

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Тольяттинский государственный университет»

Институт химии и энергетики  
(наименование института полностью)

---

Кафедра «Химическая технология и ресурсосбережение»  
(наименование)

18.04.01 Химическая технология  
(код и наименование направления подготовки)

---

Экобиотехнология  
(направленность (профиль))

---

## **ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА (МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ)**

на тему: Биодеградация полициклических ароматических углеводов

Студент

П.Н. Ховятская

---

(И.О. Фамилия)

(личная подпись)

Научный

к.х.н., доцент, О.Б. Григорьева

---

руководитель

(учёная степень, звание, И.О. Фамилия)

## Оглавление

Введение.....	5
Глава 1 Полициклические ароматические углеводороды.....	9
1.1 ПАУ как стойкие поллютанты.....	9
1.2 Источники поступления ПАУ в окружающую среду.....	11
1.3 Экотоксикология ПАУ.....	13
1.4 Свойства ПАУ в почвах, их влияние на растения.....	17
1.5 Дегградация ПАУ в почвах.....	19
1.5.1 Микробная дегградация.....	20
1.5.1.1 Ризосфера.....	22
1.5.1.2 Бактерии рода <i>Pseudomonas</i> , их участие в биодегградации.....	24
1.5.2 Химическая дегградация.....	28
1.5.3 Физическая дегградация.....	29
1.5.4 Физико-химическая дегградация.....	30
1.5.5 Фиторемедиация.....	32
1.5.5.1 Использование растительного сырья после фитоэкстракции.....	33
1.5.5.2 Использование растительного сырья после ризодеградации.....	35
1.6 Особенности почвы как объекта исследования.....	37
1.6.1 Экстракция ПАУ из почв.....	39
1.6.2 Определение ПАУ в экстрактах почв.....	41
Глава 2 Экспериментальные исследования по биодегградации ПАУ.....	45
2.1 Построение градуировочных графиков ПАУ.....	47
2.2 Влияние ПАУ на штамм <i>P. aureofaciens</i> ВКМ В-2391 Д... ..	49
2.3 Дегградация ПАУ штаммом <i>P. aureofaciens</i> ВКМ В-2391 Д в питательной среде.....	51

2.4 Дегградация нафталина в почве штаммом <i>P. aureofaciens</i> ВКМ В-2391 Д и его экстракция.....	53
2.5 Толерантность тестируемых растений Самарской области по отношению к нафталину.....	55
2.6 Дегградация нафталина симбиозом растений Самарской области с бактериями <i>P. aureofaciens</i> ВКМ В-2391 Д.....	64
Глава 3 Технологическое решение по ремедиации земель, загрязнённых ПАУ.....	66
3.1 Предлагаемая технологическая схема ремедиации земель....	66
3.2 Экономический расчёт используемых технологий.....	68
Заключение.....	72
Список используемой литературы и используемых источников.....	74

## Перечень сокращений и обозначений

COVID-19 – коронавирусная инфекция 2019 года

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГХ – газовая хроматография

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – N,N-диметилформамид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КОЕ – колониеобразующие единицы

МС – масс-спектрометрическое детектирование

ПАУ – полициклические ароматические углеводороды

ПДК – предельно допустимая концентрация

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

СПАВ – синтетические поверхностно-активные вещества

ТЭС – тепловая электрическая станция

УЗ – ультразвук

УФ – ультрафиолетовое излучение

ФЛД – флуоресцентный детектор

## Введение

Острой экологической проблемой является загрязнение биосферы. Известно, что существует естественное загрязнение окружающей среды, например, вулканическим дымом, содержащими высокую концентрацию оксида серы (IV), замутнение водных источников в период оползней, землетрясений, наводнений. Однако природа способна к самоочищению и восстановлению. Естественные загрязнения не наносят ощутимого урона на биосферу в целом. С наступлением индустриальной революции и дальнейшим развитием технической сферы жизни естественное загрязнение ушло на второй план, лидирующим стало антропогенное воздействие. В процессе жизнедеятельности человек оказывает влияние на биосферу: промышленными, сельскохозяйственными, радиационными, шумовыми и электромагнитными загрязнениями, а также разрушает биоценозы, вытесняя фауны и флоры из мест их родного обитания. Стоит отдельно отметить такое загрязнение, как химическое, способствующее накоплению экотоксикантов во всех элементах природной среды.

Наиболее распространёнными поллютантами являются полициклическими ароматическими углеводороды (ПАУ). Они поступают в биосферу в ходе высокотемпературных и естественных процессов деструкции различных органических веществ, например, в процессе лесного пожара, и промышленных, к которым можно отнести сжигание топлива, нефтепереработку и техногенные аварии. Антропогенное загрязнение полиаренами превышает природное образование данных веществ, что приводит к повышению фоновых значений концентрации. Это делает рассматриваемые углеводороды опасными загрязнителями для биосферы.

ПАУ являются высокомолекулярными органическими соединениями бензольного ряда. Их угроза для живых организмов обусловлена выраженными мутагенными, тератогенными, токсическими и канцерогенными свойствами. Накоплению и длительному сохранению

полиаренов в биосфере способствуют такие свойства, как малая летучесть, незначительная растворимость. Благодаря таким свойствам данные углеводороды биоаккумулируются в пищевых цепях – для планктонных организмов характерен высокий уровень накопления ПАУ, что способствует разрушению биота.

Перспективными методами выведения из биосферы ПАУ являются процессы детоксикации и очистки, использующие деятельность микроорганизмов. Необходимы разработка и усовершенствование методов отчистки сред биосферы, а также поиск новых микроорганизмов.

**Актуальность и научная значимость настоящего исследования:** заключается в необходимости выявления толерантных растений по отношению к полиаренам и микроорганизмов, способных к их деградации. Научная значимость состоит в подборе эффективной пары «растение Самарской области – бактерии», которую можно использовать для рекультивации земель, загрязнённых ПАУ.

**Объекты исследования:** полиарены: антрацен, бенз[*a*]пирен, нафталин и фенантрен, бактерии *P. aureofaciens* ВКМ В-2391 Д, 17 видов растений, произрастающих на территории Самарской области.

**Предмет исследования:** свойства ПАУ, технологии ремедиации педосферы, способы деградации полиаренов, в частности возможность бактерий рода *Pseudomonas* к биodeградации ПАУ в консорциуме с растениями и без них.

**Цель исследования:** снижение содержания полиаренов в почве Самарской области путём их биodeградации симбиозом растений и бактерий рода *Pseudomonas*.

**Гипотеза исследования** состоит в том, что бактерии рода *Pseudomonas* способны к деградации ПАУ, при создании консорциума «исследуемые бактерии – тестируемое растение» эффективность разрушения полиаренов возрастает.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи:**

1. Провести литературный анализ ПАУ с точки зрения их источников поступления в окружающую среду, экотоксикологии, деградации, экстракции и детектирования;
2. Описать ризосферные бактерии рода *Pseudomonas* и их пути деградации полиаренов;
3. Провести эксперимент по деградации ПАУ бактериями *P. aureofaciens* ВКМ В-2391 Д в питательной среде и в почве;
4. Установить влияние нафталина на тестируемые растения, выявить толерантные виды;
5. Установить эффективные симбиозы «растение – бактерии» для деградации нафталина в почве;
6. Разработать технологическую схему для ремедиации педосферы.

**Методы исследования:** изучение, анализ и обобщение литературных источников по теме магистерской диссертации. Проведение экспериментальных исследований, обработка и анализ полученных результатов с применением аналитических методов анализа.

**Научная новизна исследования** заключается в:

- использование штамма *P. aureofaciens* ВКМ В-2391 Д для деградации ПАУ;
- установлении толерантных растений Самарской области по отношению к нафталину и выявление эффективного консорциума «растение – бактерии» для деградации полиаренов, что не было описано ранее;
- разработке технологической схемы ремедиации почвы при загрязнении ПАУ.

**Личное участие автора** в организации и проведении исследования состоит в постановке цели и основных задач, выполнении аналитического обзор литературных данных по теме исследования. Изложенные в диссертации результаты исследований получены непосредственно автором

работы или совместно с соавторами опубликованных работ. Обсуждение, обобщение и интерпретация полученных результатов исследования, подготовка научных публикаций и тезисов докладов проведены совместно с научным руководителем к.х.н., доцентом О.Б. Григорьевой. Автором диссертации осуществлялось непосредственное планирование и проведение лабораторных экспериментов, анализ и обработка экспериментальных результатов, выполнение расчётов и подведение итогов работы.

#### **Апробация результатов работы.**

Основные результаты диссертационной работы докладывались на XXIV Всероссийская конференция молодых учёных-химиков (с международным участием), (г. Нижний Новгород, 2021).

#### **Опубликованность результатов.**

По теме диссертации опубликована работа в журнале «Молодой учёный» (№ 9 (351), 2021)

#### **На защиту выносятся:**

- Кинетика деградации антрацена, бенз[*a*]пирена, нафталина и фенантрена бактериями *P. augeofaciens* ВКМ В-2391 Д в питательной среде Мюллера-Хинтона;
- Кинетика деградации нафталина в почве бактериями *P. augeofaciens* ВКМ В-2391 Д;
- Влияние нафталина на тестируемые 17 видов растений Самарской области;
- Эффективность симбиозов «тестируемое растение – бактерии *P. augeofaciens* ВКМ В-2391 Д» для деградации ПАУ;
- Технологическая схема ремедиации земель, загрязнённых ПАУ.

#### **Структура магистерской диссертации.**

Работа состоит из введения, 3 глав, заключения, содержит 35 рисунков, 6 таблиц, список использованной литературы и используемых источников (113 источника, из которых 29 на иностранном языке). Основной текст работы изложен на 86 страницах.

## Глава 1 Полициклические ароматические углеводороды

### 1.1 Полициклические ароматические углеводороды как стойкие поллютанты

Полициклическими ароматическими углеводородами являются высокомолекулярные органические соединения, состоящие из двух и более конденсированных бензольных колец. Кольца могут располагаться по прямой линии, под углом или в виде кластерных соединений.

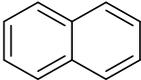
Для рассматриваемых соединений характерны следующие свойства:

- малая летучесть большинства ПАУ,
- высокая устойчивость (исключение составляют длинные молекулы линейного строения, например, тетрацен),
- гидрофобность,
- высокая сорбционная способность.

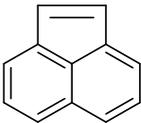
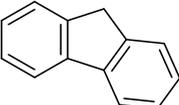
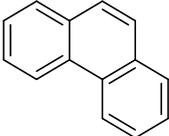
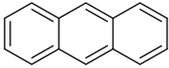
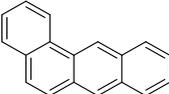
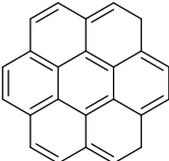
Выше описанные первые три свойства обосновывают высокую сорбцию ПАУ на взвешенных частицах. Благодаря последнему свойству наблюдаются более высокие концентрации полиаренов в средах, чем если бы их концентрация обуславливалась лишь малой растворимостью [104].

В таблице 1 представлены некоторые ПАУ и их физико-химические свойства.

Таблица 1 – Физико-химические характеристики некоторых ПАУ [16]

Вещество	Структурная формула	Молекулярная масса (Мг, г/моль)	Растворимость	T <sub>кип</sub> , °C	T <sub>пл</sub> , °C
1	2	3	4	5	6
Нафталин		128.17	Не растворим в воде; растворим в бензоле, спирте	217,97	80

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6
Аценафтилен		152.20	Нерастворим в воде; растворим в органических растворителях	265-275	92-93
Флуорен		166.22	Нерастворим в воде; плохо растворим в этаноле; хорошо растворим в диэтиловом эфире	293-295	116-117
Фенантрен		178.23	Нерастворим в воде; растворим в бензоле, диэтиловом эфире, метаноле, уксусной кислоте	340	101
Антрацен		178.23	Нерастворим в воде; растворим в ацетоне, ацетонитриле и горячем бензоле	340	218
Тетрафен		228.29	Плохо растворим в воде; растворим в неполярных органических растворителях	438	158
Коронен		302.38	Растворим в бензоле, дихлорметане, толуоле	525	438

Приведённая таблица показывает, что растворимость, полициклических углеводородов зависит от их молекулярной массы. Так, с увеличением молекулярной массы растворимость ПАУ в воде снижается; в присутствии ацетона, бензола, нефти, СПАВ и ряда других органических поллютантов – возрастает. С увеличением числа ароматических колец температуры плавления и кипения также возрастают.

Описанные характеристики полиаренов объясняют их способность накапливаться в биосфере и сохранять свои свойства длительное время, оказывая токсический эффект на объекты живой природы.

## 1.2 Источники поступления ПАУ в окружающую среду

Существует несколько источников, способствующих образованию полиаренов: природные и антропогенные.

Природным источникам поступления ПАУ в биосферу являются высокотемпературные процессы: извержения вулканов, лесные пожары. Однако вулканы выступают в роли локальных источников-загрязнителей, более масштабными оказываются лесные пожары [75]. В последнем случае в почве накапливаются полициклические соединения, содержащие в составе 3-4 ароматических кольца [56].

Рассматриваемые углеводороды находят в селевых потоках и горючих ископаемых. Из горючих ископаемых можно выделить нефть, в которой содержание ПАУ обычно не превышает 10%, однако их концентрация варьируется со степенью биодegradации исходного органического вещества. Нефть содержит гомологи бензфлуоренов, пирена, пирелена, флуорена и хризена. Наличие гомологов обусловлено низкотемпературными преобразованиями органических веществ, что приводит к алкил- и арилзамещённым ароматическим углеводородам [106].

Источниками могут служить не только температурные процессы, но и растения, водоросли, фитопланктоны, микроорганизмы. Так растения синтезируют полиарены в период активной вегетации, после этого периода наблюдаются значительное сокращение количества синтезируемых полициклических углеводородов или прекращение [4].

Рассматриваемые соединения содержатся в алмазе и его минералах-спутниках. Нахождение ПАУ в минералах связывают с последовательной поликонденсацией простых углеводородных молекул (C<sub>5</sub>- и C<sub>6</sub>-дегидроциклизация, ароматизация, изомеризация) и образованием более легких молекул H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> и др. [48].

Полиарены существуют и вне нашей планеты. Исследования образцов метеоритов показали наличие в них высокомолекулярных полициклических

ароматических углеводов: коронена и его алкилпроизводных. В эксперименте Сагана, симулирующем нижние слои атмосферы Юпитера, был обнаружен 4-кольцовый хризен в среде коричневатых толинов [18].

Благодаря широкому распространению полициклических углеводов была выдвинута отдельная гипотеза об их роли в эволюции. Данная гипотеза создана Платтсом в 2004 году и названа «Мир ПАУ». Она гласит, что ПАУ находились в «первичном бульоне» Земли: под воздействием среды и в результате присоединения азотистых оснований происходило эволюционирование, которое привело к появлению РНК-молекул [5].

ПАУ распространены в природе широко, однако основным ощутимым источником загрязнения является антропогенное воздействие. Полиарены образуются в процессе неполного сгорания органического сырья, при протекании различных промышленных процессов и других видов деятельности, в результате которых происходит загрязнение воздуха, воды, почвы.

Антропогенные источники разделяют на две группы: стационарные и передвижные. К первым относят промышленные предприятия, ТЭС и отопительные станции [110]. Среди промышленных предприятий необходимо выделить несколько, которые вносят наибольший вклад в фоновое содержание ПАУ: металлургические, коксохимические и нефтехимические [66].

В работе [9] был проведён анализ воздуха на литейных заводах по 16 соединениям. Результаты показали, что доля газообразных тетра- и пятициклические ароматических углеводов составляет более 90%.

Авторы работы [64] анализировали снежный покрыва в окрестностях Новосибирского электродного завода, производство которого основано на пиролизе графита, кокса, каменноугольного пека. Исследователи отметили, что загрязнение полиаренами от данного предприятия простирается на 3-4 км в составе крупнодисперсных фракций.

В отходах коксохимического производства содержится значительное количество полиаренов, среди которых преобладают три- и тетрациклические ПАУ. Их доля от общего количества составляет более 80% [77].

В нефтехимической промышленности источниками ароматических углеводородов служат установки термического крекинга, печи сжигания. Нефтешламы содержат ПАУ в широком диапазоне концентраций, например, бенз[*a*]пирен в интервале 2.1–8.0 мг/кг [101].

Передвижными источниками являются автомобильный, воздушный и водный транспорты. В густонаселённых агломерациях они преобладающие источники полициклических углеводородов. Особенность передвижных источников – загрязнение значительных территорий, которому способствуют климатические факторы.

Во всех случаях антропогенного загрязнения ПАУ образуются в результате высокотемпературных процессов.

Анализ полиаренов биогенного и техногенного происхождения показали, что биогенные представлены в основном соединениями, содержащими от 3 до 6 бензольных колец, в то время как техногенными в подавляющем случае являются четырёхядерные структуры. По отношению содержания биогенных к техногенным ПАУ можно судить о степени антропогенного влияния, например, на педосферу [46].

### **1.3 Экотоксикология ПАУ**

Полициклические ароматические углеводороды обладают канцерогенным, мутагенным, тератогенным и токсическим действиями. Их воздействие на организм обнаруживается при дозах на 1-2 порядка ниже доз общетоксического действия.

Благодаря свойству гидрофобности полиарены преодолевают биологические барьеры и аккумулируются в клетках живых организмов. Это

же свойство делает молекулы ПАУ труднодоступными для ферментных систем, участвующих в биодegradации токсикантов.

Всемирная организация здравоохранения сообщает, что 19% всех онкологических заболеваний в мире обусловлено факторами окружающей среды, например, химическим загрязнением воздуха, воды и почвы или биологическим агентам. Полиарены относятся к группе соединений с установленной генотоксичностью, способных инициировать развитие паковых опухолей.

Биологическая активность полиаренов связана с их структурными особенностями, называемыми «вау»-областями. «Вау-области» являются своеобразными углублениями в структуре молекулы и делятся на «бей-» (бенз[а]пирен 1) и «фьорд»- области (дibenзо[а,1]пирен 2). Однако отсутствие «вау»-области, как в случае с антраценом 3, не является гарантией того, что полиарен не будет проявлять биологическую активность (рисунок 1).

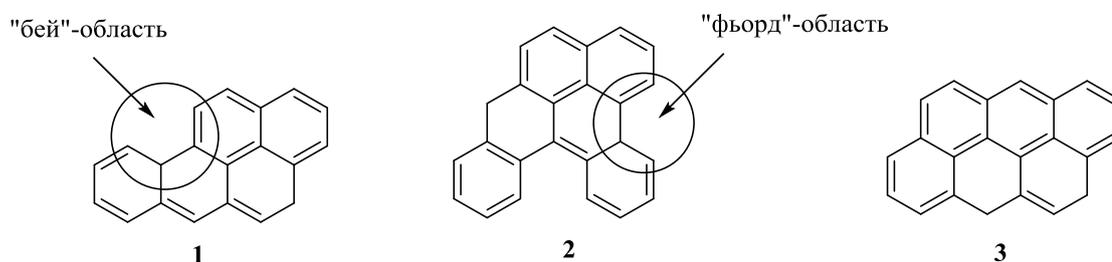


Рисунок 1 – Структурные особенности ПАУ

Биологическая активность в таком случае зависит от плотности зарядов электронов и геометрических искажений. Увеличение непланарности ПАУ снижает их способность метаболизироваться в активные формы, которые производят аддукты, повреждающие ДНК.

Метаболизм ксенобиотиков обычно происходит в печени. Большинство ксенобиотиков, таких как ПАУ, являются липофильными, связываются с

липидными мембранами и переносятся липопротеинами в крови. После попадания в организм через легкие, пищеварительный тракт или кожу ПАУ могут пройти одну или две фазы метаболизма.

В организме полициклические углеводороды общей структуры 4 под действием ферментов образуют ареноксида 5, что является начальным звеном в развитии интоксикации (рисунок 2).

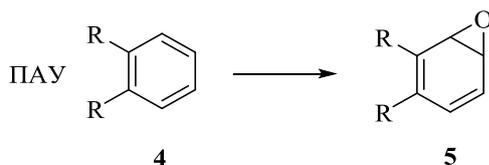


Рисунок 2 – Образование ареноксида

Ареноксида образуют ковалентные связи с нуклеофильными структурами клеток, в частности реагируют с гуанином, образуя аддукты ДНК. В большинстве случаев образовавшиеся аддукты распознаются и обрабатываются системами репарации. Однако не удаленные аддукты могут инициировать точечную мутацию в форме замены или делеции, что считается первым шагом в развитии рака.

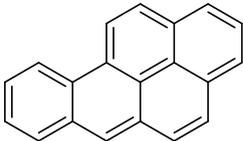
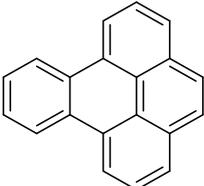
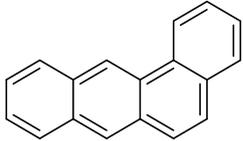
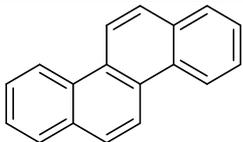
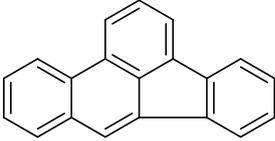
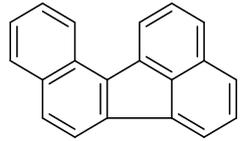
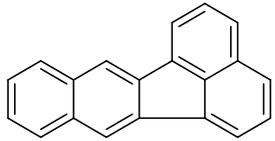
Воздействие ПАУ на организм вызывает окислительный стресс, который провоцирует мутации. Если механизмы репарации ДНК работают недостаточно, результатом является накопление мутаций в ДНК, которые могут вызвать канцерогенез [2].

Степень канцерогенности зависит от числа ароматических колец, их взаимного расположения и заместителей в молекуле. Наибольшие токсические свойства проявляются у полициклических ароматических углеводородов, содержащих в своём составе от 4 до 7 бензольных колец. Отсутствие канцерогенной активности у ПАУ с числом ароматических колец менее 3 и более 7 объясняется низкой скоростью их ферментативной

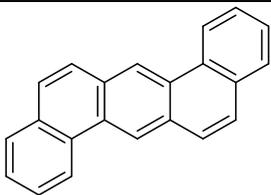
деградации. Однако под действием УФ излучения они переходят в соединения остротоксичные для водных организмов [113].

