до погіршення азотного режиму ґрунтів. Пригнічення процесів нітрифікації відмічається за умови вмісту нафти у ґрунті на рівні 1–15%. Саме внесення комплексних мінеральних добрив сприяє покращенню азотного режиму та збільшенню вмісту рухомих форм фосфору і калію.

На рисунку 4 наведені узагальнюючі результати досліджень щодо ступеня деградації нафти для широкого спектру хімічної природи біостимуляторів, зокрема для різного початкового вмісту нафти у ґрунті.

Найбільші біостимуляційні впливи на нативні мікроорганізми-нафтодеструктори здійснюють відходи тваринного походження та неорганічні відходи, які містять необхідні для прискорення їх росту речовини. Такий підхід дозволить додатково вирішити проблему поводження з відходами і частково повернути мікроелементи в природні цикли.



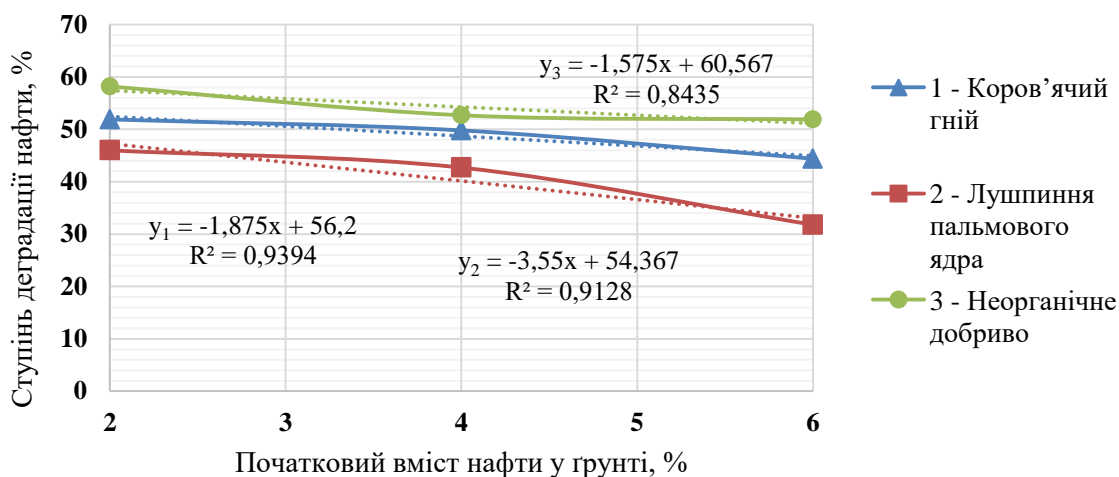


Рис. 3. Залежність ступеня деградації нафти від виду біостимулятора та початкового вмісту нафти у ґрунті