В таблице 2 представлены наиболее канцерогенные представители полициклических углеводородов, на которые согласно документам Евросоюза, наложены самые жесткие ограничения – величина ПДК = 0,00015 мг/м<sup>2</sup> [16].

Таблица 2 – Наиболее опасные представители ПАУ

Вещество	Структурная формула	Группа токсичности	Токсическое действие
Без[ <i>a</i> ]пирен		2А, 1	Сильный мутаген. Проникает через плацентарный барьер
Бенз[ <i>e</i> ]пирен		2А, 1	Сильный мутаген
Бенз[ <i>a</i> ]антрацен		2А	Сильный мутаген
Хризен		2А	Мутаген
Бензо[ <i>b</i> ]флуорантен		2Б	Мутаген
Бензо[ <i>j</i> ]флуорантет		2Б	Мутаген
Бензо[ <i>k</i> ]флуорантен		2Б	Мутаген

Продолжение таблицы 2

Вещество	Структурная формула	Группа токсичности	Токсическое действие
Дибензо[ <i>a,h</i> ]антрацен		2А	Сильный мутаген
Примечания – Расшифровка групп токсичности: группа 1 - вещества, по которым имеется достаточно доказательств их канцерогенности для человека; группа 2А - вещества, вероятно канцерогенные для человека; группа 2Б - вещества, возможно канцерогенные для человека.			

Бенз[*a*]пирен признан качественным и количественным индикатором наличия ПАУ в биосфере и материалах [83]. Это связано с его сильнейшей канцерогенностью и широким распространением в окружающей среде. Методика определения бенз[*a*]пирена является одной из самых чувствительных среди методов индикации полиаренов. В России установлены достаточно жёсткие требования к содержаниям бенз[*a*]пирена в различных объектах. Однако дибензо[*a,l*]пирен и дибензо[*a,h*]антрацен провоцируют развитие рака лёгких в большей степени, чем бенз[*a*]пирен. Таким образом, они должны быть более токсичными, чем принятый в качестве индикатора токсичности бенз[*a*]пирен [17].

#### 1.4 Свойства ПАУ в почвах, их влияние на растения

Почвы активно депонируют полиарены, которые поступают с осадками, пылью и аэрозолями из атмосферного воздуха и при трансформации органических веществ [81]. В городских почвах содержание ПАУ намного выше, чем в почвах сельскохозяйственных угодий [26], куда полиарены вносятся вместе с загрязненными водами [3] и ядохимикатами [10]. Однако риск вовлечения ПАУ в пищевые цепи через сельскохозяйственные почвы высок.

Интенсивность накопления ПАУ и их мобилизация зависят от двух параметров: свойств почвы и экранирующих барьеров, которыми могут выступать климатические условия [50].

Известно, что сорбция рассматриваемых соединений реализуется на частицах малого размера, обогащённых органическими веществами, преимущественно на глинистых частицах, высокоуглеродистых материалах [19]. Механизм сорбции ПАУ на почвенных коллоидах аналогичен механизму сорбции гумусовых веществ [51]. Можно сделать вывод, что полиароматические углеводороды по поведению характеризуются высоким сродством к фульвокислотам и гуминовым кислотам.

Распределение ароматических углеводородов описывается элювиально-иллювиальный характером: «тяжёлые» ПАУ, содержащие более четырёх бензольных колец, накапливаются в верхних органогенных горизонтах, лёгкие полиарены – нижележащих горизонтах. Солонцеватость почв отражается на миграционной способности полиаренов, что усиливает их распределение по почвенному профилю [38].

Загрязнение почв ПАУ отражается в соотношении азота и углерода. Увеличение содержания органического углерода в почве вызывает замедление процессов биodeградации веществ [102]. Плодородие почв, содержащих полиарены, заметно снижается из-за резкого снижения ферментативных и окислительно-восстановительных процессов. Последнее ведёт к микробиологическому оскудению и потере агрохимических характеристик [23].

ПДК бенз[а]пирена составляет 20 мкг/кг. При данной концентрации почвенные микроорганизмы способны разрушить соединение. Существенное повышение концентрации бенз[а]пирена приводит к изменению количественного и качественного характера микробиоценоза. Это отражается на процессах самоочищения и делает почвы опасными в санитарном отношении.

Таким образом, полиарены оказывают влияние на экологическое равновесие биоценоза почвы, интенсивность почвообразовательных процессов. Вышеописанное приводит к засолению, увеличению щёлочности или кислотности почвы, минерализации гумуса.

Обзор литературных данных показал, что ПАУ, находясь в почве, проявляют как ингибирующий, так и стимулирующий эффект на рост и развитие растений.

В работе [7] авторы установили, что полиарены влияют на упорядоченное расположение хлоропластов и мешают переносу электронов и фотонов в процессе фотосинтеза. Так, у высших растений фенантрен и пирен вызывают снижение роста, содержание пигмента, устьичную проводимость.

Селективность некоторых растений к полиаренам связана с их биофильностью и спецификой функционального назначения. Так, при исследовании генотоксичности бенз[*a*]пирена для растений рода *Tradescantia* (традесканция) выявлено, что продукты метаболизма бенз[*a*]пирена оказывают на растения ауксиновое действие, влияя на рост биомассы корней и размер клеток [109]. Изучение действия ряда полиаренов на рост и развитие ивы белой (*S.alba*) привело к выводу, что возрастание токсичного эффекта на растение связано с увеличением растворимости полиарена в воде и их концентрацией. Так низкие концентрации нафталина положительно влияют на развитие растения, в то время как высокие концентрации приводят к его гибели [22]. Работа [79] иллюстрирует подавляющее действие нафталина в концентрациях от 2,0 до 20,0 мкг/мл на прирост биомассы клеток сахарного тростника; минимальная ингибирующая концентрация аценафтена и аценафтилена наблюдалась при 10,0 мкг/мл.

### **1.5 Дегградация ПАУ в почвах**

Полиарены могут не только подвергаться в почвах дегградации и трансформации, вызванной микроорганизмами, химическими веществами,

физическими факторами, но и накапливаться в растительных организмах. Далее были рассмотрены методы ремедиации почв, основанной на деградации ПАУ.

### **1.5.1 Микробная деградация**

Биодеградация есть разложение сложных веществ, материалов в результате жизнедеятельности живых организмов. В некоторых случаях биодеградации, например, фиторемедиации, происходит накопление поллютантов в частях растения или микроорганизмах.

Биодеградация характерна для лёгких полиаренов, содержащих 2-3 ароматических кольца. Высококонденсированные ПАУ окисляются очень медленно.

Способность к биодеградации ПАУ обусловлена наличием у микроорганизмов плазмид деградации. Микроорганизмы способны использовать ПАУ в качестве источников углерода и энергии для роста. Это было продемонстрировано путём создания культур микроорганизмов, отобранных из семи участков приливных отложений вдоль патагонского побережья Аргентины. Культуры были созданы в питательной среде с добавлением нафталина или фенантрена в качестве единственного источника углерода и энергии. По истечению 15 дней эксперимента ДНК извлекали из каждой популяции бактерий, обогащённых нафталином или фенантrenom, и анализировали с помощью ПЦР и денатурирующего градиентного гель-электрофореза. Анализ популяций показал, что ДНК бактерий не зависит от места отбора приливных отложений. Вместо этого были зафиксированы кластеры, образовавшиеся в зависимости от углеводорода, используемого в качестве углерода и источника энергии (фенантрен или нафталин). Популяции бактерий, выделенные из культур, выращенных с добавлением ПАУ, и популяции из загрязнённых отложений были идентифицированы путём секвенирования РНК. Анализ последовательности гена 16S РНК позволил определить родство бактерий с родом *Pseudomonas* и типом *Actinobacteria*. Выделенные бактерии рода *Pseudomonas* были способны

удалять 100% нафталина и 65% фенантрена соответственно. Штаммы *Actinobacteria* не могли эффективно удалять нафталин и фенантрен, однако некоторые из них были способны удалить до 19% пирена за 21 день. Отмечено, что бактерии при деградации ПАУ для преодоления их низкой биодоступности, выражаемой в малой растворимости в воде, продуцировали внеклеточные полимерные вещества, способствующие доступности и поглощению полиаренов [6].

В почве микробная деградация протекает активнее, чем в донных отложениях. Это связано с наличием в почве питательных веществ на основе азота и фосфора в большем количестве, чем в водной среде.

Путь микробной деградации некоторых представителей полиаренов изучен. В общем случае он реализуется нижеописанным образом.

Разрушение полиаренов в аэробных условиях начинается с введения одной или двух гидроксильных групп в орто- и пара-положения по отношению друг к другу. Если произошло введение одной гидроксильной группы, то далее процесс биodeградации будет катализироваться монооксигеназами. Наличие двух групп приводит к катализу диоксигеназами, воздействующих на ароматическое кольцо. Протекают реакции образования алифатических соединений путём разрыва ароматических колец. Алифатические соединения катаболизируются с образованием нетоксичных метаболитов [25].

При этом их пути деградации различны в зависимости от таксономической принадлежности микроорганизмов. Например, штамм ризобактерий *E. Meliloti* способен подвергать деградации фенантрен с образованием следующих веществ: 9,10-дигидро-9,10-дигидроксифенантрена, 9,10-фенантренхинона, 1-гидрокси-2-нафтойной, 2,2-дифеновой и салициловой кислот [88].

У ряда микроорганизмов описан путь деградации нафталина через гентизиновую кислоту. Катаболизм нафталина наиболее изучен через гентизат у штамма *Ralstonia sp. U2* [12].

Активные культуры микроорганизмов способны метаболизировать от 70 до 80% бенз[а]пирена от внесённого количества за 10 суток, в то время как собственная микрофлора почвы разрушает не более 50%. Однако микроорганизмы не могут разрушить большее количество ПАУ, к которому они адаптированы. Так, резкое увеличение количества полиаренов приводит к уменьшению содержания метаболизированных структур в почве.

В ходе биодegradации растения могут испытывать как положительный, так и отрицательный эффект от полиаренов. Объяснениями этого эффекта служат два факта: подобие химической структуры полиарена на гормон роста и влияние полиаренов на соотношение ауксинов и цитокининов, которое контролирует рост и развитие растений [29].

Корни растений в процессе жизнедеятельности выделяют такие органические вещества, как: аминокислоты, сахара и карбоновые кислоты. Они создают благоприятную среду для развития бактерий. Благодаря этому процессы биодegradации интенсивно протекают в ризосфере [55].

Интродуцирование хемотаксически активных микроорганизмов в ризосферу растений имеет положительный эффект. Микроорганизмы колонизируются в прикорневой зоне, разрушают полиарены, тем самым снижая токсическое воздействие ПАУ на растения [21].

#### **1.5.1.1 Ризосфера**

Живые организмы биосферы постоянно находятся в контакте с друг другом. Взаимодействия между ними могут носить различный характер. Основными являются нейтральный, симбиотический, паразитический.

Микроорганизмы населяют все среды обитания. Наибольшая их численность сосредоточена в почве. Между растениями и микроорганизмами почвы наблюдаются многочисленные примеры симбиоза [86], [87], [94], [100], [107].

Наиболее активно микроорганизмы контактируют с высшими растениями в ризосфере, которая представляет собой окружающее корень пространство почвы. Оно невелико и составляет до 8 мм. Для ризосферы

характерна высокая плотность микроорганизмов по сравнению с почвой вне её, что отображено на рисунке 3 [85].

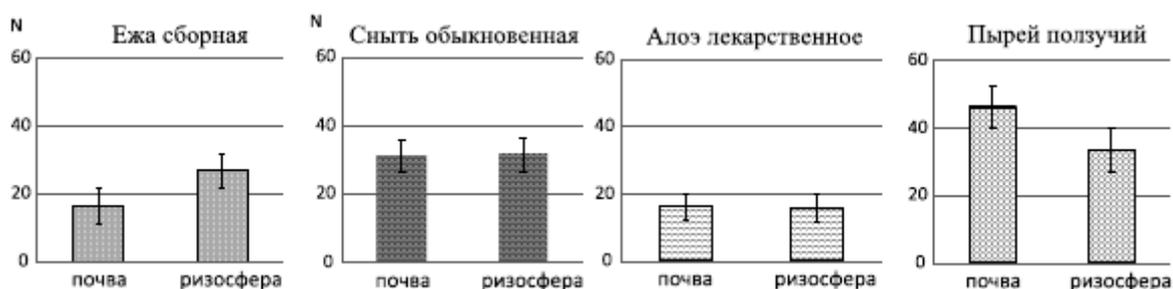


Рисунок 3 – Численность клеток бактерий, определённая методом каскадной фильтрации в почве, ризосфере в растениях: ежа сборная, сныть обыкновенная, алоэ лекарственное, пырей ползучий,  $N=10^7$  кл/г

Высокая численность бактерий в ризосфере обусловлена тем, что корни растений в процессе жизнедеятельности выделяют органические, физиологически активные и неорганические вещества, которые создают благоприятную среду для развития бактерий [85].

Для микрофлоры ризосферы характерно наличие грамотрицательных бактерий родов *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Xantomonas* и др., грамположительных бактерий рода *Bacillus*, актинобактерий родов *Nocardia*, *Micromonospora*, *Streptomyces* и др., микроскопических грибов родов *Penicillium*, *Gliocladium*, *Talaromyces*, *Humicola* и другие [21].

Качественный и количественный состав микробиоценоза ризосферы специфичен для каждого вида растения. На данный момент изучены микрофлора ризосферы у представителей семейств злаковых, бобовых и паслёновых [30], [47], [97], [108].

Исследования показывают, что основную массу прикорневой микрофлоры составляют бактерии рода *Pseudomonas*. Так на рисунке 4 показано количество данных бактерий в ризосфере гороха посевного (*Pisum*

sativum) составляет 37,7%, фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) – 38,4%, подсолнечника масличного (*Helianthus annuus*) – 42,5% [41].

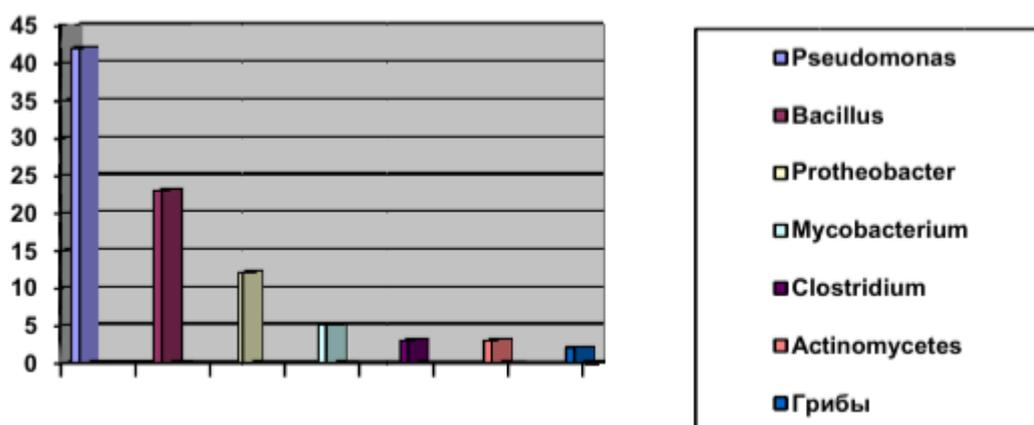


Рисунок 4 – Количественный состав ризосферной микрофлоры *Helianthus annuus*

Так как большее количество бактерий в ризосфере представлено *Pseudomonas*, они будут далее рассмотрены более подробно.

#### 1.5.1.2 Бактерии рода *Pseudomonas*, их участие в биодegradации

Среди грамотрицательных бактерий, занимающих наибольший процент численности в ризосфере, выделяют бактерии рода *Pseudomonas*. Доказано, что некоторые представители данного рода благотворно влияют на рост и развитие растения. Механизмы положительного влияния делят на несколько типов.

К первому типу относят синтез бактериями различных метаболитов полезных для растений, что непосредственно стимулирует их рост. Данное свойство используется для создания эффективных фунгицидов. Так, *P. fluorescens* штамм AP-33 содержит в метаболитах архидоновую кислоту и элиситоры, которые усиливают ростовые процессы в растениях, продуктивность и устойчивость к различным неблагоприятным факторам среды. Данный штамм является действующим веществом препарата «Планриз» [78].

Во втором типе механизмов положительного влияния выделяют вытеснение или подавление бактериями развития почвенных фитопатогенов или микроорганизмов, угнетающих развитие растения.

Авторы работы [32] выделили бактерии *P. fluorescens* из ризосферы семейства тыквенных (*Cucurbitaceae*) и установили, что полученный штамм обладает антагонистической активностью в отношении *E. coli* и *S. aureus*.

Бактерии рода *Pseudomonas*, адаптировавшиеся к загрязнённой почве, обладают плазмидами, определяющими способность использовать для своей жизнедеятельности различные поллютанты, если они являются единственным или преобладающим источником углерода.

Бактерии рассматриваемого рода в отношении полиаренов обладают большим катаболическим потенциалом. Они в зависимости от сложности структуры полностью утилизируют или частично трансформируют ПАУ [92].

На рисунке 5 описан общий путь деградации нафталина **6** для микроорганизмов через гентизиновую кислоту **7**. Для каждого промежуточного продукта реализуется индивидуальный механизм биоразложения, осуществляемый различными ферментными системами (*nah X*). Образовавшиеся карбоксилированные соединения используются в качестве интермедиатор цикла Кребса при наличии в штамме ферментов дальнейшего окисления [88].

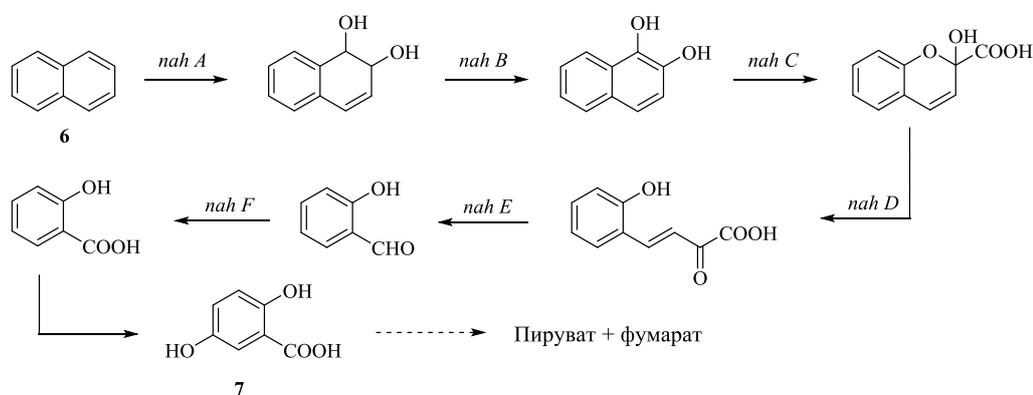


Рисунок 5 – Путь биodeградации нафталина

Установлено, что штамм *P. fluorescens* 26К способен к деградации фенантрена [33]. Данный штамм трансформирует фенантрен 8 до конечного продукта – *o*-фталевой кислоты (рисунок 6). Образование конечного продукта протекает через фенантроненон 9, который претерпевает превращение в 7,8-бензокумарин 10 и продукты расщепления одного из ароматических колец 11. Биоконверсия продуктов расщепления до 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты 12 протекает быстро. Дальнейшее превращение до *o*-фталевой кислоты 13 происходит через лаг-период.

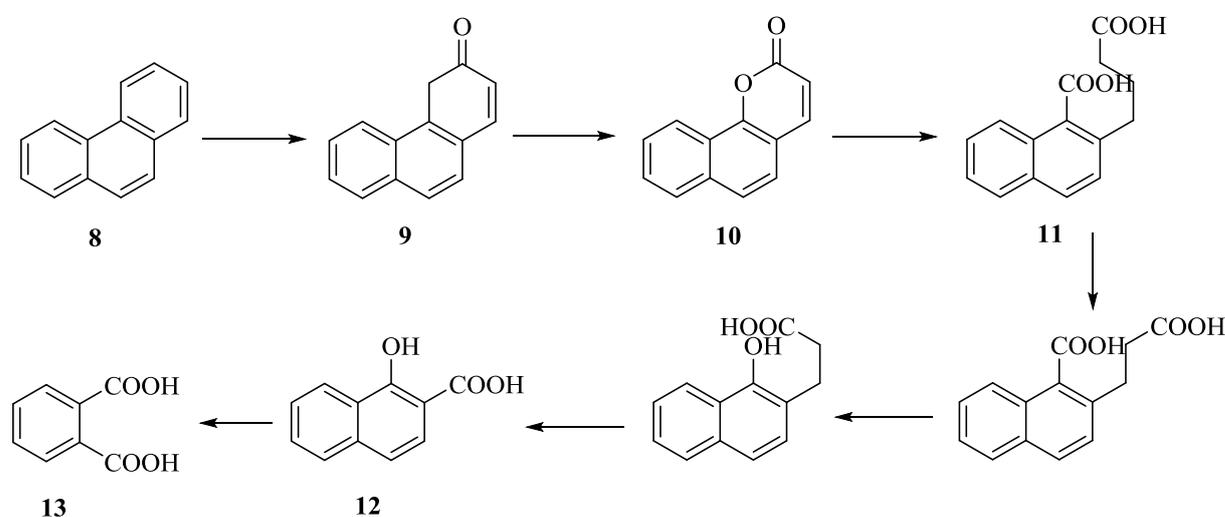


Рисунок 6 – Схема превращения фенантрена штаммом *P. fluorescens* 26К

Путь деградации полиарена может отличаться для различных видовых групп бактерий одного рода. Так, мутантный штамм *P. putida* BS3701-P способен трансформировать фенантрен 8 до катехола 14 с дальнейшим орто- и мета-расщеплением (рисунок 7) [68].

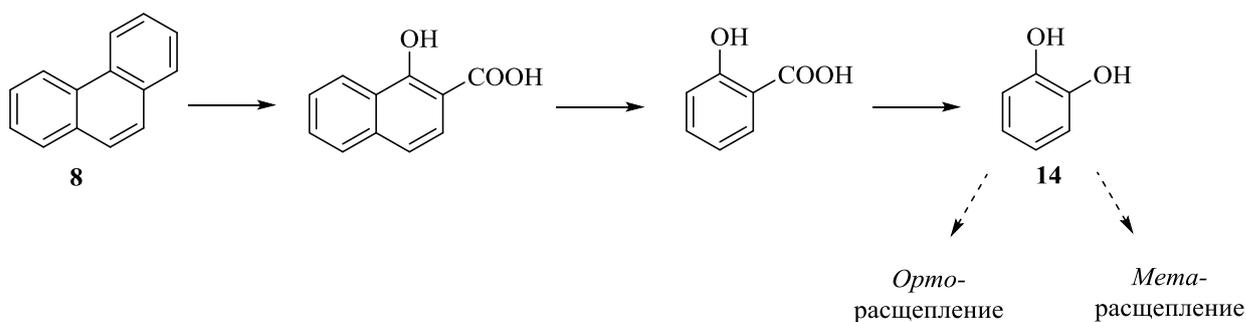


Рисунок 7 – Схема трансформации фенантрена штаммом *P. putida* BS3701-P

Штамм *P. fluorescens* 26К способен деградировать не только фенантрен, но и антрацен. Основным продуктом биодegradации антрацена 15 является 2-гидрокси-3-нафтойная кислота 16, в небольших количествах образуются 2,3-дигидроксинафталин 17 и антрахинон 18 (рисунок 8) [33].

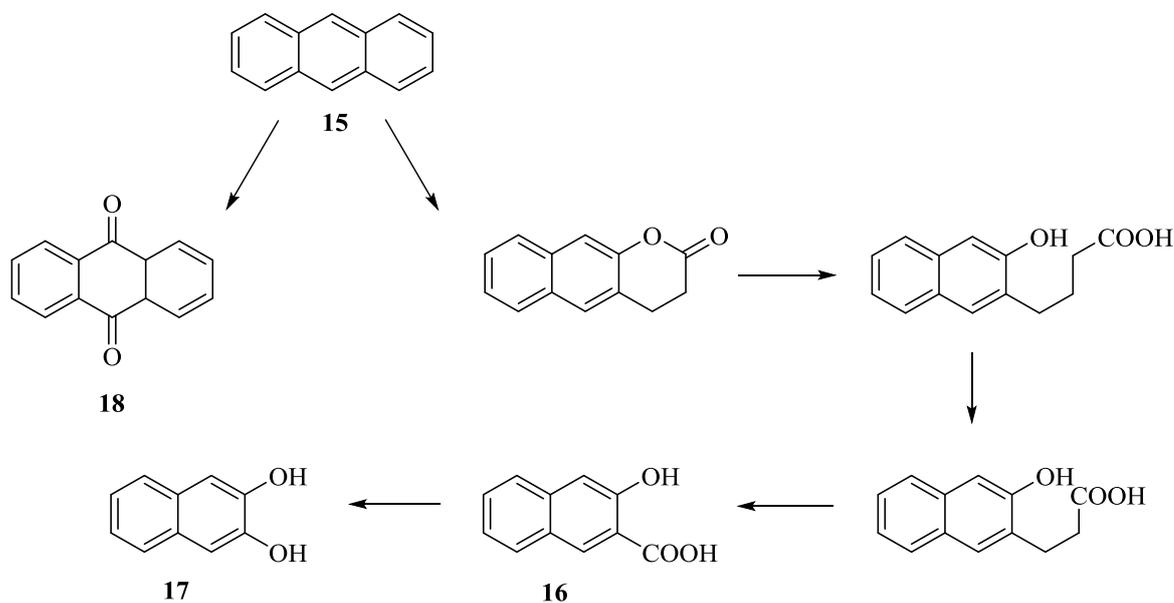


Рисунок 8 – Схема превращения антрацена штаммом *P. fluorescens* 26К

Среди продуктов биодegradации ПАУ присутствуют вещества, представляющие интерес для промышленности и селективных целей. Так, растворы 2-гидрокси-3-нафтойной кислоты в присутствии фенантролина

может служить экстрагентом редкоземельных металлов из слабощелочных сред [52]. *O*-фталево́й кислота подавляет способность патогенов *Clavibacter michiganensis* ssp. *Sepedonicus*, *Pectobacterium carotovorum* ssp. *Carotovorum*, поражающих паслёновые, образовывать биоплёнки [105]. Это свойство может использоваться для разработки защитных препаратов.

### **1.5.2 Химическая деградация**

Использование химических методов очистки почвы от полиаренов в основном используется при утилизации загрязнений нефтепродуктами, которые содержат ПАУ. Преимуществом данного метода является то, что очистка протекает за короткий промежуток времени. Негативный аспект отражается в повторном загрязнении окружающей среды продуктами химических реакций и в необходимости экскавации грунта к месту очистки.

Недавние исследования показали, что реагенты Фентона могут использоваться для удаления ПАУ, адсорбированных в иле, почве и отложениях. Однако реагенты Фентона имеют недостатки, заключающиеся в образовании осадка, контроле водородного показателя и необходимости высоких концентраций перекиси водорода, что ограничивает практическое применение технологии на больших территориях. Существует относительно безопасная технология, использующая пероксидные соединения и озон. Использование озона объясняется тем, что он фрагментирует полиарены на простые, растворимые и биоразлагаемые соединения посредством прямого окисления и реакций с участием радикальных промежуточных продуктов. Пероксид водорода, который является сильным окислителем, в сочетании с озоном повышает эффективность окисления ПАУ за счет образования дополнительных гидроксильных радикалов. Метод ремедиации почвы следующий: загрязнённый грунт промывают в течение 30 минут озоном со скоростью потока 0,4 л/мин, содержащем пероксид водорода в концентрации 60 моль/л. Данный способ позволяет удалить 89% флуорена, 66% фенантрена, 71% антрацена и 81% для дибенз[*a,h*] антрацена из почвы [13].

Авторы работы [27] предлагают использование химическое окисление поллютантов в совокупности с микроорганизмами. На первом этапе утилизации загрязнения в почву вносят консорциум штаммов бактерий или монокультуру представителей рода *Pseudomonas*, *Alcanivorax*, *Microbulbifer* или *Burkholderia*. Через несколько дней вносят окислитель - активированный персульфат, перманганат калия или реагент Фентона. Деградация полиаренов, содержащих 5-6 колец, составила 78-90%, трансформация ПАУ с 2-4 кольцами достигла 52–85%. Описанный метод отличается от предыдущего более высокой скоростью утилизации загрязнения почвы и экологической безопасностью.

Таким образом, выше описанные технологии рекультивации земель обладают следующими недостатками: трудоёмкость и высокая стоимость, что связано с экскавацией грунта, транспортировкой, утилизацией загрязнения и возврата грунта к месту его выемки. Однако химические методы очистки почв находят своё применение при среднем (2-5 ПДК) и высоком (более 5 ПДК) уровнях загрязнения, когда концентрации токсичных веществ губительны для большинства живых организмов [58].

### **1.5.3 Физическая деградация**

Физические методы очистки почвы применяются при высоком уровне загрязнения. Так, при загрязнении грунта бенз[*a*]пиреном 0,1 мг/кг (5 ПДК) рекомендуют экскавацию почвы и дальнейшее её захоронение [82]. Снятый слой почвы хранится в могильнике, который оказывается источником вторичного загрязнения. Вероятно, что далее необходимо применение, например, химического метода детоксикации полиаренов.

Полициклические углеводороды характеризуются низкой растворимостью, поэтому не подвергаются вымыванию из почв. Однако концентрация полиаренов в почвах может уменьшаться путём их слабой миграции в коллоидных растворах с частицами почвы. На данный перенос будут оказывать влияние количество осадков и характер почвы. Выявлено, что количество ПАУ увеличивается при переходе от песчаных почв к

суглинистым. Поэтому сорбция ПАУ определена адсорбцией гуминовых кислот на глинистых минералах. Увеличение подвижности тяжёлых замещённых и голоядерных полиаренов зафиксировано в засоленных почвах. Продукты деградации полиаренов более подвижны – они подвергаются интенсивной радиальной миграции, однако полициклические углеводороды также мигрируют в нижние слои почвы с корнями растений [1].

В большинстве своём ПАУ представляют собой нелетучие соединения, поэтому в условиях высокой влажности почвы и температуры окружающей среды происходит испарение будет только лёгких полиаренов. Термическая деградация полиаренов возможна при продолжительном тёплом сезоне. В работе [24] показано, что в тропических почвах при высокой сумме активных температур деградации подвергается нафталин.

Можно сделать вывод, что физические методы деградации полиаренов не отличаются эффективностью. При экскавации нарушается морфологическая структура рекультивируемого участка, что способствует ветровой и водной эрозии. Миграция полиаренов и термическая деградация осуществимы не на всех типах почв.

#### **1.5.4 Физико-химическая деградация**

Фотохимические превращения полиаренов протекают столь же интенсивно, как и микробиологическое окисление неароматических углеводородов нефти. Большинство полиаренов интенсивно поглощает УФ-излучение и фотоокисляется с образованием хинонов и карбонильных соединений.

Фотоокисление антрацена протекает под действием синглетного кислорода в случае аценовой структуры полиарена. Если пиреновая структура, то более вероятен процесс одноэлектронного окисления арена в активированном, триплетном состоянии. В ходе реакции образуются пероксиды, пиролиз или фотолиз которых приводит к разрыву алкильных цепей и кольца. Если существуют пространственные затруднения для образования пероксидов, то конечным продуктом реакции являются хиноны.

Так, при фотодеградациии бенз[*a*]пирена 1 образуются бенз[*a*]пирен-1,6-дион 19, бенз[*a*]пирен-3,6-дион 20 и бенз[*a*]пирен-6,12-дион 21 (рисунок 9). Установлено, что антрацен в течение 20 минут подвергается окислению на 84.5%. [70]

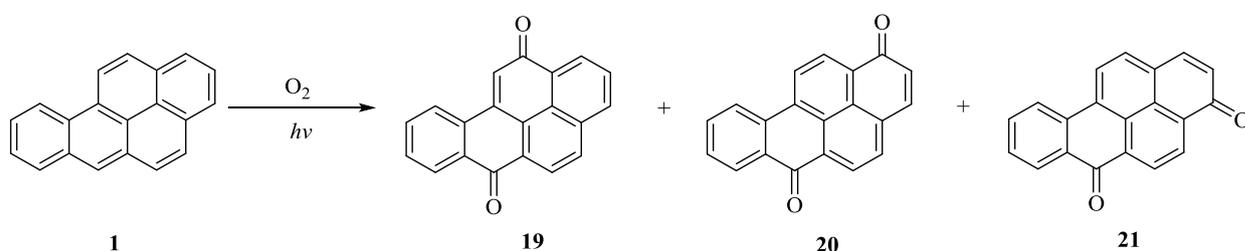


Рисунок 9 – Фотоокисление бенз[*a*]пирена

Исследован фотолиз на поверхности почвы под действием УФ-излучения для трёх полиаренов: бенз[*a*]пирен, пирен, фенантрен. Отмечено, что фотодегградация данных полиаренов на поверхности почв протекает эффективнее при увлажнённости почвы и хорошей интенсивности света. Кроме этого на интенсивность фотолиза влияют температуры окружающей среды и размер почвенных частиц. При большом размере почвенных частиц между ними остаётся пространство для рассеивания света, что увеличивает проникновение УФ-излучения и деградацию ПАУ. Фотолиз полициклических углеводородов на поверхности почвы в присутствии кислорода происходит по кинетике псевдопервого порядка. Период полураспада при фотолизе составляет от 37 до 87 дней для бенз[*a*]пирена и от 58 до 73 дней для фенантрена.

Разложение исследуемых полиаренов на поверхности почвы как в аэробных, так и в анаэробных условиях следует последовательности: бенз[*a*]пирен > пирен > фенантрен, что указывает на то, что разложение ПАУ связано со спектрами поглощения на поверхности почвы и окислением. - полувольтные потенциалы. Инициаторами фотоокисления могут являться: тетрахлорметан, сероуглерод и соли тяжёлых металлов [28].

Несмотря на высокую скорость окисления эффективность данного метода мала, так как полиарены будут подвергаться деградации лишь в небольшом поверхностном слое почвы. Поэтому данный метод применим при поверхностном небольшом загрязнении (менее 1 и 1-2 ПДК) [58].

### 1.5.5 Фиторемедиация

Фиторемедиация представляет метод очистки гидро-, педо- и атмосферы с помощью растений. В данной технологии используются природные процессы, с помощью которых растения и ризосферные микроорганизмы деградируют или накапливают различные загрязнители.

Фиторемедиация в настоящее время активно используется для восстановления почв, загрязнённых радионуклеидами и тяжёлыми металлами [39], [57], [96]. В меньшей степени описаны работы, посвящённые деградации полиаренов в почве. Известно, что фиторемедиация почв, загрязнённой ПАУ, включает в себя несколько подходов, направленных на восстановление почв, которые представлены в таблице 3 [99].

Таблица 3 – Характеристика фиторемедиационных технологий

Название технологии	Удаляемые вещества	Принцип технологии
Ризодеградация	Углеводороды, нефтепродукты, толуол, бензол, ксилол, полиароматические соединения, гербициды и др.	Разрушение токсичных соединений в почве микроорганизмами ризосферы до поступления токсикантов в организм растений
Фитоэкстракция	Тяжёлые металлы, радионуклеиды, частично органические загрязнители	Поглощение токсикантов корнями и их накопление в надземных частях растений
Фитодegradация	Органические загрязнители: алифатические, ароматические и полициклические углеводороды, фенолы, гербициды и тд.	Основан на ферментативном разложении загрязняющих веществ в организме растений

При использовании фитоэкстракции подбирают виды растений, характеризующиеся толерантностью к поллютантам. Их выращивают определённый период на загрязнённых территориях. Растения за период своего развития извлекают корневой системой загрязнитель, концентрируя его в надземной биомассе.

Например, из литературных данных известно, что максимальным накоплением ПАУ среди болотных видов отличаются мох политрихум сжатый (*Polytrichum strictum*), деревья: ель обыкновенная (*Picea abies*), берёза пушистая (*Betula pubescens*) и кустарники: ива лопарская (*Salix lapponum*) и берёза карликовая (*Betula nana*) [112]. Из тундрового фитоценоза отличаются высокой накопительной способностью мхи: плеурозий Шребера (*Pleurozium schreberi*), кукушкин лён обыкновенный (*Polytrichum commune*) и травянистые растения: луговик дернистый (*Deschampsia caespitosa*), овсяница овечья (*Festuca ovina*) [111]. На территории Южной Сибири выделены следующие растения, устойчивые к ПАУ: козлятник лекарственный (*Galega officinalis*), люцерна посевная или синяя – (*Medicago sativa*) [84]. Показано, что остаточные количества токсикантов были минимальны под посевами бархатца прямостоячего (*Tagetes erecta*), и костреца безостого (*Bromopsis inermis*) [62]. Перечисленные выше растения могут использоваться для фиторемедиации земель на территориях, к чьим климатическим условиям приспособлены.

Однако стоит учитывать, что растения, участвующие в фитоэкстракции, не могут в дальнейшем быть включены в пищевую цепь или фармацевтическую промышленность, так как содержат значительные концентрации токсикантов. Таким образом, необходим поиск возможных вариантов использования растений после фиторемедиации.

#### **1.5.5.1 Использование растительного сырья после фитоэкстракции**

Область использования растений после фитоэкстракции может включать в себя длительные высокотемпературные процессы, так как ПАУ в таком случае подвергаются деструкции. Так растительный материал можно:

- сжечь,
- использовать для производства целлюлозной продукции.

Первый вариант протекает с образованием сажи, которая попадает в атмосферный воздух и разносится на несколько тысяч километров при определённых метеорологических условиях. Стоит отметить, что сажа является не только аэрозольным загрязнителем атмосферы, но и канцерогеном, способны вызвать респираторные заболевания, ишемическую болезнь сердца, патологии при беременности [103]. Последнее связано с тем, что твёрдые частицы менее 5 мкм не отфильтровываются в верхних дыхательных путях и проникают глубоко лёгкие, достигая поверхности альвеол, и далее – в кровеносную систему [61]. Таким образом, сжигание в качестве способа утилизации растительных отходов не может быть использовано.

Ежегодно растут потребности населения на изделия из целлюлозы. Пандемия COVID-19 оказала значительное влияние на целлюлозно-бумажную промышленность – ежегодный прирост спроса на целлюлозно-бумажную продукцию в России составлял 2,5% с 2017 по 2019 года, в 2020 году из-за вспышки COVID-19 спрос увеличился на 6% [53]. Рост мощностей целлюлозно-бумажных предприятий, связанных с потребностями населения, происходит на фоне колоссального масштаба вырубки лесов – по оценкам учёных, ежегодно мир теряет более 9 миллионов гектар леса [90].

Для сокращения потерь лесных массивов используют не только макулатуру, но и разрабатываются способы получения целлюлозной продукции из отходов растительного сырья [34], [35], [43], [44], [95].

В общем случае из-за разницы химического состава растительного сырья с лиственной древесиной, используемой в промышленности, способ получения целлюлозы имеет ниже описанный вид.

Из высушенной растительной массы извлекают на первой стадии восковую фракцию с помощью горячей воды и спиртобензольной смеси. На второй стадии извлекают водорастворимую фракцию экстракцией 0,3%

раствором соляной кислоты в течении 3-5 часов. Полученный экстракт фильтруют, нейтрализуют, упаривают и высушивают. Аморфный диоксид кремния, входящий в состав механических тканей растения, извлекают на третьей стадии путём обработки 1 Н раствором гидроксида натрия при 90 °С в течение 60 мин с последующим осаждением диоксида кремния соляной кислотой. На последней четвёртой стадии проводят окислительно-органосольвентную варку лигноуглеводного материала 90 минут при 90°С с помощью смеси, содержащей равновесную пероксиуксусную, уксусную кислоты и пероксид водорода. По окончании процесса варки целлюлозу промывают, анализируют [45].

Стоит учитывать, что температуры процессов экстракции и варки, как и их продолжительность, могут варьироваться в зависимости от химического состава используемых частей растения.

Таким образом, использование растений после фитоэкстракции возможно для изготовления целлюлозной продукции, что экологично и перспективно для сохранения лесного массива и мирового леса, что влечёт за собой снижение парникового эффекта.

#### **1.5.5.2 Использование растительного сырья после ризодеградации**

При ризодеградации полиарены не поступают в растительный организм, что позволяет использовать полученную биомассу для:

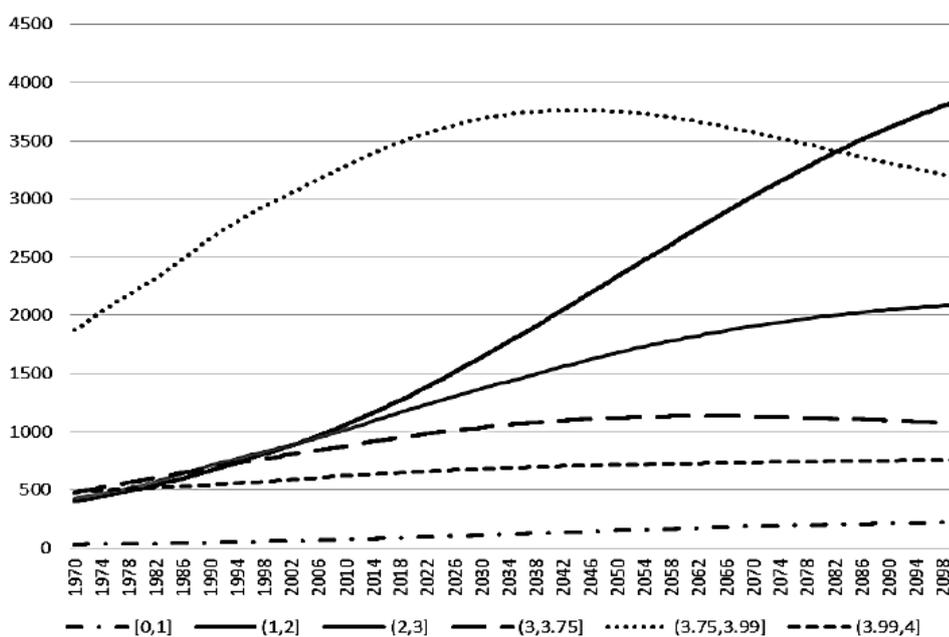
- изготовления целлюлозной продукции [34], [35], [43], [44], [95],
- получения зелёных красителей [63],
- увеличения плодородия почвы в качестве сидератов [49], [65], [80].

Первый вариант использования растительной биомассы был рассмотрен выше.

В качестве зелёных красителей в пищевой промышленности используют хлорофилл. Синтез хлорофилла представляет собой многоступенчатый сложный процесс. Поэтому используют природные пигменты, выделяемые из растений в течение нескольких стадий. На первой стадии измельчённую биомассу обрабатывают гексаном для отмывания

каротина. На второй стадии твёрдый остаток многократно настаивают в 80% растворе ацетона для извлечения хлорофилловый и ксантофилловый пигменты. На третьей стадии хлорофилл извлекают гексаном из разбавленного водой ацетонового экстракта. Далее гексановый экстракт упаривают и охлаждают до выпадения кристаллов хлорофилла [54].

Вопрос увеличение плодородности почвы в настоящее время стоит остро, так как в абсолютном выражении численность населения планеты к 2050 году возрастет более, чем в два раза, что отражает рисунок 10 [60]. При этом увеличение посевных площадей не представляется возможным.