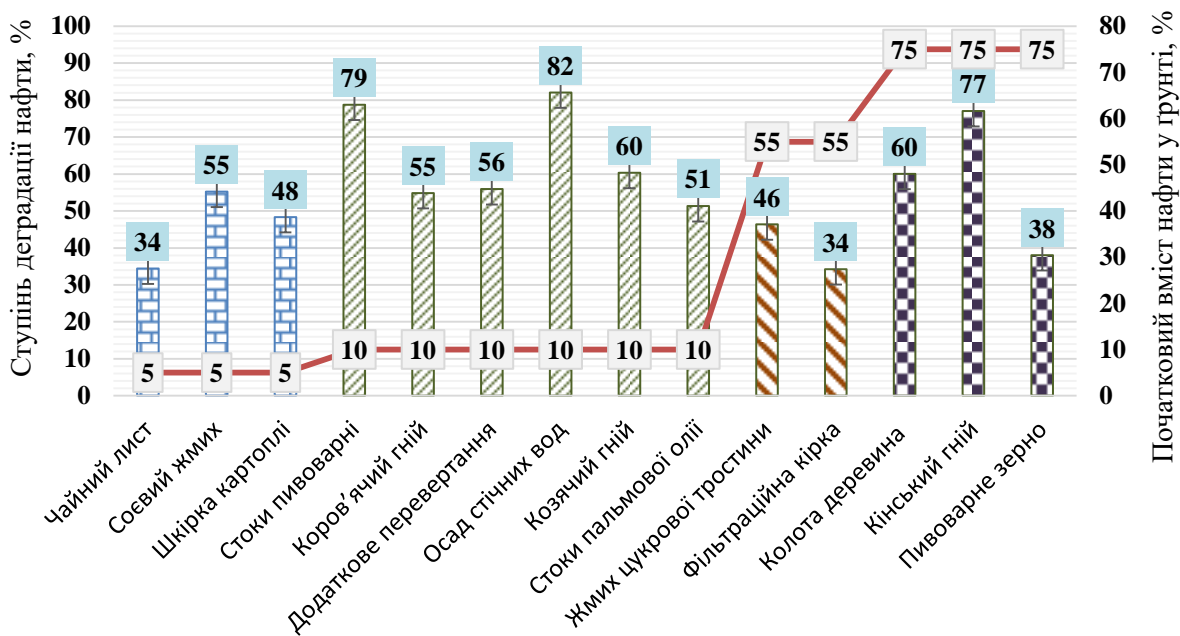


Рис. 4. Залежність ступеня деградації нафти у ґрунті від виду біостимулятора

Одним із можливих рішень проблеми очищення нафтозабруднених ґрунтів пропонується використання дигестату біогазових установок. Дигестат – високо збагачене на поживні речовини та гумус добриво [16]. Крім біодобриного ефекту, дигестат можна використовувати як органічний меліорант для покращання фізичних властивостей ґрунту, таких як утримання вологи, підтримка концентрації органічних речовин, підвищення біологічної активності і пригнічення патогенних організмів [17].

Додавання азоту з дигестатом у ґрунт ініціює багато процесів, таких як мінералізація, іммобілізація, нітрифікація і денітрифікація, а також вилуговування і випаровування, які залежать не тільки від внутрішніх властивостей дигестату (вміст і форма внесеного азоту), але і від властивостей ґрунту, погодних умов, в основному температури, опадів і технології внесення. Швидкість мінералізації і нітрифікації залежить, головним чином, від вмісту органічної речовини в ґрунті і в деякому ступені від його текстурних властивостей [18].

Склад ферментованої біомаси (дигестату) в цілому залежить від основного матеріалу органічної речовини, вмісту і форми азоту. На обсяг поживних речовин в дигестаті також впливають тривалість процесу ферментації, його параметри (температура, тиск), а також походження і склад сировини. Більш високий вміст N в дигестаті у порівнянні з компостом є наслідком ефекту концентрування N, оскільки джерела вуглеводню розкладаються до CO<sub>2</sub> і CH<sub>4</sub>, а

N зберігається під час анаеробного бродіння [19]. Азот є основною поживною речовиною для рослин у формі  $\text{NH}_4^+$  і  $\text{NO}_3^-$  і є найбільш поширеним фактором, що обмежує ріст сільськогосподарських культур.

На підставі викладеного вище сформульовані задачі для подальшого дослідження, що полягають у визначенні динаміки санітарно-бактеріологічних показників нафтозабрудненого ґрунту під час проведення біоремедіації за умови додаткового внесення біостимуляторів, зокрема анаеробного дигестату. За результатами санітарно-мікробіологічної оцінки ґрунту можна судити про ступінь та швидкість очищення ґрунту, тобто інтенсифікацію цього процесу внаслідок застосування біостимуляторів.

**Висновки.** Проведені дослідження засвідчують, що зразки ґрунту після надходження нафти є сильно забрудненими за санітарно-бактеріологічними показниками, а динаміка рівня забруднення ґрунту змінюється не тільки залежно від початкової концентрації забруднювача, а й від часу, що пройшов з моменту забруднення. Встановлено, що з метою ініціації процесів природного самоочищення ефективно застосовувати біостимуляцію за рахунок внесення поживних речовин для активації діяльності мікроорганізмів-нафтодеструкторів. У ролі біостимуляторів доцільно використовувати неорганічні та органічні відходи рослинного і тваринного походження, що в свою чергу зменшить їх накопичення та перетворить на перспективну вторинну сировину і дозволить частково повернути мікроелементи в природні цикли.