Уровни глобальной интеграции: от 3.99 до 4.00 – лидеры; от 3.75 до 3.99 – страны с высоким уровнем; от 3 до 3.75 – страны с уровнем глобальной интеграции выше среднего; от 2 до 3 – страны со средним уровнем; от 1 до 2 – страны с низким уровнем; от 0 до 1 – страны с самым низким уровнем

Рисунок 10 – Реальная и прогнозируемая динамика численности населения (млн. человек) для групп стран с различными уровнями глобальной интеграции

Как известно, около половины прироста урожая человек получает за счёт минеральных удобрений. Однако вносить минеральные удобрения необходимо строго по научно обоснованным нормам, дозам, периодам и

срокам. В противном случае, удобрения могут нанести вред окружающей среде. Альтернативой минеральным удобрениям служат сидеральные культуры, которые разлагаясь в почве, насыщают её полезными веществами. Например, после разложения 35-40 т/га зеленой массы горчицы сарептской для последующей культуры становится доступно до 90 кг/га нитрата азота, 30 кг/га подвижного фосфора, 100 кг/га обменного калия [80]. Использование сидератов не только повышает урожайность, но и улучшает агрохимические, водно-физические свойства почвы и качество выращиваемых продуктов [49].

Таким образом, растительная биомасса после ризодеградации может использоваться в выше описанных областях. Перспективной областью является использование биомассы в качестве сидератов. Это позволяет восстановить деградирующую педосферу и снизить использование минеральных удобрений, способных при неправильном использовании загрязнять почву и воду.

## **1.6 Особенности почвы как объекта исследования**

Каждый объект исследования уникален. Он характеризуется своим набором свойств, отражающихся на особенностях анализа. Почва не исключение.

Почва представляет собой многофазную полидисперсную гетерогенную систему. При её рассмотрении как химической системы выделяют ряд особенностей: гетерогенность, дисперсность, полихимизм, разнокачественность состава, динамика свойств. Необходимо описать данные особенности более подробно.

Гетерогенность. В составе почв выделяют несколько фаз: твёрдая фаза почвы, состоящая из твёрдых частиц; почвенный раствор, в котором содержатся минеральные, органические и органоминеральные вещества в виде ионных, молекулярных и коллоидных форм; почвенный воздух; живое вещество. Каждая из фаз будет характеризоваться своим химическим

составом. Поэтому в настоящее время, проводя исследования почв, определяют показатели, характеризующие её в целом и отдельные фазы [59].

Дисперсность. Твёрдая фаза почвы состоит из частиц различного размера. В зависимости от дисперсности частиц варьируется способность к ионному обмену, показатели которого отражаются на химических и физических свойствах почвы [71].

Полихимизм. Почва содержит практически все химические элементы. Один химический элемент может встречаться в составе нескольких соединений. Например, в почве находится как элементарная сера, так и входящая в состав органических (гумус) и неорганических веществ (сульфаты кальция и магния) [37], [67].

Разнокачественность. Каждый тип и вид почвы имеют различные свойства, что определяется составом почвообразующих пород, влияющих на технологические свойства и плодородия земель [93].

Динамика свойств. Химический состав почв непрерывно варьируется даже в пределах одного генетического горизонта, что связано с процессами выветривания, почвообразования и трансформации веществ [76].

Благодаря выше описанным свойствам почвы, существует три вида отбора почвенных образцов: по генетическому горизонту, послойный профильный и смешанный.

Для первого вида отбор образца осуществляют из разрезов в наиболее характерных местах, чтобы образец почвы был типичен для большей части исследуемой территории.

Второй способ более трудоёмок, так как исследованию подвергается каждый слой почвенного профиля. Он позволяет устанавливать механизмы трансформации веществ в конкретных почвенных условиях.

Третий способ применяют при исследовании обширных территорий, когда смешанный образец состоит из 20-25 точечных проб и может адекватно охарактеризовать исследуемую местность.

Ранее описанные свойства почвы как сложной химической системы требуют приданию исследуемому образцу почвы однородности. Однородность необходима для того, чтобы каждая отобранная аналитическая проба была репрезентативной.

Процедура подготовки почвы к анализу включает в себя высушивание почвы до воздушного состояния, тщательное перемешивание образца и удаление включений органического и неорганического происхождения, новообразований, измельчение почвы, просеивание через сито с диаметром отверстий 1 мм. Оставшуюся на сите почву подвергают измельчению до тех пор, пока все частица не пройдут через сито.

Далее пробу наиболее часто усредняют методом квартования. Измельчённую почву перемешивают и рассыпают на кальке тонким слоем в виде круга или квадрата. Делят на четыре сектора, из которых два противоположных друг другу удаляют, оставшиеся смешивают между собой. Квартование проводят до тех пор, пока масса исследуемого образца не достигнет желаемой [69].

Из полученного описанным способ почвенного материала получают необходимые вытяжки.

### **1.6.1 Экстракция ПАУ из почв**

Традиционно химическому анализу подвергаются экстракты, полученные из исследуемых твёрдых объектов. Извлечение полициклических ароматических углеводородов из почв сопряжено с определёнными трудностями – в почвах содержатся пигменты, лигнин, липиды, углеводы, гумин, гумусовые кислоты, дубильные вещества и многие другие, которые переходят в некотором количестве в экстракт. Таким образом, извлечение ПАУ из почв должно протекать селективно или с минимальными количествами посторонних соединений, которые эффективно удаляются в процессе концентрирования полиаренов в экстракте.

В работе [40] авторы сравнили некоторые полярные и неполярные экстрагенты по эффективности друг с другом в извлечении полиаренов. Так,

в экстракте, полученном с помощью изопропанола, найдены производные холестерина и другие стероиды, алкильные производные фенола, сложные эфиры и предельные углеводороды. С помощью хлороформа получен экстракт, содержащий хлорпроизводные углеводородов и малые количества сложных эфиров. Наиболее селективным экстрагентом является гексан. При извлечении ПАУ с его помощью экстракт содержит значительное количество тяжёлых линейных углеводородов, время удержания которых значительно меньше времени удерживания полиаренов, что позволяет идентифицировать ПАУ с помощью хроматографического анализа.

Таким образом, авторы предложили следующую методику экстракция ПАУ: образец почвы экстрагируют гексаном при температуре 50°C в течение 60 минут. Полученный экстракт отфильтровывают от твёрдых частиц на фильтре с размером пор 0,45 мкм, пропускают через колонку с силикагелем, промывают гексаном, упаривают досуха и разбавляют в малом количестве гексана.

Статья [72] даёт сравнительную характеристику полярных растворителей и ионных жидкостей для проведения экстракции ПАУ. Рассматривались такие полярных растворителей, как ДМФА, ДМСО, ацетонитрил, этиленгликоль, и ионные жидкости: н-гексан – ацетат N-метилбутилимидазолия ( $\text{ButMetIm}^+\text{Ac}^-$ ) и н-гексан – тетрафторборат N-бутилпиридиния ( $\text{ButPy}^+\text{BF}_4^-$ ). Наибольшей эффективностью обладают ДМСО, ДМФА и ионные жидкости. Однако последние характеризуются коррозионной активностью, высокой вязкостью и высокой стоимостью, что делает их непригодными для работы.

Экстракция ПАУ в смеси гексана и ацетона (1:1) с дальнейшим использованием аппарата Сокслета характеризуется более жёстким температурным режимом, сохраняющимся длительное время во время горячей экстракции и дальнейшем упариванием. Таким образом, ПАУ подвергаются деструкции и степень их извлечения составляет менее 40% [8].

Популярность пользуется пробоподготовка «QuEChERS» (аббревиатура достоинств методики: быстрый, лёгкий, дешёвый, эффективный, надёжный, безопасный), применяющаяся для анализа различных объектов [31], [42], [98].

Рассматриваемая методика для извлечения ПАУ из твёрдых образцов использует состоит из двух этапов: экстракции и очистки с помощью дисперсионной твёрдофазной экстракции. Экстракция осуществляется забуференным ацетонитрилом с одновременным высаливанием воды из водной пробы с помощью безводного сульфата магния, который необходим для разделения двух жидких фаз. Очистка алиquotы из органического слоя реализуется дисперсионной твердофазной экстракцией. Для этого используют сочетание сорбента на основе первично-вторичного амина и безводного сульфата магния. Первый необходим для отделения органических кислот от других компонентов, а второй используется с целью снижения остаточного количества воды в экстракте. Могут добавляться и другие сорбенты, такие как графитированная сажа, чтобы удалить пигменты и стерин, или  $C_{18}$ , чтобы удалить жиры и воски. Степень извлечения полиаренов составляет от 85 до 95% [98].

### **1.6.2 Определение ПАУ в экстрактах почв**

Длительные исследования в области токсикологии позволили выделить шестнадцать полиаренов, которые требуют постоянного мониторинга в окружающей среде. К ним относятся нафталин, аценафтилен, аценафтен, флуорен, фенантрен, антрацен, флуорантен, пирен, 1,2-бенза[а]антрацен, хризен, 3,4-бенз[а]пирен, бензо[е]аценафтилен, бензо[к]флуорантен, дибензо[а,h]антрацен, бензо[g,h,i]перилен и индено[1,2,3-с,d]пирен. Однако в настоящее время в России обязательному контролю подлежит только один полиарен – 3,4-бенз[а]пирен. Это связано с тем, что его содержание от общего числа ПАУ составляет примерно 80% [36]. Таким образом, 3,4-бенз[а]пирен является основным показателем экологического загрязнения полиаренами.

Анализ полиаренов в почве может осуществляться различными методами, каждый из которых имеет свои сильные и слабые стороны: пределы обнаружения исследуемых веществ, длительность процесса, дороговизна оборудования и так далее. Для подбора методики детектирования ПАУ, которая будет использоваться в дальнейших наших исследованиях, необходимо кратко охарактеризовать каждую.

Метод ВЭЖХ с ФЛД разработан и аттестован для определения шестнадцати полициклических ароматических углеводородов в почве. Разделение полиаренов проводится на колонке, оборудованной бинарным насосом и ФЛД, для которого задаются соответствующие длины волн возбуждения и испускания полиаренов. Анализ проводится путём градиентного элюирования бинарной смесью ацетонитрил – вода с последующим флуоресцентным детектированием. Пределы обнаружения и количественного определения составляют от 0.005 до 0.78 и от 0.02 до 1.6 нг/г, что зависит от полиарена [89].

Метод ВЭЖХ с УФ-детектором позволяет проанализировать 14 полиаренов в широком диапазоне их концентраций. Регистрация полиаренов УФ-детектором происходит при  $\lambda = 254$  нм, их идентификация – по временам удерживания. В качестве элюентов используют деионизированную воду и ацетонитрил в соотношении 1:1. Диапазон измерений массовых долей ПАУ составляет 1-2000 мкг/кг [20].

Метод ГХ-МС апробирован для четырёх полиаренов: нафталина, антрацена, фенантерна, пирена. Данный метод предполагает наличие сложного и дорогостоящего оборудования, которое недоступно широкому кругу исследователей. Использование времяпролетного масс-детектора отражается на качественном и количественном определении полициклических углеводородов, так как может быть наложение сигналов веществ, чьи молекулярные ионы отличаются друг от друга менее чем на 5 массовых единиц. Анализ образцов проводится в общем ионном токе или выборочным ионным мониторингом. Диапазон определяемых массовых

долей ПАУ составляет 0.1—100 мкг/кг при массе анализируемой пробы 2-10 г [40].

Иммунохимические методы анализа основаны на специфическом связывании определяемого соединения с соответствующими антителами. Для определения полиаренов разработаны радиоиммунный анализ и иммуноферментный анализ [11]. В настоящее время коммерчески доступные иммуноферментные тест-системы апробированы для определения полициклических углеводородов в почве [15].

Методика проведения флуоресцентного поляризационного иммуноанализа включает в себя несколько следующих этапов: синтез флуоресцеин-меченных трейсеров на основе различных полиароматических соединений с флуоресцентными метками, подбор антисыворотки, связывающейся с трейсером, и измерение растворов, содержащих анализируемую пробу, трейсер и антисыворотку. Измерение поляризации флуоресценции проводят в боросиликатные стеклянных кюветах на поляризационном флуориметре. Пределы обнаружения ПАУ для бензопирена, нафталина и антрацена 0.9, 1.1 и 3.4 нг/мл соответственно [74].

#### Выводы по главе 1

- Основным источником ПАУ является антропогенное воздействие. Полиарены не производятся целенаправленно химической промышленностью. Они образуются в ходе высокотемпературных процессов из органического сырья.

- Полиарены обладают рядом свойств, обуславливающих их накопление в окружающей среде и токсичный эффект на живые организмы: малая летучесть, высокая устойчивость, гидрофобность, высокая сорбционная способность.

- Воздействие полиаренов на педосферу имеет негативный характер, отражающийся в снижении плодородия, микробиологическое оскуднение, засоление. ПАУ обладают стимулирующим и ингибирующим действием на

растения, что определяется их концентрацией, растворимостью в воде и спецификой функционального назначения.

- Наиболее эффективным и экологическим способом является биоремедиация, включающая микробную деградацию и фиторемедиацию. Первый способ деградации полиаренов возможен с помощью бактерий рода *Pseudomonas*, которые являются преобладающей группой бактерий в ризосфере растений. Второй способ может реализовываться двумя путями: ризодеградацией и фитоэкстракцией. При ризодеградации используются симбиозы «растение – бактерии», так как прикорневая зона растения богата аминокислотами, сахарами, необходимыми для роста и развития микроорганизмов, утилизирующих поллютанты. Фитоэкстракция характеризуется накоплением поллютантов в организме растения.

- Использование биомассы растений после биодеградации предпочтительно в качестве сидератов и для изготовления целлюлозной продукции.

- На экстракцию полиаренов влияют температурный режим и природа экстрагента. При длительном воздействии высоких температур происходит деструкция ПАУ. От выбора экстрагента зависит количество извлекаемых посторонних веществ из образцов почв, осложняющих дальнейший анализ.

## Глава 2 Экспериментальные исследования по биодegradации ПАУ

Для проведения экспериментальных исследований были использованы:

- биологический фунгицид «Псевдобактерин-3», содержащий действующее вещество штамм бактерий *P. aureofaciens* ВКМ В-2391 Д в концентрации  $2 \cdot 10^9$  КОЕ/мл;

- питательная среда Мюллера-Хинтона;

- кристаллический нафталин и стандарты в ацетонитриле антрацена (концентрация  $200 \text{ мкг/см}^3$ ), бенз[а]пирена (концентрация  $100 \text{ мкг/см}^3$ ), фенантрена (концентрация  $200 \text{ мкг/см}^3$ ) от компании «Экрес»;

- готовый универсальный грунт;

- семена 17 видов растений, произрастающих на территории Самарской области: луговой клевер (*Trifolium pratense* L.), редис розово-красный с белым кончиком (*Raphanus sativus* var. *radicula*), овёс посевной сорта «Скакун» (*Avena sativa* L.), салат афицион (*Lactuca sativa* L.), белокочанная капуста сорта «Славанова» (*Brassica oleracea* L. convar *capitata*), томат сорта «Дубрава» (*Lycopersicon esculentum* L.), бораго (*Borago officinalis* L.), гречиха татарская (*Fagopyrum tataricum*), горчица белая (*Sinapis alba* L.), фацелия пижмолистная (*Phacelia tanacetifolia*), мятлик луговой (*Poa pratensis* L.), укроп пахучий огородный сорта «Русский гигант» (*Anethum graveolens* L.), горох овощной сорта «Амброзия» (*Pisum sativum* L.), базилик огородный (*Ocimum basilicum*), эспарцет песчаный сорта «Виагра» (*Onobrychis arenaria* (Kit.) DC.), райграс высокий (*Arrhenatherum elatius*), донник белый (*Melilotus albus* Medic.);

- ёмкости для посадки растений объёмом 200 мл.

Построение градуировочных графиков ПАУ, фиксирование концентраций полиаренов в экстрактах почвы и исследование их деградации бактериями рода *Pseudomonas* в питательной среде реализовалось на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Agilent 1220» с колонкой «ZORBAX EclipsePlus C<sub>18</sub>» (4,6×100 мм). Вкалывание объектов исследования

и стандартов проводилось хроматографическим шприцом фирмы «Aglient» объёмом 25 мкл.

Дегазация подвижной фазы и УЗ-обработка экстрактов почв осуществлялась с помощью ультразвуковой ванны «Сапфир».

Условия исследования на ВЭЖХ: скорость потока 1 мл/мин, подвижная фаза ацетонитрил: вода (8:2),  $\lambda = 254$  и  $275$  нм.

Условия инкубирования анализируемых смесей: температура от  $28^{\circ}\text{C}$  до  $30^{\circ}\text{C}$ .

Условия выращивания растений: масса грунта 100 г, температура воздуха от  $18^{\circ}\text{C}$  до  $20^{\circ}\text{C}$ , полив водой по мере необходимости.

В данной работе в качестве объектов исследования были выбраны антрацен, бенз[*a*]пирен, нафталин и фенантрен. Выбор данных ПАУ продиктован причинами:

- включены в список 16 полиаренов, которые требуют постоянного мониторинга в окружающей среде;
- бенз[*a*]пирен является основным показателем экологического загрязнения полиаренами;
- факторы токсичности соединений: антрацен – 0,01, нафталин – 0,001, фенантрен – 0,001 низкие [14]. Однако нетоксичные ПАУ могут обладать эффектом синергизма – усиливать канцерогенность иных веществ.

Для деградции выбранных полиаренов использовался биологический фунгицид «Псевдобактерин-3», действующее вещество которого штамм бактерий *P. aureofaciens* ВКМ В-2391 Д. Выбор определён причинами:

- в микрофлоре почвы, особенно в прикорневой зоне растений, основную массу микроорганизмов составляют бактерии рода *Pseudomonas*;
- некоторые штаммы бактерий данного рода могут деградировать и трансформировать различные поллютанты;
- рассматриваемые бактерии благотворно влияют на рост и развитие растений.

## 2.1 Построение градуировочных графиков ПАУ

Градуировочные графики строились путём разбавления аликвоты стандартных образцов ацетонитрилом. Для построения графика по нафталину был приготовлен его раствор в ацетонитриле с концентрацией  $3,617 \cdot 10^{-3}$  М, аликвоты которого в дальнейшем разбавлялись.

На рисунке 11 отражён градуировочный график по антрацену, построенный при  $\lambda = 254$  нм (рисунок 11).

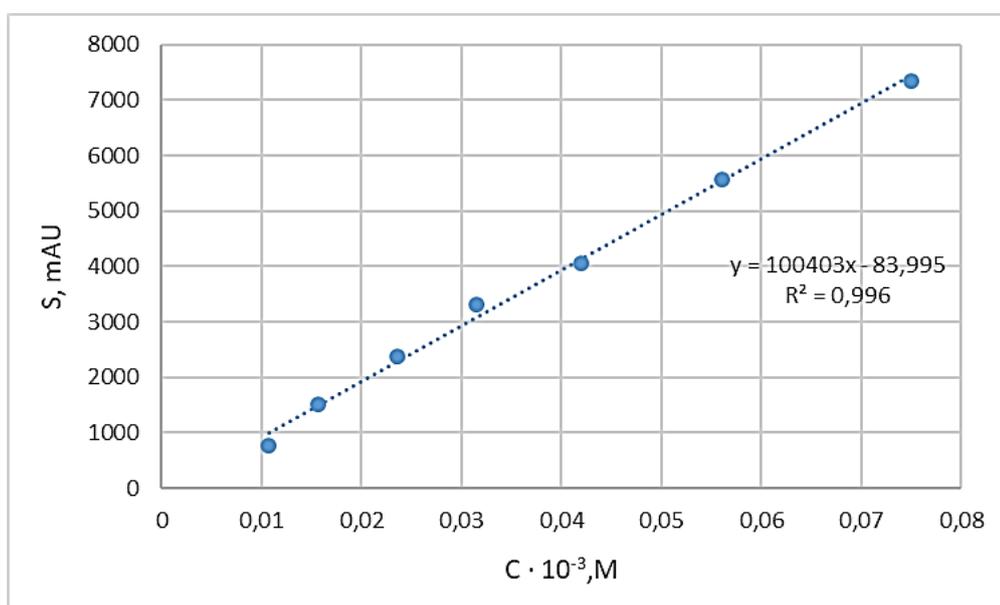


Рисунок 11 – Градуировочный график по антрацену

Данный градуировочный график представляет собой прямую с величиной достоверности аппроксимации равной 0,996, что позволяет использовать построенный график для нахождения концентрации антрацена в анализируемых смесях методом абсолютной градуировки.

На рисунке 12 представлен градуировочный график по бенз[*a*]пирену, построение которого проводилось при  $\lambda = 254$  нм.

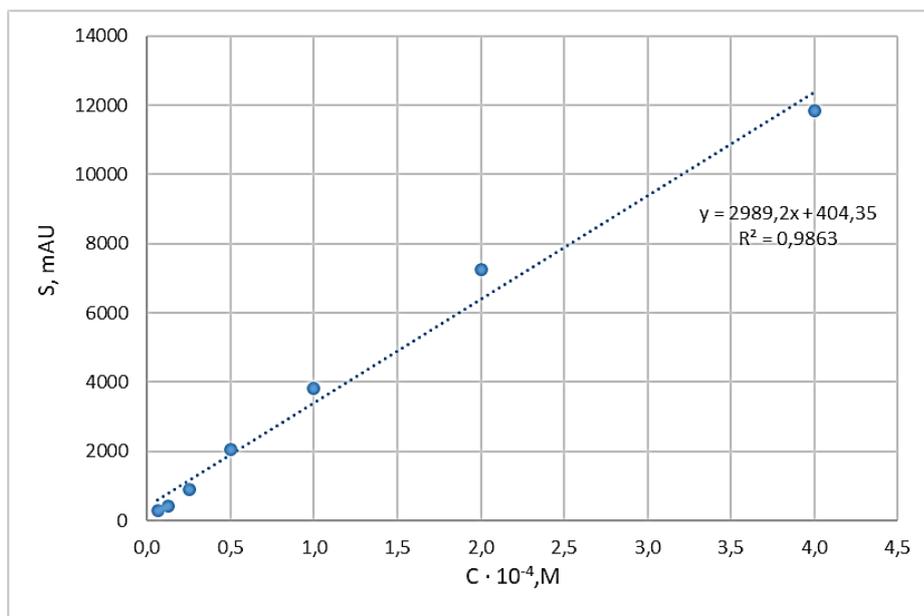


Рисунок 12 – Градуировочный график по бенз[а]пирену

Построенный график представляет прямую, величина достоверности аппроксимации равна 0,9863. Это позволяет использовать его для нахождения концентрации бенз[а]пирена методом абсолютной градуировки.

Результат построения градуировочного графика по нафталину при  $\lambda = 275$  нм показан на рисунке 13.

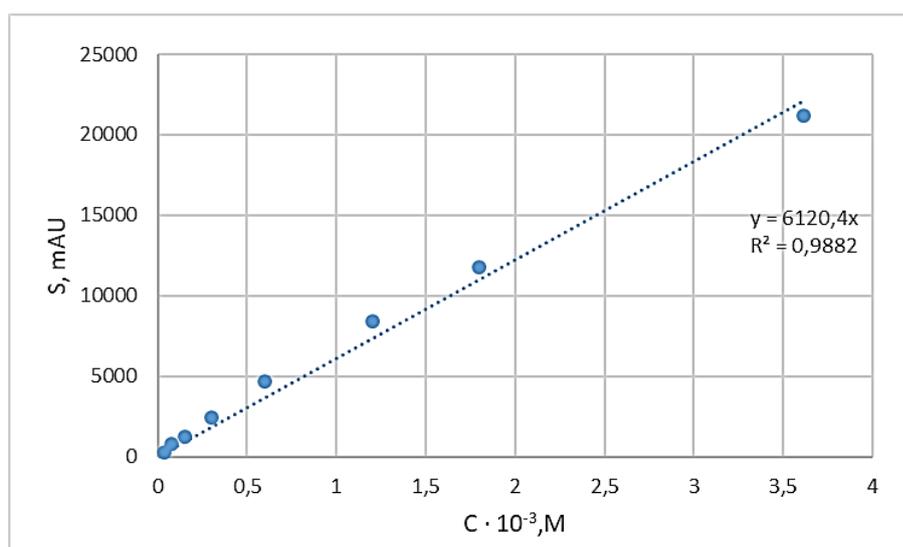


Рисунок 13 – Градуировочный график по нафталину

Построенный график представляет прямую, величина достоверности аппроксимации равна 0,9882. Это позволяет использовать его для нахождения концентрации нафталина методом абсолютной градуировки.

На рисунке 14 представлен градуировочный график по фенантрону, построение которого проводилось при  $\lambda = 275$  нм.

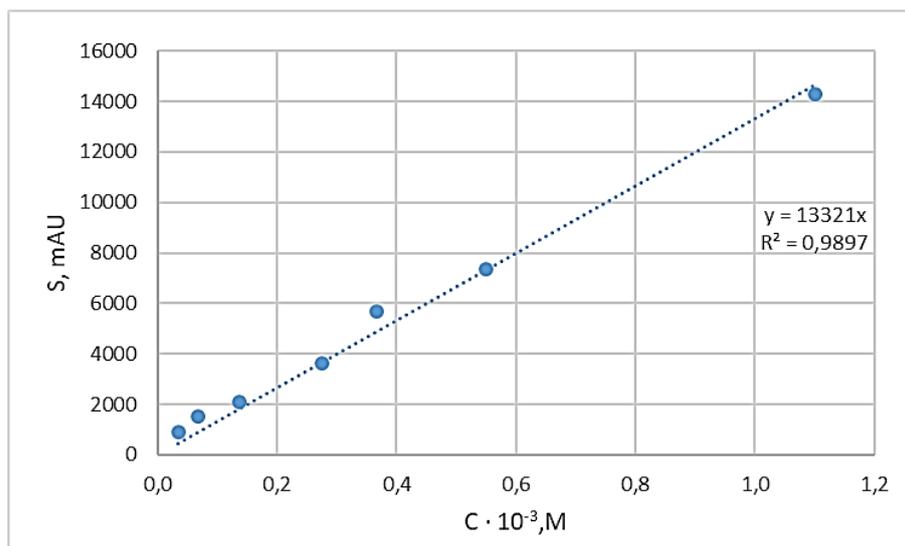


Рисунок 14 – Градуировочный график по фенантрону

Построенный график представляет прямую, величина достоверности аппроксимации равна 0,9897. Это позволяет использовать его для нахождения концентрации фенантена в анализируемых смесях методом абсолютной градуировки.

## 2.2. Влияние ПАУ на штамм *P. aureofaciens* ВКМ В-2391 Д

Так как нафталин находился в кристаллической форме, необходим был подбор растворителя и оптимальной концентрации полиарена, которые не оказывали бы токсического воздействия на бактерии. Оценка роста бактерий осуществлялась с помощью турбидиметрического метода. Результаты

подбора оптимальных концентрации ДМСО и нафталина представлены на рисунках 15 и 16 соответственно.

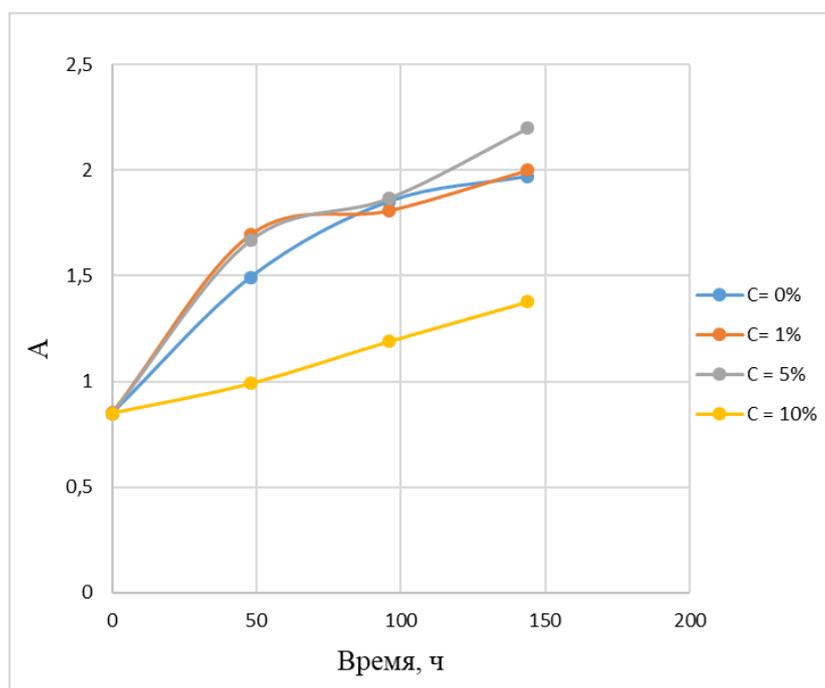


Рисунок 15 – Влияние концентрации ДМСО на рост бактерий

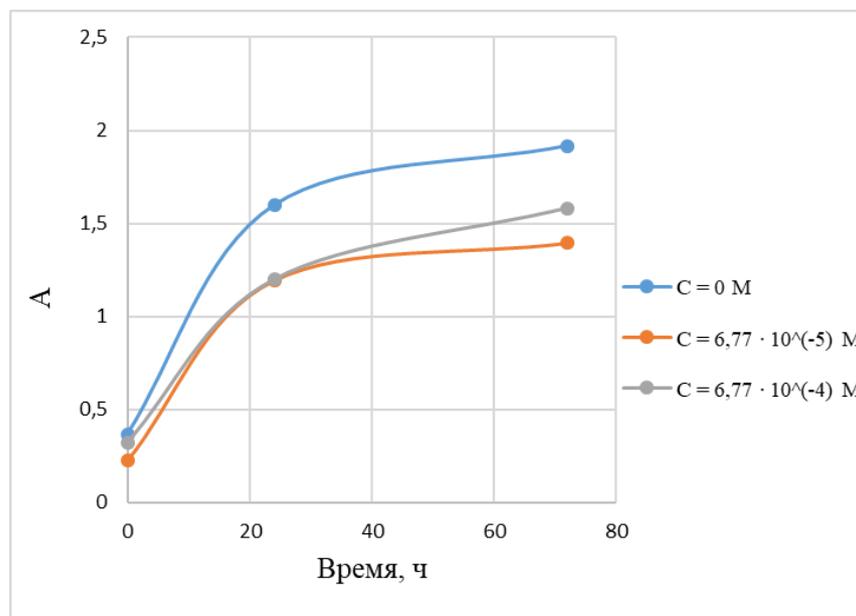


Рисунок 16 – Влияние концентрации нафталина на рост бактерий

Таким образом, выбран для дальнейшей работы раствор нафталина, содержащий ДМСО в количестве 5% от общего объёма смеси и нафталин в концентрации не выше 6,77 моль/л.

### 2.3 Дегградация ПАУ штаммом *P. aureofaciens* ВКМ В-2391 Д в питательной среде

Для исследования кинетики дегградации ПАУ бактериями штамма *P.aureofaciens* ВКМ В-2391 Д в стерильные пробирки, содержащие питательную среду Мюллера-Хинтона в количестве 10 мл, помещались 0,1 мл биофунгицида «Псевдобактерин-3» ( $1,9 \cdot 10^7$  КОЕ/мл) и выбранный полиарен (антрацен, бенз[*a*]пирен, фенантрен в количестве 0,2 мл, нафталин – 0,9 мл). Полученные смеси инкубировались при температуре 28-30 °С. Через равные промежутки времени с помощью ВЭЖХ измерялась концентрация ПАУ. По полученным данным строились кинетические кривые дегградации полиаренов.

На рисунке 17 показана кинетика дегградации антрацена в концентрации  $4,69 \cdot 10^{-5}$  М. Дегградация полиарена протекает полностью и практически с одинаковой скоростью в течение 3,17 часов.

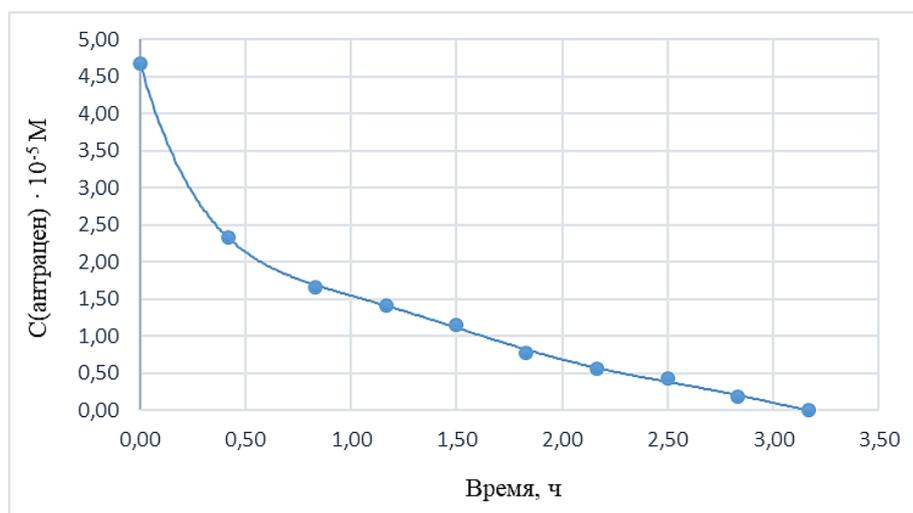


Рисунок 17 – Кинетическая кривая дегградации антрацена

На рисунке 18 отображена кинетика деградации бенз[а]пирена в количестве  $2,41 \cdot 10^{-5}$  М.

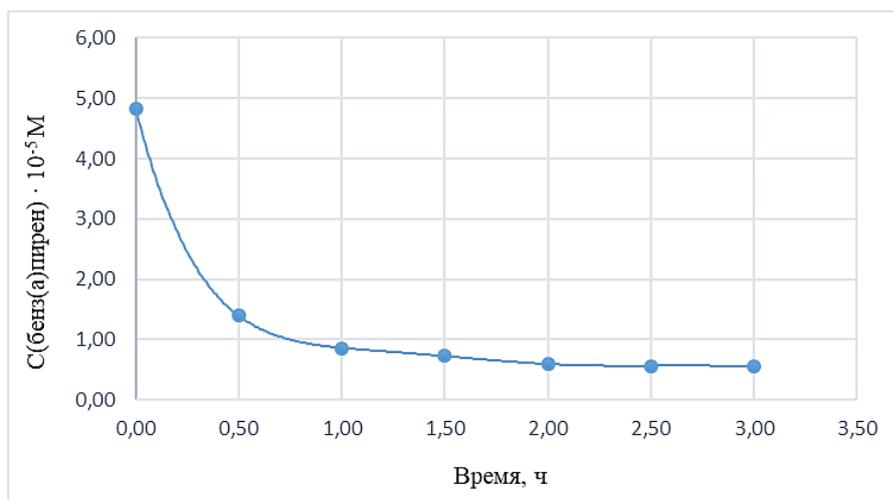


Рисунок 18 – Кинетическая кривая деградации бенз[а]пирена

Первоначально деградация полиарена протекала интенсивно и далее вышла на плато.

На рисунке 19 показана кинетика деградации нафталина в количестве  $8,02 \cdot 10^{-5}$  М. Полная деградация нафталина произошла за 96 часов.

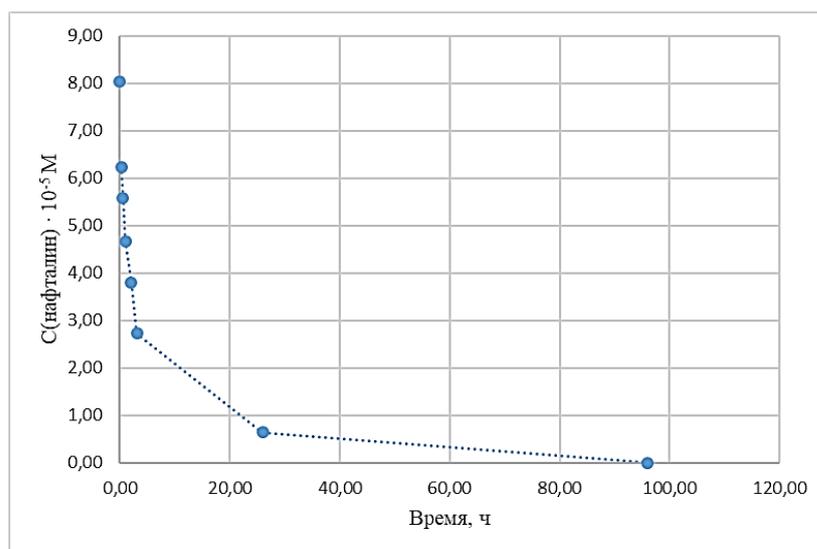


Рисунок 19 – Кинетическая кривая деградации бенз(а)пирена

Рисунок 20 демонстрирует кинетику деградации фенантрена в количестве  $3,89 \cdot 10^{-5}$  М. Подобно антрацену деградация протекает полностью и практически с одинаковой скоростью в течение 3 часов. Это можно объяснить тем, что антрацен и фенантрен являются изомерами и отличаются лишь способом соединения трёх бензольных колец между собой – антрацен представляет линейную молекулу, фенантрен – ангулярную.

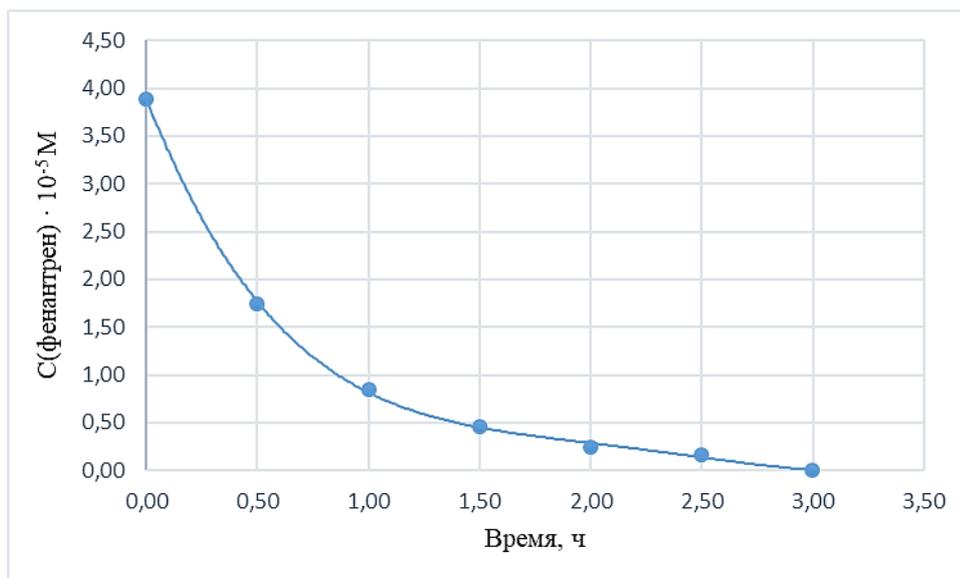


Рисунок 20 – Кинетическая кривая деградации фенантрена

Таким образом, доказано, что бактерии *P. aureofaciens* ВКМ В-2391 Д способны деградировать полиарены.

#### **2.4 Деградация нафталина штаммом *P. aureofaciens* ВКМ В-2391 Д в почве и его экстракция**

Чтобы проанализировать изменение концентрации нафталина в почве в процессе деградации, необходимо экстрагировать полиарен и подобрать оптимальные условия для этого.

Методика экстракции полиарена была следующая: к 5 г земли добавлялся 1 мл раствора нафталина концентрацией  $3,6 \cdot 10^3$  М, полученная

смесь перемешивалась и выдерживалась в покое 20 минут. По истечению времени почва полностью заливалась экстрагентом и ставилась в УЗ-баню на 15 минут. Полученный экстракт сливался в химический стакан. Операция по получению экстракта повторялась 3 раза, объединяя экстракты. Экстракт профильтровался. Из полученного раствора отбирался 1 мл полученного экстракта, который разбавлялся в 4 мл ацетонитрила и подвергался анализу на ВЭЖХ. Сравнение экстрагентов представлено в таблице 4.

Таблица 4 – Сравнение экстрагентов для экстракции нафталина из почвы

Экстрагент	T, °C	Извлечение, %
Метанол	32	79
	50	25
Бензол	32	34
ДМСО	32	23
Гексан	32	18
Ацетон	32	11
Ацетон : гексан (1:1)	32	9

Подбор экстрагента показал, что наиболее эффективно извлечение нафталина реализуется с помощью метанола при 32°C.

Для проведения эксперимента по деградации нафталина в загрязнённой почве бактериями в 15 ёмкостей помещались 5 г почвы с начальной концентрацией нафталина 14 мкг/г и концентрацией бактерий  $0,4 \cdot 10^7$  КОЕ/г. Ёмкости выдерживались при комнатной температуре, земля периодически увлажнялась водой. Концентрация нафталина в экстракте определялась в условиях ВЭЖХ методом абсолютной градуировки. Результат по данному эксперименту показал в виде кинетики деградации на рисунке 21.

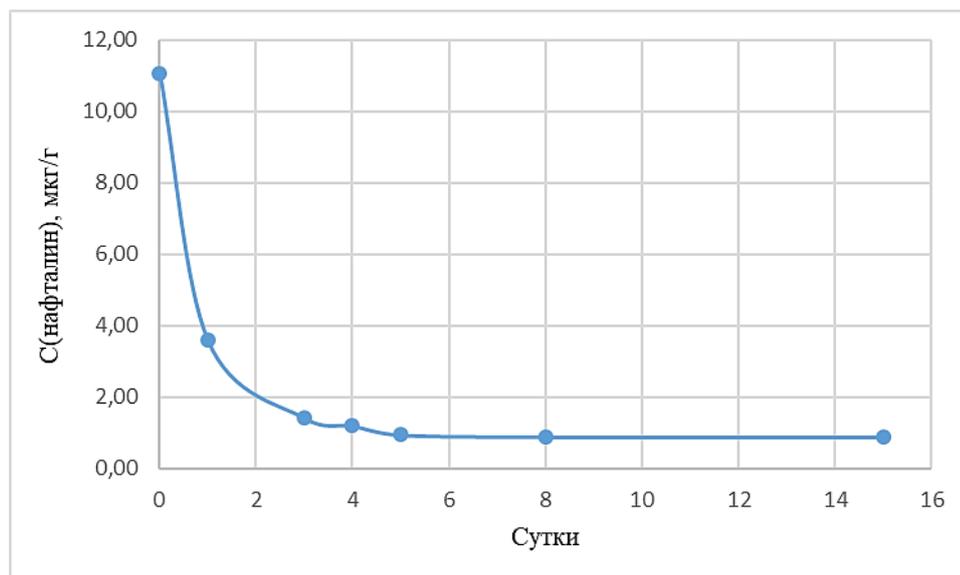


Рисунок 21 – Кинетика деградации нафталина в почве бактериями

Установлено, что деградация нафталина в почве в первые сутки протекала интенсивно, а далее вышла на плато.

Таким образом, подобраны оптимальные условия для экстракции нафталина из почвы и выявлено, что при деградации нафталина бактериями *P. aureofaciens* ВКМ В-2391 Д в почве уменьшение концентрации полиарена остановилось на 5 сутках и на конец эксперимента количество нафталина составляло 6 % от начального.

### **2.5 Толерантность тестируемых растений Самарской области по отношению к нафталину**

В модельном эксперименте использовали семена 17 видов растений, произрастающих на территории Самарской области.

Эксперимент проводили на готовом грунте в контролируемых условиях. Субстрат распределяли по 10 горшочкам для каждой культуры в количестве 100 г. Нафталин вносили в четыре горшочка в дозах: 1,45,  $1,45 \cdot 10^{-1}$ ,  $1,45 \cdot 10^{-2}$ ,  $1,45 \cdot 10^{-3}$  мг/г почвы. Иные четыре горшочка содержали тоже

количество нафталина и штамм бактерий *P. aureofaciens* ВКМ В-2391 Д  $2 \cdot 10^6$  КОЕ/г субстрата. Контрольные варианты: без нафталина и без нафталина с бактериями. Нафталин вносили в виде его раствора в ДМСО. В загрязнённый субстрат высаживали заранее пророщенные семена в течение семи суток, что исключает нахождение «пустых» семян в эксперименте. Полив проводили регулярно. Через 14 дней оценивалась всхожесть растений.

Максимальная всхожесть лугового клевера отмечена в контрольных вариантах и при содержании нафталина в малых концентрациях в почве. При повышении концентрации нафталина всхожесть резко снижалась в варианте, не содержащем бактерии, что показано на рисунке 22.