Експериментально встановлено залежність ступеню деградації нафти та нафтопродуктів від внесених видів відходів. Виявлено, що чим сильніше ґрунти забруднені нафтопродуктами, тим більший вміст азоту повинен міститися в біостимулюючому субстраті для підтримання співвідношення C:N в межах від 10 до 20 в забрудненому ґрунті. Доведено, що найбільш ефективним біостимулятором є неорганічне добриво, а застосування лушпиння пальмового ядра найменше інтенсифікує природний процес деградації нафти, коров'ячий гній займає проміжне місце. На підставі досліджень встановлено, що перспективним біостимулюючим субстратом є дигестат, який виступає як ефективний органічний меліорант та стимулятор біологічної активності.

Тип дигестату, залежно від сировини, тривалості процесу ферментації, його параметрів (температура, тиск), а також походження і складу сировини, що може містити різну кількість азоту, впливає на швидкість біодеструкції під час проведення біоремедіації за умови додаткового внесення біостимуляторів. Подальші дослідження у цьому напрямі дозволять підвищити ступінь біологічного очищення ґрунтів та зменшити накопичення відходів від використання біогазових установок, що буде мати подвійну екологічно обґрунтовану ефективність.

## Література

- 1 Черных М. С., Садчиков А. В. Нефтедеструкция и биоремедиация. *Современные проблемы науки и образования*. 2016. № 5. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25214>
- 2 Воеводина Т. С., Русанов А. М., Васильченко А. В. Влияние нефти на химические свойства чернозема обыкновенного Южного Предуралья. *Вестник Оренбургского государственного университета*. 2015. № 10 (185). С. 157-161. URL: [http://vestnik.osu.ru/2015\\_10/34.pdf](http://vestnik.osu.ru/2015_10/34.pdf).
- 3 Liang Y., Zhang X., Zhou, J., Li G. Long-term oil contamination increases deterministic assembly processes in soil microbes. *Ecological Applications*. 2015. Vol. 25(5). P. 1235-1243. URL: <https://doi.org/10.1890/14-1672.1>.
- 4 Borowik A., Wyszowska J., Kucharski M., Kucharski J. Implications of soil pollution with diesel oil and BP petroleum with ACTIVE technology for soil health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019. Vol. 16(14). URL: <https://doi.org/10.3390/ijerph16142474>.
- 5 Yan L., Penttinen P., Mikkonen A., Lindström K. Bacterial community changes in response to oil contamination and perennial crop cultivation. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018. Vol. 25(15). P. 14575-14584. URL: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1635-9>.
- 6 Salam L. B., Obayori S. O., Nwaokorie F. O., Suleiman A., Mustapha R. Metagenomic insights into effects of spent engine oil perturbation on the microbial community composition and function in a tropical agricultural soil. *Environmental Science and Pollution Research*. 2017. Vol. 24(8). P. 7139–7159. URL: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8364-3>.



7 Uzoigwe C., Burgess J. G., Ennis C. J. et al. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Front Microbiology*. 2015. Vol. 6(245) [online]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4387539/pdf/fmicb-06-00245.pdf>.

8 Helmy Q., Laksmono R. and Kardena E. Bioremediation of Aged Petroleum Oil Contaminated Soil: From Laboratory Scale to Full Scale Application. *Procedia Chemistry*. 2015. Vol. 14. P. 326-333.

9 Ebadi A. A., Sima N. A., Olamaee M. Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant – *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *Journal of advanced research*. 2017. Vol. 8 (6). P. 627-633. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2017.06.008>.

10 Das P., Yang X.-P., Ma L. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity. *Frontiers in microbiology*. 2014. Vol. 5(696). URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00696>.

11 Olawepo G. K., Ogunkunle C. O., Adebisi O. O., Fatoba P. O. Enhanced Bioremediation of Brass Crude-Oil (Hydrocarbon), Using Cow Dung and Implication on Microbial Population. *Pollution*. 2018. Vol. 4(2). P. 273-280. URL: <https://doi.org/10.22059/poll.2017.240833.313>.

12 Urhibo V. O., Ejechi B. O. Crude oil degradation potential of bacteria isolated from oil-polluted soil and animal wastes in soil amended with animal wastes. *AIMS Environmental Science*. 2017. Vol. 4(2). P. 277-286. URL: <https://doi.org/10.3934/environsci.2017.2.277>.