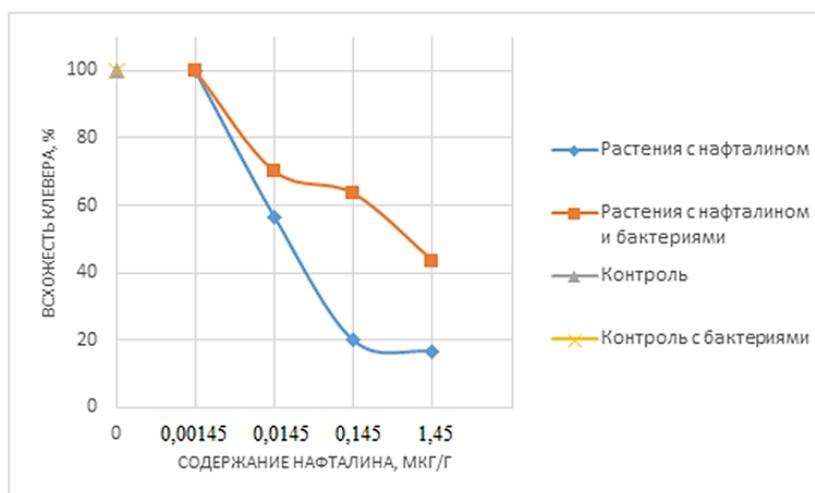


Рисунок 22 – Зависимость всхожести семян лугового клевера от концентрации нафталина в почве

Максимальная всхожесть овса отмечена при содержании нафталина в малой концентрации и бактерий. При их отсутствии нафталин в небольшой концентрации не имел сильного токсического эффекта. Таким образом, овёс проявляет толерантность к низким концентрациям нафталина, что отображено на рисунке 23.

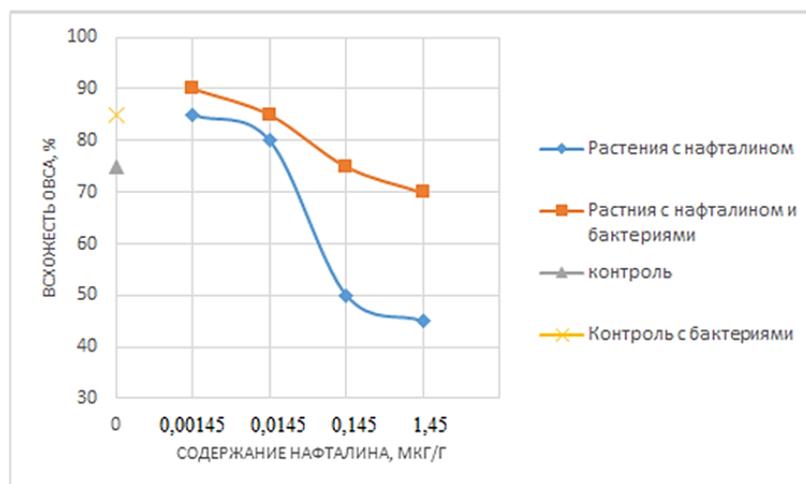


Рисунок 23 – Зависимость всхожести семян овса посевного сорта «Скакун» от концентрации нафталина в почве

Максимальная всхожесть редиса наблюдалась в контрольном варианте, содержащем бактерии. При содержании нафталина в малых концентрациях в почве и бактерий всхожесть равна контрольной. При повышении концентрации нафталина всхожесть редиса плавно снижалась и имела практически линейный характер, что показано на рисунке 24.

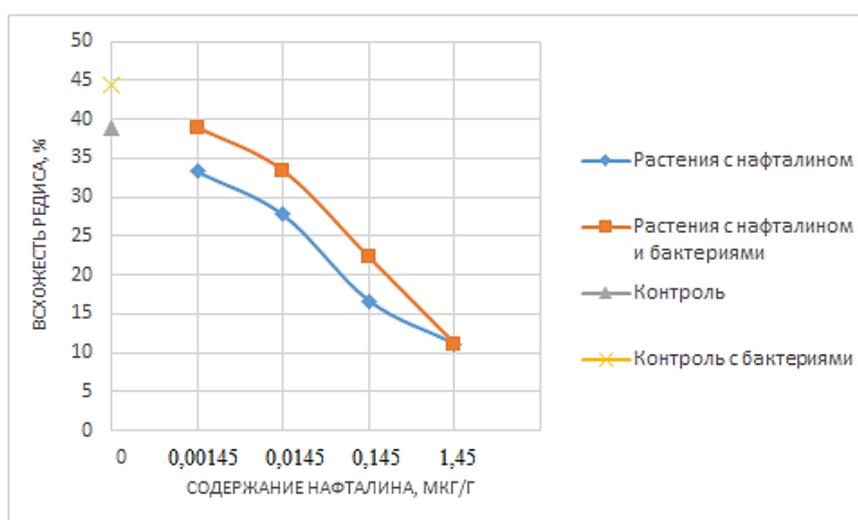


Рисунок 24 – Зависимость всхожести семян редиса розово-красного с белым кончиком от концентрации нафталина в почве

На рисунке 25 продемонстрировано, что всхожесть салата афицион достигает максимума в контрольном варианте, содержащем бактерии. Наличие нафталина в почве понижает всхожесть до значения сравнимого с контролем без инокулята. Рост концентрации нафталина в почве приводит к линейному уменьшению всхожести салата.

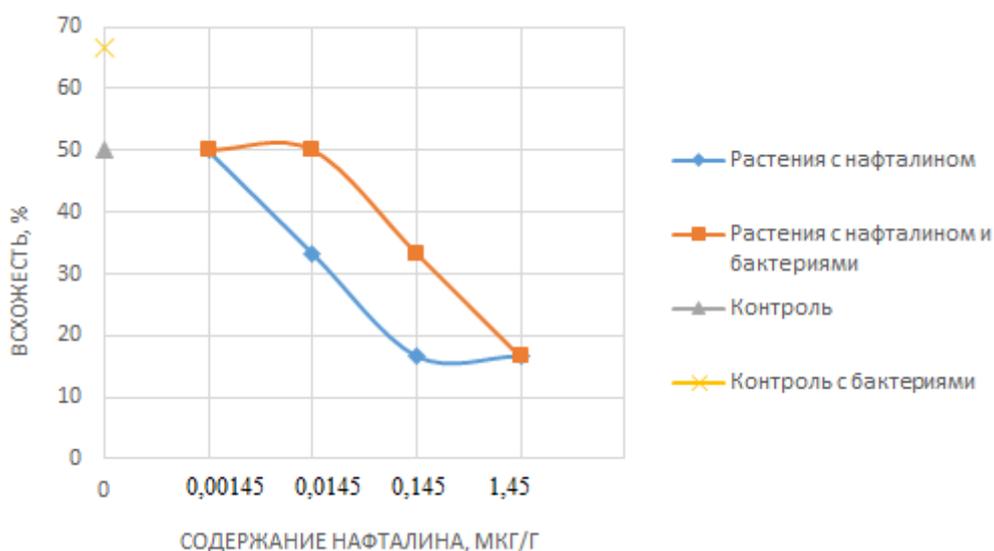


Рисунок 25 – Зависимость всхожести семян салата афицион от концентрации нафталина в почве

Максимальная всхожесть белокочанной капусты отмечена в контрольных вариантах и при добавлении бактерий с нафталином в почву. Повышение концентраций в исследуемых системах приводило к линейному уменьшению всхожести капусты, что отражено на рисунке 26.

На рисунке 27 показано, что в системах контрольных и, содержащих нафталины в малых концентрациях и бактерии, отмечена наибольшая всхожесть. Нафталин без добавления инокулята оказывает ингибирующее действие на семена томата.

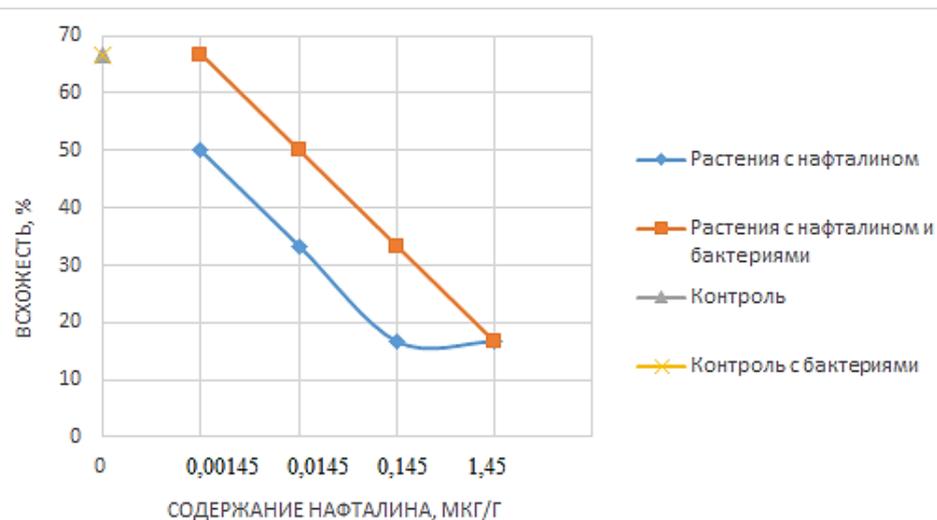


Рисунок 26 – Зависимость всхожести семян белокочанной капусты сорта «Славанова» от концентрации нафталина в почве

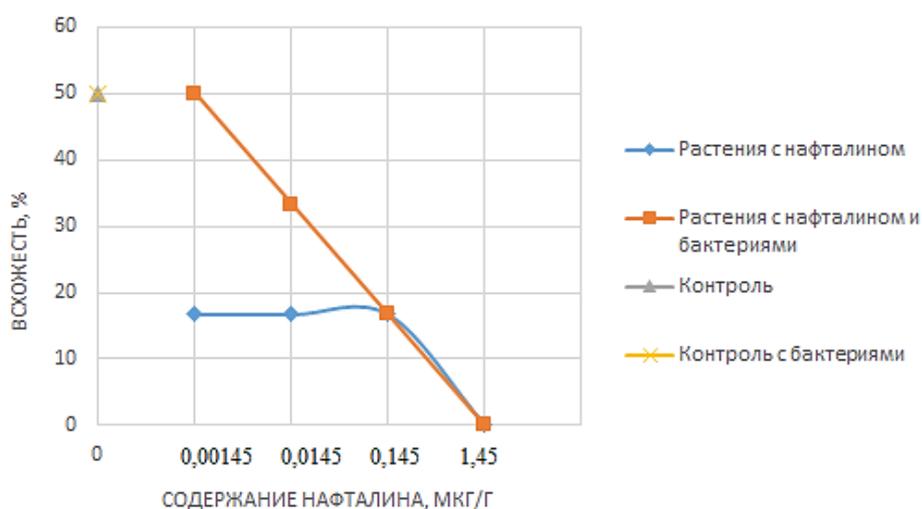


Рисунок 27 – Зависимость всхожести семян томата сорта «Дубрава» от концентрации нафталина в почве

Бораго не испытывает сильного токсического эффекта при повышении концентрации нафталина в почвах, его максимальная всхожесть сопоставима для контрольных образцов и систем, содержащих нафталин в малых концентрациях с бактериями и без них. Это отражено на рисунке 28.

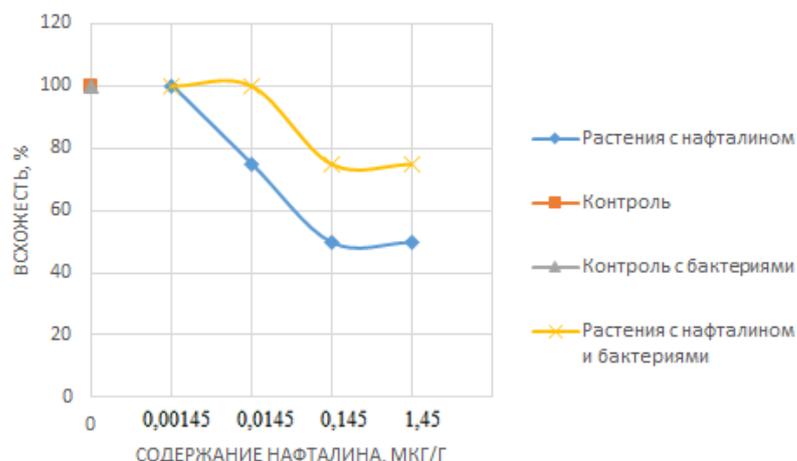


Рисунок 28 – Зависимость всхожести семян бораго от концентрации нафталина в почве

На рисунке 29 показано, что максимальная всхожесть для гречихи татарский выявлена в почве, содержащей бактерии. Данное растение испытывает стимулирующий эффект при повышении концентрации нафталина до 0,145 мкг/г в вариантах с инокулятом и без него. Таким образом, гречиха татарская толерантна к нафталину в диапазоне с 0,00145 до 0,145 мкг/г.

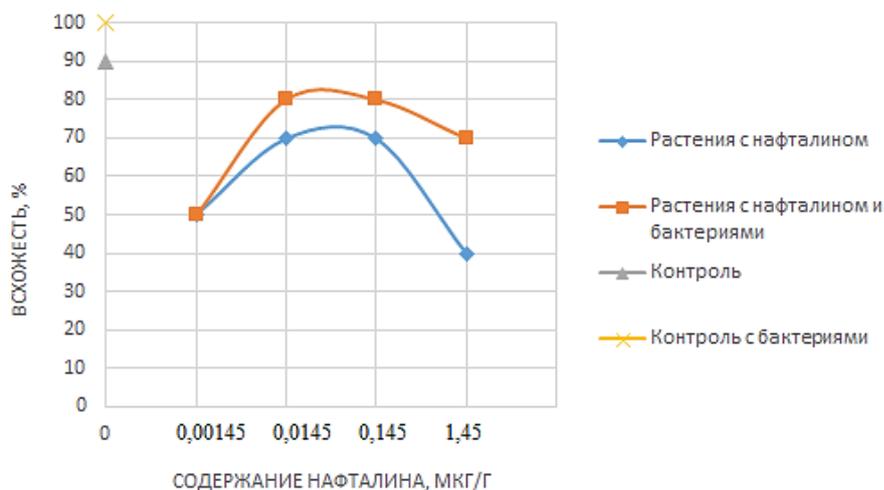


Рисунок 29 – Зависимость всхожести семян гречихи татарской от концентрации нафталина в почве

Горчица белая проявляет максимальную всхожесть в контрольных системах. Бактерии снижают токсичный эффект, проявляемый нафталином. Наблюдается практически линейное уменьшение всхожести семян в варианте без добавления биофунгицида, что продемонстрировано на рисунке 30.

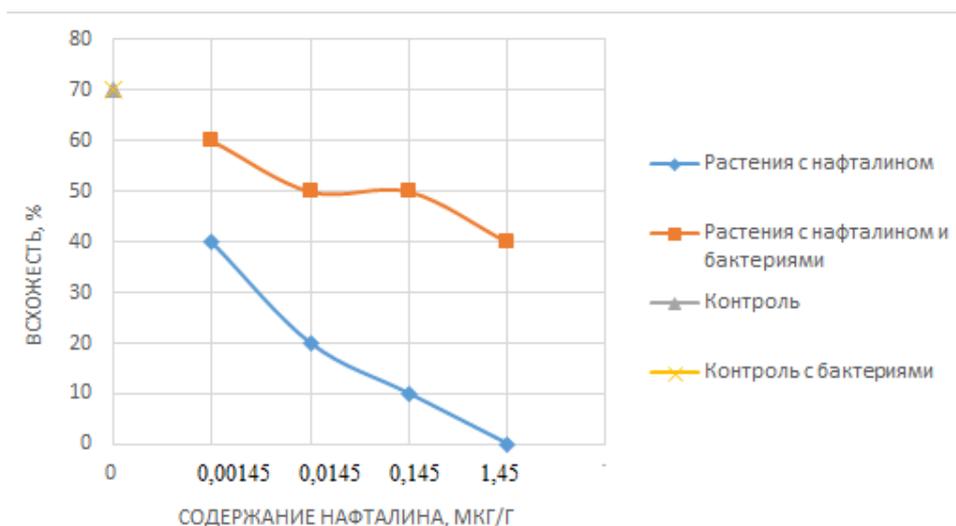


Рисунок 30 – Зависимость всхожести семян горчицы белой от концентрации нафталина в почве

На рисунке 31 продемонстрировано, что максимальная всхожесть семян мятлика лугового отмечена в контрольных вариантах и при содержании небольшого количества нафталина с инокулянтom в почве и без. При повышении содержания нафталина в почве наблюдается плавный спад всхожести семян.

На рисунке 32 показано, что максимальная всхожесть сеням укропа пахучего зафиксирована в системе, содержащей малую концентрацию нафталина и биофунгицид. Укроп испытывает угнетающий эффект, вызываемым нафталином, что отражается в крутом линейном спаде всхожести.

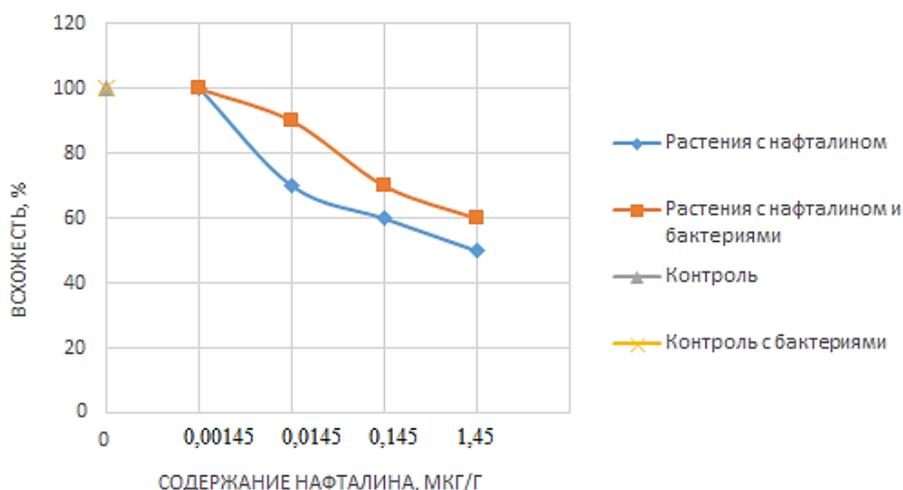


Рисунок 31 – Зависимость всхожести семян мятлика лугового от концентрации нафталина в почве

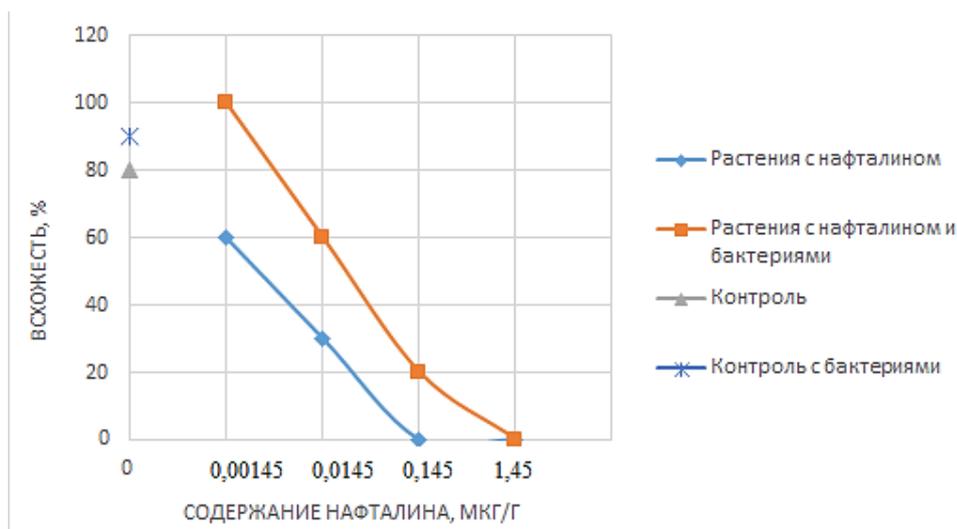


Рисунок 32 – Зависимость всхожести семян укропа пахучего огородного сорта «Русский гигант» от концентрации нафталина в почве

На рисунке 33 показано, что горох овощной проявляет лучшую всхожесть в контрольном образце, содержащем бактерии. Нафталин, как в случае с укропом пахучим, проявляет ингибирующий эффект на семена гороха. Добавление иннокулята не влияет сильно на всхожесть семян.

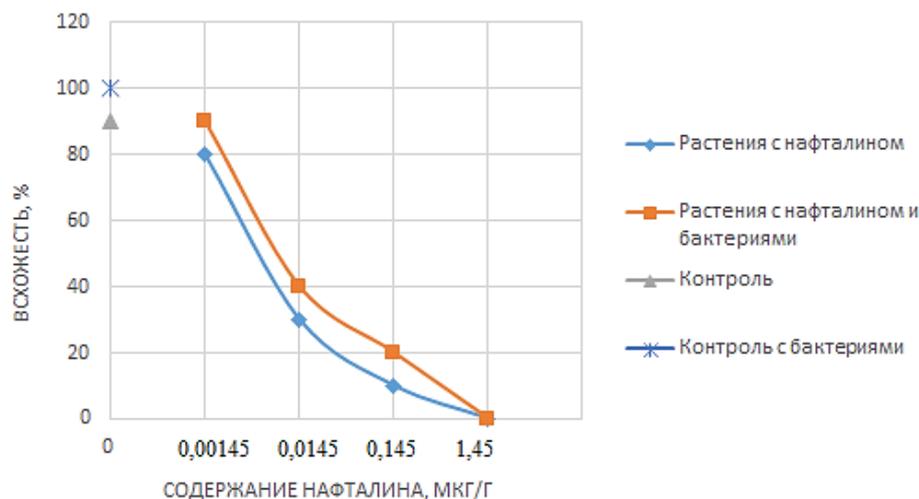


Рисунок 33 – Зависимость всхожести семян гороха овощного сорта «Амброзия» от концентрации нафталина в почве

Нафталин оказывает подавляющее действие на следующие семена:

- базилик огородный,
- эспарцет песчаный сорта «Виагра»,
- райграс высокий,
- донник белый,
- фацелии пижмолистная.

Это отражается в отсутствии всходов данных растений в загрязнённых почвах на протяжении двух недель эксперимента.

Таким образом, выявлены толерантные виды растений к низким концентрациям нафталина: овёс посевной сорта «Скакун», гречиха татарская. Показано, что добавление биофунгицида «Псевдобактерин-3» приводит к снижению токсического эффекта нафталина, что отражается в повышении процента всхожести семян. Наилучший эффект от инокулянта показали следующие растения: овёс посевной сорта «Скакун», белокочанная капуста сорта «Славанова», томат сорта «Дубрава, бораго, гречиха татарская, горчица белая.

## 2.6 Деградация нафталина в почве симбиозом растений Самарской области с бактериями *P. aureofaciens* ВКМ В-2391 Д

Для изучения эффективности деградации нафталина в загрязнённой почве в зависимости от растений и бактерий *P. aureofaciens* ВКМ В-2391 Д, содержащихся в используемом биофунгициде, на 14 день эксперимента была проведена экстракция полиарена из образцов почв, содержащих 0,145 мкг/г нафталина, и внесённые бактерии. Нахождения концентраций нафталина в экстрактах проводилось методом абсолютной градуировки с помощью ВЭЖХ. Результаты приведены на рисунке 34.

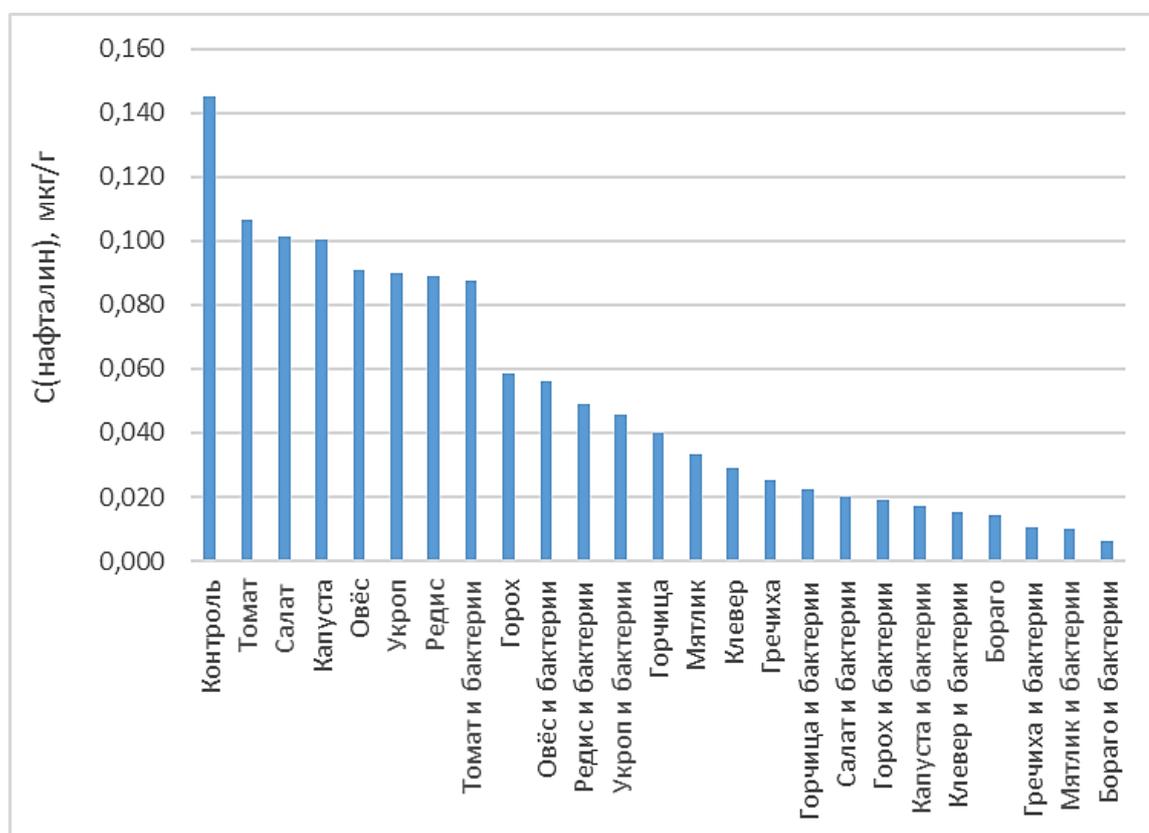


Рисунок 34 – Содержание нафталина на 14 день эксперимента в модельных системах с тестируемыми растениями и бактериями

Во всех системах произошло уменьшение поллютанта по сравнению с контролем. Среди растений наилучший результат по деградации показал

бораго. Добавление биофунгицида улучшает деградацию нафталина во всех тестируемых системах. Наибольшая эффективность симбиоза для деградации выявлена у гречихи, мятлика и бораго.

Увеличение продолжительности выращивания растений не приводило к снижению концентрации нафталина в почве ниже установленных значений.

#### Выводы по главе 2

1. Доказана способность бактерий *P. aureofaciens* ВКМ В-2391 Д, являющихся действующим веществом, биологического фунгицида «Псевдобактерин-3», деградировать исследуемые представители полиаренов: антрацен, бенз[*a*]пирен, нафталин и фенантрен в модельных системах, представленныз питательным агаром Мюллера-Хинтона и искусственно загрязнённой почвой.

2. Оптимизированы условия экстракции нафталина из загрязнённых образцов почвы. Извлечение нафталина 79% достигается при УЗ-экстракции метанолом при 32 °С.

3. Выявлены устойчивые виды растений к низким концентрациям нафталина (до 0,0145 мкг/г): овёс посевной сорта «Скакун», гречиха татарская.

4. Установлены лучшие симбиозы «тестируемое растение – бактерии *P. aureofaciens* ВКМ В-2391 Д» для ремедиации почвы. Эффективными растениями оказались гречиха татарская, мятлик луговой и бораго. Содержание нафталина в почве на конец эксперимента составляло менее 0,01 мкг/г.

## Глава 3 Технологическое решение по ремедиации земель, загрязнённых ПАУ

### 3.1 Предлагаемая технологическая схема ремедиации земель

На основе полученных результатов исследований предложена схема ремедиации земель, загрязнённой нафталином, на рисунке 35.

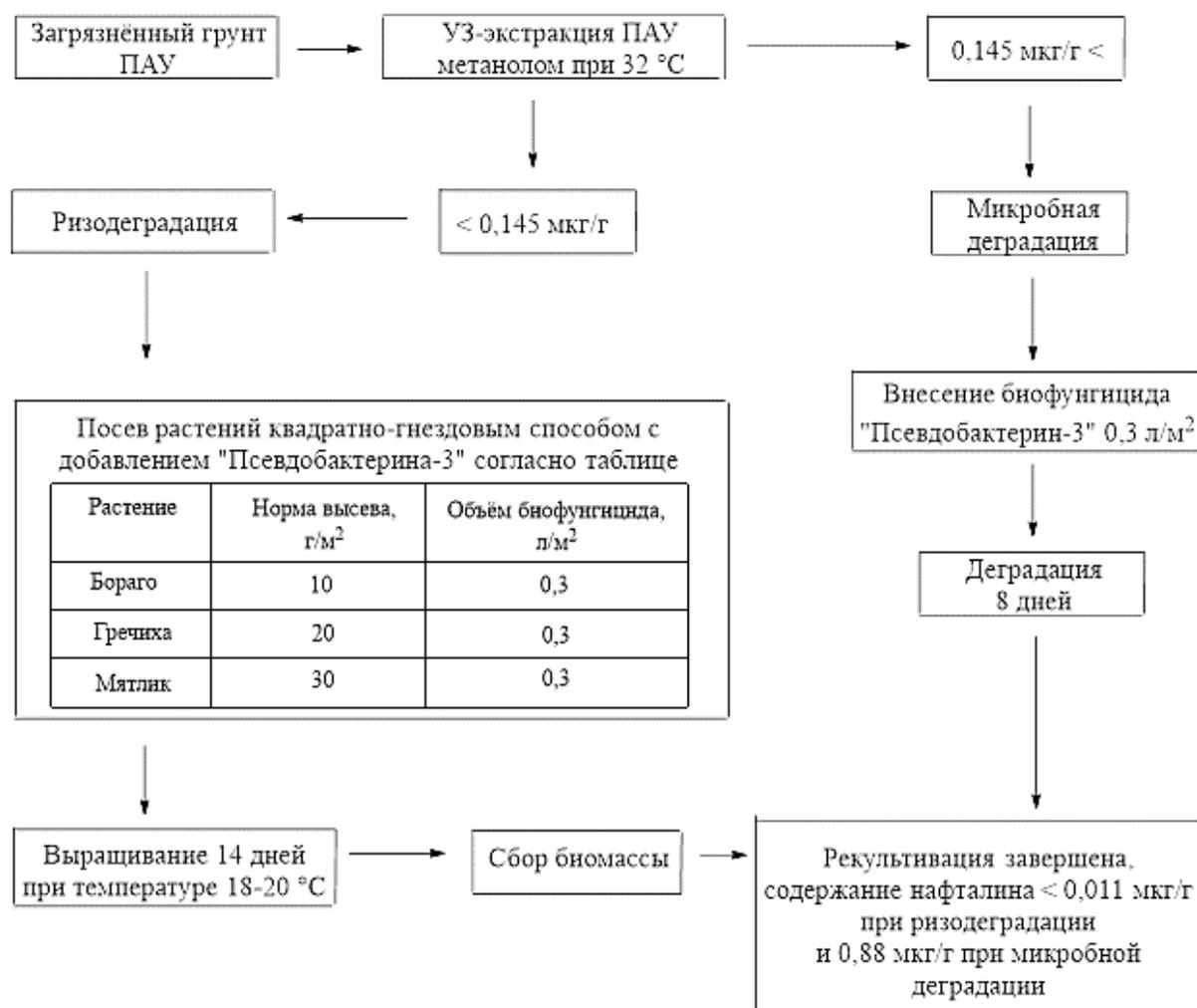


Рисунок 35 – Технологическая схема рекультивации земель, загрязнённых нафталином

Для оценки степени загрязнения почвы ПАУ в качестве нафталина предлагается проводить УЗ-экстракцию с помощью метанола при 32 °С. Степень извлечения нафталина составляет 79%.

Путь деградации нафталина зависит от его концентрации в почве. Было установлено, что эффективными растениями в симбиозе «растение – бактерии *P. aureofaciens* ВКМ В-2391 Д» являются бораго, гречиха и мятлик. Данные растения способны расти на загрязнённой почве, содержащей нафталин в концентрации до 0,145 мкг/г. Если при анализе почвы концентрация ПАУ будет меньше или равна 0,145 мкг/г, то для ремедиации почвы можно использовать ризодеградацию. Посев растений при ризодеградации советуется проводить квадратно-гнездовым способом, когда семена высеваются в одну лунку по 3 семечка, что позволяет исключить на рекультивируемом участке земли лунки, в которых не взошли растения. Одновременно с посевом семян необходимо вносить в почву биофунгицид «Псевдобактерин-3». Внесение его не более поздних сроках может не дать ожидаемого положительного эффекта, так как нафталин оказывает токсическое действие на растения, проявляющееся в уменьшении процента всхожести семян. Экспериментально установлено, что на 14 день выращивания растений можно производить их скашивание, так как концентрация нафталина далее не уменьшается. Содержание нафталина в почве менее 0,011 мкг/г. Собранную биомассу можно использовать для изготовления целлюлозной продукции или применения в качестве сидерата.

В ситуации, когда концентрация ПАУ будет выше 0,145 мкг/г, предлагается использовать микробную деградацию. Для этого в почву вносят биофунгицид «Псевдобактерин-3». Экспериментально было выявлено, что деградация нафталина протекает 8 суток. Дальнейшая деградация ПАУ может происходить повторно микробным способом или с помощью ризодеградации, если концентрация нафталина не достигла желаемых значений.

Предложенная технология может применяться при загрязнении почвы ПАУ, происходящем при разливе нефтепродуктов, после пожаров.

### 3.2 Экономический расчёт используемых технологий

Технико-экономическая эффективность рассчитывалась согласно методикам [72] и [90]. Расчёты производились для площади почвы 1 м<sup>2</sup>.

При ризодеградации используются семена растений бораго, гречихи татарской или мятлика лугового и биофунгицид «Псевдобактерин-3».

Расчёт стоимости посадки семян производились по формуле 1:

$$Z_c = m \cdot C_c, \quad (1)$$

где  $Z_c$  – затраты на стоимость семян на 1 м<sup>2</sup>;

$m$  – масса норма высева семян, кг;

$C_c$  – стоимость 1 кг семян.

Расчёт стоимости затрат на биофунгицид производилось по формуле 2:

$$Z_b = V \cdot C_b, \quad (2)$$

где  $Z_b$  – затраты на стоимость биофунгицида на 1 м<sup>2</sup>;

$V$  – объём нормы расхода биофунгицида на л/м<sup>2</sup>;

$C_b$  – стоимость 1 л биофунгицида.

При микробной деградации используется только биологический фунгицид «Псевдобактерин-3». Норма его расхода на 1 м<sup>2</sup> составляет 0,03 л. Стоимость расхода препарата рассчитывается по формуле 2.

В таблице 5 приведены экономические затраты на предлагаемую технологию восстановления почвы от загрязнения нафталина в качестве ПАУ для 1 м<sup>2</sup>.

Из таблицы 5 видно, что в экономическом плане при ризодеградации более выгодно использование гречихи татарской.

Таблица 5 – Экономические затраты на предлагаемую технологию ремедиации почвы, загрязнённой нафталином

Затраты	Нормы высева, кг/м <sup>2</sup>	Цена за 1 кг, руб.	Нормы расхода, л/м <sup>2</sup>	Цена за 1 л, руб.	Рублей на 1 м <sup>2</sup>
Ресурсы для ризодеградации:					
Бораго	0,01	1000,00	-		10,00
Гречиха татарская	0,02	380,00	-		7,60
Мятлик луговой	0,03	670,00	-		20,10
Биофунгицид «Псевдобактерин-3»	-	-	0,30	650,00	195,00
Ресурсы для микробной деградации					
Биофунгицид «Псевдобактерин-3»	-	-	0,30	650,00	195,00
Технологические затраты:					
Полив растений					0,24
Транспорт на 1 км					40,00
Погрузочные/ разгрузочные работы (на 1 час работы)					3000,00
Техника (1 час работы)					5000,00
Лабораторный контроль					750,00
Итого затраты, руб.:					
- ризодеградация при использовании бораго					8995,24
- ризодеградация при использовании гречихи татарской					8992,84
- ризодеградация при использовании мятлика лугового					9005,34
- микробная деградация					8985,24

Для проведения оценки эколого-экономического эффекта определяется по формуле 3 ущерб, причинённый почве загрязнением полиаренов по формуле.

$$Y_3 = H_{bc} \cdot K_{п} \cdot K_{в} \cdot K_{э} \cdot K_{г} \cdot S, \quad (3)$$

где  $H_{bc}$  – базовый норматив стоимости сельскохозяйственных земель, 1612 тыс. руб./га;

$K_{п}$  – коэффициент пересчета в зависимости от периода времени по восстановлению загрязненных сельскохозяйственных земель составляет 0,9, так как восстановление почв происходит менее за один год;

$K_b$  – коэффициент пересчета в зависимости от степени загрязнения земель, равный 0,6;

$K_э$  – коэффициент экологической значимости территории составляет 1,9 для Поволжского региона;

$K_r$  – коэффициент пересчёта в зависимости от глубины загрязнения почвы, равный 1,3.

$S$  – площадь загрязнения 0,0001 га.

Ущерб в ходе реализации природоохранных мероприятий, который предупредили, находится по формуле 4:

$$Y_{п} = Y_3 - Y_о, \quad (4)$$

где  $Y_о$  – остаточный ущерб после применения предлагаемой технологии, который рассчитывали по формуле 3 с изменениями коэффициентов  $K_{п}$  и  $K_r$  в соответствии с экологической эффективностью рассматриваемых технологий.

Результаты расчётов эколого-экономической оценки внедрения технологий по очистке 1 м<sup>2</sup> загрязнённой почвы нафталином в течение периода менее одного года представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты расчёта остаточного ущерба после применения предлагаемых технологий по рекультивации земель

Показатели	Метод очистки почвы	
	Микробная деградация	Ризодеградация
Ущерб от загрязнения, руб.	215,01	107,51
Остаточный ущерб, руб.	107,51	0
Ущерб предотвращённый, руб.	107,50	107,51
Эколого-экономическая эффективность, %	50	100

По результатам, приведённым в таблице 6 следует, что ризодеградация является более эффективным способом восстановления почвы, чем микробная деградация ПАУ. Однако микробная деградация используется в случае содержания высоких концентраций ПАУ в почве.

#### Выводы по главе 3

1. Для рекультивации земель, загрязнённых ПАУ, на основании проведённых экспериментальных исследований была разработана технология по очистке почвы от нафталина в зависимости от его концентрации в почве. При загрязнении выше 0,145 мкг/г предложено использовать микробную деградацию, при загрязнении ниже 0,145 мкг/г – ризодеградацию установленными эффективными симбиозами «растение – бактерии».

2. Приведены экономические расчёты необходимых ресурсов на 1 м<sup>2</sup> загрязнённой почвы, выявлено экономически выгодное растение для симбиоза – гречиха татарская. Оценён эколого-экономического эффекта технологий, доказывающий эффективность выбранных путей очистки почвы.

## Заключение

Проведён литературный обзор по теме исследования. Основным источником поступления ПАУ в окружающую среду является антропогенное воздействие. Полиарены образуются в ходе высокотемпературных процессов из органического сырья. Они способны к накоплению в окружающей среде благодаря высокой устойчивости и токсичному воздействию на живые организмы из-за липофильности. Воздействие полиаренов на педосферу имеет негативный характер, отражающийся в снижении плодородия, микробиологическое оскуднение, засоление. ПАУ подвергаются биодegradации в почве бактериями рода *Pseudomonas*.

Доказана способность бактерий *P. aureofaciens* ВКМ В-2391 Д, являющихся действующим веществом, биологического фунгицида «Псевдобактерин-3», деградировать исследуемые представители полиаренов: антрацен, бенз[*a*]пирен, нафталин и фенантрен в модельных системах, представленныз питательным агаром Мюллера-Хинтона и искусственно загрязнённой почвой.

Подобраны условия для экстракции нафталина из загрязнённой почвы: УЗ-экстракция метанолом при 32 °С. Процент извлечения нафталина 79%.

Нафталин оказывает угнетающее действие на рост и развитие большинства тестируемых представителей флоры Самарской области. Наибольший токсический эффект установлен для базилика огородного, эспарцета песчаного сорта «Виагра», райграса высокого, донника белого, фацелии пижмолистной, что отражается в отсутствии всходов данных растений в загрязнённых почвах на протяжении двух недель эксперимента. Выявлены устойчивые виды растений к низким концентрациям нафталина (до 0,0145 мкг/г): овёс посевной сорта «Скакун», гречиха татарская.

Установлено, что при добавлении инокулята *P. aureofaciens* ВКМ В-2391 Д к растениям токсическое действие полиарена заметно снижалось. Наибольший положительный эффект при добавлении биофунгицида выявлен

для следующих растений: овёс посевной сорта «Скакун», салат афицион, белокочанная капуста сорта «Славанова», томат сорта «Дубрава», бораго, гречиха татарская, горчица белая.

Экспериментально установлены лучшие симбиозы «тестируемое растение – бактерии *R. aureofaciens* ВКМ В-2391 Д» для ремедиации почвы. Эффективность растений в симбиозе имеет следующий вид: томат < овёс < редис < укроп < горчица < горчица < салат < горох < капуста < клевер < гречиха < мятлик < бораго.

Для рекультивации земель, загрязнённых ПАУ, на основании проведённых экспериментальных исследований разработана технологическая схема по очистке почвы от нафталина в зависимости от его концентрации в почве. При загрязнении выше 0,145 мкг/г предложено использовать микробную деградацию, при загрязнении ниже 0,145 мкг/г – ризодеградацию установленными эффективными симбиозами «растение – бактерии».

Приведены экономические расчёты необходимых ресурсов на 1 м<sup>2</sup> загрязнённой почвы, выявлено экономически выгодное растение для симбиоза – гречиха татарская. Оценён эколого-экономического эффекта технологий, доказывающий эффективность выбранных путей очистки почвы.

## Список используемой литературы и используемых источников

1. Badea S. et al. The influence of soil composition on the leachability of selected hydrophobic organic compounds (HOCs) from soils using a batch leaching test // *J. Hazardous Mater.* 2013. Vol. 304. P. 26-35.
2. Blaszczyk E., Mielzynska-Svach D. Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts // *J. Appl. Genetics.* 2017. Vol. 58, № 3. P. 321-330.
3. Cai Q. et al. Occurrence and assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils from vegetable fields of the Pearl River Delta, South China // *Chemosphere.* 2007. Vol. 68, № 1. P. 159-168.
4. Ciffroy P., Tanaka T. Modelling the Fate of Chemicals in Plants // *Handb. Environ. Chem.* 2018. Vol. 57, № 7. P. 167-189.
5. Ehrenfreund P., Rasmussen S., Cleaves J., Chen L. Experimentally tracing the key steps in the origin of life: The aromatic world // *Astrobiology.* 2006. Vol. 6, № 3. P. 490-520.
6. Isaac P. et al. Indigenous PAH-Degrading Bacteria in Oil-Polluted Marine Sediments from Patagonia: Diversity and Biotechnological Properties // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2016. Vol. 1, № 18 P. 360-366.
7. Jajoo A. et al. Inhibitory effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on photosynthetic performance are not related to their aromaticity // *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 2014. Vol. 137. P. 151-155.
8. Jiang, Y. Contamination, source identification, and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soil of Shanghai, China // *Environ Monit Assess.* 2011. Vol. 183. P.139–150.
9. Liu H., Yang H., Chou C., Lin M. Risk assessment of gaseous/particulate phase PAH exposure in foundry industry // *J. Hazard. Mater.* 2010. Vol. 181, № 1-3. P. 105-111.
10. Maliszewska-Kordybach B., Smreczak B., Klimkowicz-Pawlas A. Concentrations, sources, and spatial distribution of individual polycyclic aromatic

hydrocarbons (PAHs) in agricultural soils in the Eastern part of the EU: Poland as a case study // *Sci. Total Environ.* 2009. Vol. 407, № 12. P. 3746-3753.