13 Robichaud K., Lebeau M., Martineau S., Amyot M. Bioremediation of engine-oil contaminated soil using local residual organic matter. *PeerJ*. 2019. URL: <https://doi.org/10.7717/peerj.7389>.

14 Cuevas-Díaz M. et al. Catalase and Phosphatase Activities During Hydrocarbon Removal from Oil-Contaminated Soil Amended with Agro-Industrial By-products and Macronutrients. *Water Air Soil Pollution*. 2017. Vol. 228: 159. URL: <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3336-2>.

15 Ani K. A., Ochin E. Response surface optimization and effects of agricultural wastes on total petroleum hydrocarbon degradation. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 2018. Vol. 7. P. 564-574. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.06.009>.

16 Möller K. Effects of anaerobic digestion on soil carbon and nitrogen turnover, N emissions, and soil biological activity. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 2015. Vol. 35. P. 1021-1041. URL: <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0284-3>.

17 Nkoa R. Agricultural benefits and environmental risks of soil fertilization with anaerobic digestates: A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 2014. Vol. 34. P. 473-492. URL: <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0196-z>.

18 Wysocka-Czubaszek A. Dynamics of Nitrogen Transformations in the Soil Fertilized with Digestate from Agricultural Biogas Plant. *Journal of Ecological Engineering*. 2019. Vol. 20(1). URL: <https://doi.org/10.12911/22998993/93795>.

19 Kuusik A., Pachel K., Kuusik A, Loigu E. Possible agricultural use of digestate. *Proceeding of the Estonian Academy of Science*. 2017. Vol. 66.1. P. 64-74. URL: <https://doi.org/10.3176/proc.2017.1.10>

**I. Ablieieva, L. Pliatsuk, I. Trunova,  
O. Yakhnenko, I. Berezha**  
Sumy State University

## **INFLUENCE OF BIOSTIMULANTS ON THE MICROBIOLOGICAL STATE OF OIL-CONTAMINATED SOILS**

The application of scientifically based approaches to the intensification of natural processes of self-cleaning of soils from petroleum products is becoming increasingly important. Biocleaning is an effective, environmentally sound method of improving the environment. The purpose of the article is to establish patterns of changes in the sanitary-microbiological condition of the soil after oil pollution and to determine effective approaches to the intensification of natural processes of soil self-cleaning.

In the work, the sanitary-bacteriological research of the oil-contaminated soil on sanitary-indicative microorganisms was carried out; the sanitary-microbiological condition of the studied soil samples was assessed to identify the qualitative changes in ecological and trophic groups of microorganisms; the efficiency of biostimulants application for intensification of natural processes of self-purification of oil-contaminated soils was substantiated.

Methods of inoculation of medium were used for microbiological study, the degree of soil contamination was assessed by determining the total microbial count and performing the quantitative analysis of the main indicator microorganisms.

It was determined that soil samples after oil inflow are heavily contaminated by sanitary and bacteriological indicators. To stimulate the development of certain groups of biotransformers, it is effective to introduce special sorbents that contain a range of substances necessary to accelerate the growth of microorganisms that destroy the oil. It was found that using the digestate of biogas plants as a biostimulator allows improving the physical and water-air properties of the soil, and acts as an effective biostimulator to increase biological activity due to the content of macronutrients.

**Key words:** biotreatment, biostimulation, digestate, soil pollution, oil products, sanitary-microbiological assessment.