11. Matschulat D. et al. Development of a highly sensitive monoclonal antibody based ELISA for detection of benzo[*a*]pyrene in potable water // *Analyst.* 2005. Vol. 130, № 7. P. 1078-1086.

12. Muratova A. et al. Degradation of phenanthrene by the rhizobacterium *Ensifer meliloti* // *Biodegradation.* 2014. Vol. 25, № 6. P. 787-795.

13. Ning X. et al. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in textile dyeing sludge by O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment // *RSC Adv.* 2015. Vol. 5, № 43. P. 38021-38029.

14. Nisbet C., LaGoy P. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) // *Regul Toxicol Pharmacol.* 1992. Vol. 16, № 3. P. 290–300.

15. Nording M., Haglund P. Evaluation of the structure/cross-reactivity relationship of polycyclic aromatic compounds using an enzyme-linked immunosorbent assay kit // *Anal. Chim. Acta.* 2003. V. 487, № 1. P. 43-50.

16. Patel A.B. et al. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches // *Front. Microbiol.* 2020. Vol. 11. P. 2-24.

17. Pufulete, M. Approaches to carcinogenic risk assessment for polycyclic aromatic hydrocarbon: a UK perspective // *Regul. Toxicol. Pharm.* 2004. Vol. 40, № 1. P. 54-66.

18. Sagan C., Khare B., Thompson W. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmospheres of Titan and Jupiter // *The Astrophysical Journal.* 1993. Vol. 414, № 1. P. 399-405.

19. Shang J., Chen J. Schen Zh. Wang Y. Effects of varying estuarine conditions on the sorption of phenanthrene to sediment particles of Yangtze Estuary // *Mar. Pollut. Bull.* 2013. Vol.76, № 1-2. P. 139-145.

20. Szekacs A., Le H., Knopp D. A modified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for polyaromatic hydrocarbons // *Anal. Chim. Acta.* 1999. Vol. 399. P. 127-134.

21. Tejeda-Agredano M. et al. Influence of the sunflower rhizosphere on the biodegradation of PAHs in soil // *Soil Biol. Biochem.* 2013. Vol. 57. P. 830-840.
22. Thygesen R., Trapp S. Phytotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to willow trees // *J. Soils Sediments.* 2002. Vol. 2, № 2. P. 77-82.
23. Wiesche C., Martens R., Zadrazil F. The Effect of Interaction Between White-rot Fungi and Indigenous Microorganisms on Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil // *Water, Air, Soil Pollut.* 2003. Vol. 3, № 3. P. 73-79.
24. Wilcke W. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) patterns in climatically different ecological zones of Brazil // *Org. Geochem.* 2003. Vol. 34. P. 1405-1417.
25. Winqvist E. et al. Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi – From laboratory to field scale // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2014. Vol. 86. P. 238-247.
26. Xiao R. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in wetland soils under different land uses in a coastal estuary: Toxic levels, sources and relationships with soil organic matter and waterstable aggregates // *Chemosphere.* 2014. Vol. 110, № 5. P. 8-16.
27. Xiaoyong L. et al. Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by indigenous microbes combined with chemical oxidation // *Chemosphere.* 2018. Vol. 213, № 18. P. 551-558.
28. Xu C. et al. Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons on soil surfaces under UV irradiation // *J. Environ. Sci.* 2013. Vol. 25, № 3. P. 569-575.
29. Zhou N. et al. Salicylate 5-hydroxylase from *Ralstonia* sp. strain U2: a monooxygenase with close relationships to and shared electron transport proteins with naphthalene dioxygenase // *J. Bacteriol.* 2002. Vol. 184, № 6. P. 1547-1555.
30. Алексеева А.С., Потатуркина-Нестерова Н.И. Характеристика видового состава микробиоценоза прикорневой зоны *Lycopersicon esculentum* Mill // *Ульяновский медико-биологический журнал.* 2014. № 4. С. 129-132.

31. Амелин В.Г. и др. Пробоподготовка QuEChERS при одновременном определении остаточных количеств хинолонов, сульфаниламидов и амфениколов в пищевых продуктах методом ВЭЖХ с детектированием с помощью диодной матрицы // Журн. аналит. химии. 2015. Т. 9, № 70. С. 948-956.
32. Артамонова М.Н., Алексеева А.С., Потатуркина-Нестерова Н.И. Антагонистическая активность ассоциативных ризобактерий // Международный журнал экспериментального образования. 2013. № 10. С. 276-279.
33. Бабошин М.А., Баскунов Б.П., Финкельштейн З.И. Микробная трансформация фенантрена и антрацена // Микробиология. 2005. Т. 74, № 3. С. 357-364.
34. Барбаш В.А., Трембус И.В., Оксентюк Н.Н. Бумага и картон из стеблей кенафа и сорго сахарного // Химия растительного сырья. 2014. № 4. С. 217-278.
35. Барбаш В.А., Трембус И.В., Примаков С.Ф. ОрганосольVENTная делигнификация стеблей кукурузы // Химия растительного сырья. 2012. № 1. С. 45-50.
36. Басова Е.М., Иванов В.М. Современное состояние высокоэффективной жидкостной хроматографии полициклических ароматических углеводов // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. 2011. Т. 52, № 3. С. 163-174.
37. Безносиков В.А. Высокомолекулярные органические соединения в почвах // Известия Коми НЦ УрО РАН. 2010. №1. С. 24-30.
38. Безносиков В.А., Кондратенок Б.М., Габов Д.Н. Закономерности формирования полициклических ароматических углеводов // Вестник Института биологии Коми НЦ УрО РАН. 2005. №6. С. 9-15.
39. Бекузарова С.А., Ханиева И.М., Азубеков Л.Х. Фиторемедиация токсических почв // Успехи современного естествознания. 2018. № 12. С. 345-352.

40. Белянин М., Нартов А. Определение полициклических ароматических углеводов в почве методом ГХ-МС // Аналитика. 2014. №4. С. 88-99.
41. Бороздина, И.Б. Квантитативные показатели представителей рода *Pseudomonas* и *Bacillus* ризосферы растений семейства Бобовые (*Fabaceae*) и семейства Сложноцветные (*Compositae*) // Вестник Алтайского гос аграрного ун-та. 2010. Т. 73, № 11. С. 39-43.
42. Войкина А.В., Бугаев Л.А. Пробоподготовка QuEChERS при определении пестицидов различных химических классов методом ВЭЖХ // Научный журнал КубГАУ. 2017. № 132. С. 117-127.
43. Вураско А.В. и др. Исследование свойств полимерных материалов из соломы и шелухи овса // Вестник Казанского технологического университета. 2012. Т. 15, № 20. С. 155-157.
44. Вураско А.В. и др. Получение и применение полимеров из недревесного растительного сырья // Вестник Казанского технологического университета. 2012. Т. 15, № 6. С. 128-132.
45. Вураско А.В. и др. Ресурсосберегающая технология получения целлюлозных материалов при переработке отходов сельскохозяйственных культур // Химия растительного сырья. 2006. № 4. С. 5-10.
46. Габов Д.Н., Безносиков В.А., Кондратенок Б.М. Критерии оценки загрязнения почв полициклическими ароматическими углеводородами // Экология и промышленность России. 2008. № 11. С. 42-45.
47. Гажеева Т.П., Гордеева Т.Х., Масленникова С.Н. Динамика численности и состава микроорганизмов ризосферы некоторых злаковых растений в процессе их роста и развития // Вестник Оренбургского гос.ун-та. 2011. № 12 (131). С. 328-330.
48. Гаранин К.В., Гаранин В.К. Углеводородные включения в алмазе и его минералах-спутниках // Материалы XIII Международной конференции по термобарогеохимии и IV симпозиума APFIS. 2008. Т. 2. С. 237-240.

49. Гасанова А.О.К., Гахраманова Р.Ф.К. Роль сидератов в увеличении урожайности хлопчатника и плодородия почвы // Глобус. 2020. Т. 7, № 53. С. 25-27.
50. Геннадиев А.Н. и др. Геохимия полициклических ароматических углеводородов при техногенном загрязнении окружающей среды // Геохимия биосферы. 2006. С. 17-19.
51. Геннадиев А.Н., Пиковский И.Ю., Алексеева Т.А. Формы и факторы накопления полициклических ароматических углеводородов в почвах при техногенном загрязнении (Московская область) // Почвоведение. 2004. № 7. С. 804-818.
52. Гурбанов А.Н., Юсифова С.С. Взаимодействие некоторых редкоземельных элементов с 2-гидрокси-3-нафтойной кислотой в присутствии пиридина // Азербайджанский химический журнал. 2015. № 2. С. 84-88.
53. Гущина Д.Д. Анализ состояния и перспективы развития целлюлозно-бумажной промышленности в России // Вопросы науки и образования. 2019. Т. 7, № 53. С. 35-41.
54. Древин В.Е., Шипаева Т.А., Комарова В.И. Использование растительных компонентов в пищевой промышленности // Пищевая промышленность. 2012. № 12. С. 62-63.
55. Дубровская Е.В. и др. Изменение фитотоксичности полициклических ароматических углеводородов в процессе их микробной деградации // Физиология растений. 2016. Т. 63, № 1. С. 180-186.
56. Дымов А.А., Дубровский Ю.А., Губов Д.Н. Влияние пожара в северотаежном ельнике на органическое вещество почвы // Лесоведение. 2015. № 1. С. 52-62.
57. Елизарьева Е.Н., Янбаев Ю.А., Кулагин А.Ю. Особенности выбора фиторемедиационных технологий очистки почв и сточных вод от ионов тяжелых металлов // Вестник Удмуртского университета. 2016. № 3. С. 7-19.

58. Заболотских В.В., Танких С.Н., Васильев А.В. Технологические подходы к детоксикации и биовосстановлению нефтезагрязнённых земель // Известия Самарского центра РАН. 2018. Т. 20, №. 5. С. 341-351.
59. Захарченко А.В., Алексеев В.И., Ипатова Д.В. Иерархическая концепция неоднородности почв и планирование масштаба исследования // Известия ТПУ. 2016. Т. 327, №. 4. С. 149-163.
60. Зинькина Ю.В. и др. Демографические прогнозы и глобальная интеграция в ближайшей и среднесрочной перспективе // Век глобализации. 2018. Т. 25, № 1. С. 40-48.
61. Кашуба Н.А. О новых подходах к оценке влияния пыли на органы дыхания // Гигиена и санитария. 2018. Т.9 7, №. 3. С. 264-268.
62. Киреева Н.А. и др. Подбор растений для фиторемедиации почв, загрязненных нефтяными углеводородами // Известия Самарского научного центра РАН. 2011. Т. 13, № 5. С. 184-187.
63. Кобраков К.И. и др. Теория и практика использования красителей, извлекаемых из растительного сырья, для колорирования текстильных материалов. Состав экстрактов // История и педагогика естествознания. 2018. № 1. С. 21-27.
64. Коковкин В.В., Рапута В.Ф. Мониторинг многокомпонентного загрязнения окрестностей Новосибирского электродного завода // Интерэкспо Гео-Сибирь. 2017. Т. 4, № 1. С. 116-120.
65. Комарова Н.А. Эффективность использования зелёного удобрения в Нижегородской области // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2015. Т. 3, № 46. С. 43-49.
66. Константинова Е.Ю. и др. Полициклические ароматические углеводороды в почвах промышленных и селитебных зон Тюмени // Известия ТПУ. 2018. Т. 329, № 8. С. 66-79.
67. Корнилова А.Г. и др. Элементный анализ почв с их предварительной деструкцией химическими методами // Вестник Казанского технологического университета. 2011. № 6. С. 36-43.

68. Кошелева И.А. и др. Деграция фенантрена мутантными штаммами – деструкторами нафталина // Микробиология. 2000. № 6. С. 783-789.
69. Кринари Г.А., Шинкарев А.А., Гиниятуллин К.Г. Пробоотбор и пробоподготовка образцов почв к рентгенографическому фазовому анализу. Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2007. 30 с.
70. Крылов В.А. и др. Влияние света люминесцентных ламп на стабильность образцов, содержащих полициклические ароматические углеводороды // Вестник ННГУ. 2010. Т. 1, № 4. С.79-85.
71. Крыщенко В.С., Рыбьянец Т.В., Кравцова Н.Е. Мониторинг изменения дисперсности и гумусности почв в условиях аридизации климата // Аридные экосистемы. 2014. Т. 20, № 3. С. 110-118.
72. Кузнецов А.Е и др.. Прикладная экобиотехнология : учебное пособие : в 2 т. Т. 1. М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. 692 с.
73. Лещев С.М., Антончик В.В., Окаева Е.Б. Фурс С.Ф. Экстракция полициклических ароматических углеводородов полярными органическими растворителями и ионными жидкостями // Вес. Нац. акад. наук Белоруссии. 2013. № 3. С. 45-50.
74. Лобанова А.Ю. и др. Определение полиароматических углеводородов в продуктах питания и объектах окружающей среды методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа // Экология. 2007. Т. 8. С. 169-183.
75. Максимова Е.Ю., Цибарт А.С., Абакумов Е.В. Полициклические ароматические углеводороды в почвах, пройденных верховым и низовым пожаром // Известия Самарского научного центра РАН. 2013. Т. 15, № 3. С. 63-68.
76. Медведева М.В. и др. Микробиологические основы трансформации азот- и углеродсодержащих соединений в почвах урбанизированных территорий // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. 2018. Т. 3, № 172. С. 20–27.

77. Мельник И.В., Зайцев В.Ф., Обухова О.В. Миграционная активность компонентов нефтешламов Соколовских ям в Р. Кизань (дельта Волги) // Евразийский Союз Ученых. 2015. Т. 18, № 9. С. 51-52.
78. Минаева О.М., Акимова Е.Е., Семенов С.Ю. Антагонистическое действие на фитопатогенные грибы и стимулирующее влияние на рост и развитие растений формальдегидутилизирующих бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 // Вестник Томского гос.ун-та. Биология. 2008. № 2 (3). С. 28-42.
79. Михайлова Т.А., Шмаков В.Н., Тараненко Е.Н. Оценка токсичности полициклических ароматических углеводородов для растений // Известия Иркутского гос. ун-та. Биология. Экология. 2013. Т. 6, № 2. С. 27-33.
80. Монастырский В.А., Бабичев А.Н., Ольгаренко В.И., Сухарев Д.В. Возделывание горчицы сарептской в качестве сидерата // Плодородие. 2019. Т. 5, № 110. С. 45-47.
81. Никифорова Е.М., Кошелева Н.Е. Полициклические ароматические углеводороды в городских почвах (Москва, Восточный округ) // Почвоведение. 2011. № 9. С. 1114-1127.
82. Околелова А.А., Мерзлякова А.С., Кожевникова В.П. Содержание бензапирена в почвенном покрове нефтеперерабатывающего предприятия // Научные ведомости УНИИ БелГУ. Серия: Естественные науки. 2015. Т. 30, № 3. С. 111-116.
83. Охотина Н.А., Шарипова Э.Н., Ильязов М.Ф., Ефимов М.В. Проблемы загрязнения продукции резиновой промышленности полициклическими ароматическими углеводородами. Часть 1. // Вестник Казанского технологического университета. 2013. Т. 16, № 3. С. 129-131.
84. Пахарькова Н.В. и др. Оптимизация выбора растений для биоремедиации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами в условиях Южной Сибири // Вестник КрасГАУ. 2015. № 8. С. 28-33.
85. Пинчук И.П., Кириллова Н.П., Полянская Л.М. Численность, биомасса и размеры клеток бактерий в ризосфере и ризоплане некоторых растений // Теоретическая и прикладная экология. 2014. № 3. С. 28-34.

86. Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Адаптивная и прогрессивная эволюция растительно-микробного симбиоза // Экологическая генетика. 2013. Т. 11, №1. С.12-22.
87. Проворов Н.А., Онищук О.П. Эколого-генетические основы конструирования высокоэффективных азотфиксирующих микробно-растительных симбиозов // Экологическая генетика. 2019. Т. 17, №1. С. 11-18.
88. Пунтус И.Ф., Филатова И.Ю., Фунтикова Т.В. Салицилатгидроксилазы бактерий и роль горизонтального переноса генов катаболических плазмид в их разнообразии // Известия ТулГУ. Естественные науки. 2017. № 2. С. 35-59.
89. Пьюл Б.О., Ммюлефе Л.С., Торто Н. Анализ полициклических ароматических углеводородов в почве с применением Agilent Bond Elut ВЭЖХ с ФЛД // Agilent Technologies. Методическая информация. Экологический контроль. 2012. С. 2-8.
90. Расчет ущерба, причиненного окружающей природной среде на объектах нефтяной промышленности: Метод. указания / Казан гос. технол. ун-т; Сост.: Андрияшина Т. В., Гасилов В. С., Осипова Л. Э., Чепегин И. В., Антонова С. А. Казань, 2005. 64 с.
91. Рогозин М.Ю., Картамышева Е.С. Вырубка лесов – экологическая катастрофа // Молодой учёный. 2017. Т. 51, № 185. С. 124-128.
92. Рогозина Е.А., Тимергазина И.Ф., Моргунов П.А. Очистка нефтезагрязненных почв бактериями рода *Pseudomonas* – основой биопрепаратов Нафтокс 12-р и Нафтокс 48-У // Нефтегазовая геология. Теория и практика. 2014. Т. 9, № 2. С. 1-18.
93. Солодун В.И. Разнокачественность почв по плодородию и продуктивности в Юго-восточном агроландшафтном районе Иркутской области // Вестник ИРГСХА. 2014. № 61. С. 18-24.
94. Соляников А.В. Микроорганизмы в почве // Молодой ученый. 2018. Т. 50, № 236. С. 75-77.

95. Торгашов В.И., Зубец О.В., Герт Е.В., Капуцкий Ф.Н. Сравнительное исследование надмолекулярной структуры целлюлозы из лиственной древесины, стеблей ржи, рапса и сои // Химия растительного сырья. 2012. № 1. С. 31-37.
96. Ульрих Д.В., Тимофеева С.С. Фиторемедиация загрязненных почв и техногенных грунтов хвостохранилищ на территории меднорудных предприятий Южного Урала // Горный информационно-аналитический бюллетень. 2016. № 3. С. 341-349.
97. Феоктистова Н.В., Марданова А.М., Хадиева Г.Ф. Ризосферные бактерии // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. Науки. 2016. Т. 158, № 2. С. 207-224.
98. Халиков И. С. Экстракция полиаренов из почв с помощью метода QuEChERS // Вестник научных конференций. Тамбов. 2016. № 7. С. 130-131.
99. Халилова Д.И., Юнусова Д.М. Анализ методов очистки нефтезагрязненных почв при авариях на объектах нефтегазовой отрасли и транспорте // Бюллетень результатов научных исследований. 2017. № 1. С. 23-31.
100. Хапчаев С.А. и др. Специфичность симбиотических взаимодействий бактерий рода *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* с растениями трибы *Viciae* // Экологическая генетика. 2018. Т. 16, №4. С. 51-60.
101. Хатмуллина Р.М., Сафарова В.И., Кудашева Ф.Х. Хроматографическое определение полициклических ароматических углеводородов в нефтешламах // Журнал аналитической химии. 2012. Т. 67, № 3. С.290–296.
102. Хлыстов И.А. Углерод и азот органических соединений почвы в условиях загрязнения выбросами медеплавильного завода // Вестник КрасГАУ. 2015. № 5. С. 17-22.

103. Холодов А.С., Кириченко К.Ю., Задорнов К.С., Голохваст К.С. Влияние твердых взвешенных частиц атмосферного воздуха населенных пунктов на здоровье человека // Вестник КамчатТГУ. 2019. № 49. С. 81-88.
104. Чижова Т.Л. и др. Распределение полициклических ароматических углеводородов в воде, взвеси и донных отложениях эстуариев рек залива Петра Великого // Вестник ДВО РАН. 2013. Т. 172, № 6. С. 149-155.
105. Шафикова Т.Н. и др. Эфиры ортофталевой кислоты подавляют способность фитопатогенов образовывать биоплёнки // Доклады академии наук. 2018. Т. 480, № 3. С. 381-383.
106. Шилова Н.И., Чудовский А.С. Хроматографический анализ состава полиароматических углеводородов продуктов переработки природных энергоносителей // Молодой учёный. – 2017. – Т. 136, № 2. – С. 46-50.
107. Штарк О.Ю. и др. Многокомпонентный симбиоз бобовых с полезными почвенными микроорганизмами: генетическое и эволюционное обоснование использования в адаптивном растениеводстве // Экологическая генетика. 2011. Т. 9, №2. С. 80-94.
108. Шурхно Р.А. и др. Биологическая активность ризосферы многолетних бобовых культур // Достижения науки и техники АПК. 2007. № 3. С. 16-20.
109. Яковлева Е.В., Безносикова В.А., Кондратенок Б.М. Генотоксические эффекты в растениях *Tradescantia (clon 02)* индуцированные бенз[а]пиреном // Сиб. экол. журн. 2011. Т. 18, № 6. С. 805-812.
110. Яковлева Е.В., Габов Д.Н. Дальность распространения полициклических ароматических углеводородов в тундровой зоне под воздействием ТЭС // Вестник РУДН. 2019. Т. 27, № 3. С. 184-198.
111. Яковлева Е.В. Оценка показателей загрязнения тундровых фитоценозов полициклическими ароматическими углеводородами // Поволжский экологический журнал. 2016. № 3. 352-366.

112. Яковлева Е.В. Полициклические ароматические углеводороды в растениях естественных бугристых болот // Принципы экологии. 2019. № 2 (32). С. 119-128.

113. Янин, Е.П. Органические вещества техногенного происхождения в водах городских рек // Экологическая экспертиза: Обзорная информация. 2004. № 4. С. 42-67.