### References

- 1 Chernykh M. S., Sadchikov A. V. Neftedestruktsiya i bioremediatsiya. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016. № 5. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25214>.
- 2 Voyevodina T. S., Rusanov A. M., Vasilchenko A. V. Vliyaniye nefi na khimicheskiye svoystva chernozema obyknovennogo Yuzhnogo Preduralya. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2015. № 10 (185). S. 157-161. URL: [http://vestnik.osu.ru/2015\\_10/34.pdf](http://vestnik.osu.ru/2015_10/34.pdf).
- 3 Liang Y., Zhang X., Zhou, J., Li G. Long-term oil contamination increases deterministic assembly processes in soil microbes. *Ecological Applications*. 2015. Vol. 25(5). P. 1235-1243. URL: <https://doi.org/10.1890/14-1672.1>.
- 4 Borowik A., Wyszowska J., Kucharski M., Kucharski J. Implications of soil pollution with diesel oil and BP petroleum with ACTIVE technology for soil health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019. Vol. 16(14). URL: <https://doi.org/10.3390/ijerph16142474>.
- 5 Yan L., Penttinen P., Mikkonen A., Lindström K. Bacterial community changes in response to oil contamination and perennial crop cultivation. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018. Vol. 25(15). P. 14575-14584. URL: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1635-9>.
- 6 Salam L. B., Obayori S. O., Nwaokorie F. O., Suleiman A., Mustapha R. Metagenomic insights into effects of spent engine oil perturbation on the microbial community composition and function in a tropical agricultural soil. *Environmental Science and Pollution Research*. 2017. Vol. 24(8). P. 7139-7159. URL: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8364-3>.
- 7 Uzoigwe C., Burgess J. G., Ennis C. J. et al. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Front Microbiology*. 2015. Vol. 6(245) [online]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4387539/pdf/fmicb-06-00245.pdf>.
- 8 Helmy Q., Laksmono R. and Kardena E. Bioremediation of Aged Petroleum Oil Contaminated Soil: From Laboratory Scale to Full Scale Application. *Procedia Chemistry*. 2015. Vol. 14. P. 326-333.
- 9 Ebadi A. A., Sima N. A., Olamaee M. Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant – *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *Journal of advanced research*. 2017. Vol. 8 (6). P. 627–633. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2017.06.008>.
- 10 Das P., Yang X.-P., Ma L. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity. *Frontiers in microbiology*. 2014. Vol. 5(696). URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00696>.
- 11 Olawepo G. K., Ogunkunle C. O., Adebisi O. O., Fatoba P. O. Enhanced Bioremediation of Brass Crude-Oil (Hydrocarbon), Using Cow Dung and Implication on Microbial Population. *Pollution*. 2018. Vol. 4(2). P. 273-280. URL: <https://doi.org/10.22059/poll.2017.240833.313>.
- 12 Urhibo V. O., Ejechi B. O. Crude oil degradation potential of bacteria isolated from oil-polluted soil and animal wastes in soil amended with animal wastes. *AIMS Environmental Science*. 2017. Vol. 4(2). P. 277-286. URL: <https://doi.org/10.3934/environsci.2017.2.277>.
- 13 Robichaud K., Lebeau M., Martineau S., Amyot M. Bioremediation of engine-oil contaminated soil using local residual organic matter. *PeerJ*. 2019. URL: <https://doi.org/10.7717/peerj.7389>.
- 14 Cuevas-Díaz M. et al. Catalase and Phosphatase Activities During Hydrocarbon Removal from Oil-Contaminated Soil Amended with Agro-Industrial By-products and Macronutrients. *Water Air Soil Pollution*. 2017. Vol. 228: 159. URL: <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3336-2>.

15 Ani K. A., Ochin E. Response surface optimization and effects of agricultural wastes on total petroleum hydrocarbon degradation. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences. 2018. Vol. 7. P. 564-574. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.06.009>.

16 Möller K. Effects of anaerobic digestion on soil carbon and nitrogen turnover, N emissions, and soil biological activity. A review. Agronomy for Sustainable Development. 2015. Vol. 35. P. 1021-1041. URL: <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0284-3>.

17 Nkoa R. Agricultural benefits and environmental risks of soil fertilization with anaerobic digestates: A review. Agronomy for Sustainable Development. 2014. Vol. 34. P. 473-492. URL: <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0196-z>.

18 Wysocka-Czubaszek A. Dynamics of Nitrogen Transformations in the Soil Fertilized with Digestate from Agricultural Biogas Plant. Journal of Ecological Engineering. 2019. Vol. 20(1). URL: <https://doi.org/10.12911/22998993/93795>.

19 Kuusik A., Pachel K., Kuusik A., Loigu E. Possible agricultural use of digestate. Proceeding of the Estonian Academy of Science. 2017. Vol. 66.1. P. 64-74. URL: <https://doi.org/10.3176/proc.2017.1.10>.

*Надійшла до редакції 17 січня 2021 р.*