

УДК 579.26:579.64

Э. Р. ФАЙЗУЛИНА

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ

*(ДГП «Институт микробиологии и вирусологии» РГП «ЦБИ» КН МОН РК)*

В обзоре рассматриваются способы восстановления нефтезагрязненных почв. Для биоремедиации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, используют два метода: стимуляция естественной нефтеокисляющей микрофлоры путем создания оптимальных условий для ее развития; введение в загрязненную экосистему активных углеводородокисляющих микроорганизмов наряду с различными добавками.

Развитие промышленности, добыча и транспортировка полезных ископаемых приводят к возрастающему поступлению в экосистемы различных токсикантов. Среди множества загрязнителей необходимо выделить нефть и нефтепродукты, поступление которых в окружающую среду постоянно возрастает и оказывает токсическое действие на все звенья пищевой цепи.

Углеводороды нефти способны образовывать в процессе трансформации токсичные соединения, обладающие канцерогенными и мутагенными свойствами, стойкостью к микробиологическому расщеплению и способностью переходить в растения, что значительно снижает качество возделываемых культур и создает угрозу для здоровья человека и животных.

Загрязнение почвы нефтепродуктами в местах расположения предприятий нефтегазового комплекса, как по технологическим причинам, так и вследствие аварийных инцидентов, делает актуальными разработку и применение новых эффективных средств ликвидации последствий таких загрязнений, а также осуществление комплекса превентивных мер.

В зависимости от интенсивности и продолжительности загрязнения почв и грунтов нефтью предусматривают техническую, химическую и биологическую рекультивацию. Первая из них включает работы по очистке территории, планировке нарушенных участков и механической обработке почвы (рыхление, дискование) для искусственной аэрации ее верхних горизонтов и ускоренному выветриванию загрязнителя [1].

На этапе химической и биологической рекультивации осуществляются различные агротехнические и фитомелиоративные мероприятия, могут использоваться инокуляты биологических

агентов с целью создания или восстановления качественной плодородной почвы.

Биологические методы разрушения углеводородов применяют в тех случаях, когда их количество мало, чтобы использовать механические средства сбора, но, с другой стороны, слишком велико, чтобы использовать загрязненные земли в хозяйственных целях (содержание углеводородов до 5% от веса почвы) [2].

Существуют 2 принципиальных подхода к биодegradации углеводородов в объектах окружающей среды [3, 4]:

1) стимуляция естественной нефтеокисляющей микрофлоры путем создания оптимальных условий для ее развития (внесение азотно-фосфорных удобрений, аэрация и пр.);

2) введение в загрязненную экосистему активных углеводородокисляющих микроорганизмов наряду с добавками солей азота, фосфора, извести и т.д. (биоаугментация или «биоулучшение»). Для каждого из этих подходов существует своя область применения.

Результат по первому способу достигается путем оптимизации соответствующих физико-химических условий среды, то есть факторов, увеличивающих биодegradацию нефти и нефтепродуктов. С этой целью наряду с широко известными агротехническими приемами используются обработки, учитывающие определенные особенности нефтяного загрязнения. Интенсификация этим способом включает следующие приемы.

Внесение в почву дефицитных элементов питания: азотных, фосфорных и калийных [5] (Гарейшина и др., 1991); азот предлагается вносить в аммонийной форме [6]. Известны удобрения, например, мочевины, покрытая серой [7], коммерческий препарат Inipol EAP 22, содержащий

олеофильный аммоний и фосфат [8] (Sirvins, Angeles, 1986), которые особенно эффективны, благодаря медленному их высвобождению. Применение таких препаратов увеличивает скорость биодegradации, даже в условиях Арктики.

Кроме элементов питания, вносятся в почву реагенты, корректирующие почвенную кислотность. рН почвы может быть лимитирующим фактором, особенно в почвах с кислой реакцией [9], поэтому кислые почвы подвергают известкованию, которое также снижает подвижность токсичных веществ нефти [10]. Н. П. Солнцева [11] предлагает гипсование для активного восстановления дерново-подзолистых почв, превратившихся в техногенные солончаки и солонцовые почвы под действием нефтяного загрязнения. При этом считается, что в присутствии воды кальций вытесняет натрий и образуется сульфат натрия, который вымывается и вследствие этого снижается техногенно обусловленная щелочность почвы.

Вспашка, рыхление и дискование почвы применяются для улучшения доступа кислорода в зону биоокисления [12, 13]. Распашку нефтезагрязненных территорий рекомендуется проводить спустя некоторое время после загрязнения, в течение которого нефть частично разлагается. Также рекомендуют применять специальные приемы для вентиляции нефтезагрязненных почв: закачку горячего водяного пара воздуха ( $O_2$ ) или других акцепторов электронов. Иногда для этого применяют орошение загрязненных почв раствором перекиси водорода [14, 15].

Изучается возможность использования различных биодобавок, которые легко используются микроорганизмами и содействуют включению микроорганизмов, способных к соокислению, в процесс биодegradации. В частности, применение белково-витаминного концентрата (БВК), представляющего обработанную биомассу углеводородсваивающих дрожжей родов *Candida*, *Rhodotorula*, ускоряет дegradацию углеводородов и снижает токсичность почвы к растениям [16].

Для очистки больших территорий предлагается использовать широко распространенные сорбенты органического происхождения (торф, мох, чернозем, уголь), глины и глинистые минералы с высокой емкостью поглощения по отношению к загрязнителям (клиноптиллолит, вермикулит, монтмориллонит на легких почвах), перли-

товый песок. Они могут быть использованы и для иммобилизации углеводородокисляющих микроорганизмов [17].

Вторая группа биотехнологических приемов очистки почв от нефти включает, наряду с оптимизацией условий для активизации углеводородокисляющих микроорганизмов, внесение их в виде промышленных биопрепаратов.

Существуют ситуации, когда введение бактериальных нефтеокисляющих препаратов не только оправданно, но и совершенно необходимо. Например, в северных районах, где теплый период года непродолжителен, процессы биодegradации не успевают развернуться в полной мере, и повышение численности углеводородокисляющих микроорганизмов путем интродукции активных форм будет полезно.

В лабораторных условиях исследовали эффективность применения нефтеокисляющего сообщества микроорганизмов в биоремедиации нефтезагрязненной почвы. Особенностью сообщества является способность эффективно окислять углеводороды нефти как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Степень разложения углеводородов нефти в вариантах биоремедиации за первые два месяца эксперимента увеличилась в ряду: самоочищение (40 %) < внесение нитрата (42 %) < интродукция денитрифицирующего нефтеокисляющего сообщества (50%) < интродукция денитрифицирующего нефтеокисляющего сообщества + внесение нитрата (60%). Через 8 месяцев эксперимента убыль нефти в варианте с интродуцированным сообществом и нитратом была наибольшей и достигла 90%, тогда как в случае самоочищения убыль составила менее 60%. Анализ хлороформных экстрактов почв в случае самоочищения и биоремедиации с интродуцированным сообществом и нитратом показал, что в последнем варианте количество тяжелой фракции нефтяных углеводородов меньше, чем при самоочищении [4].

Проведена сравнительная оценка эффективности использования активного штамма-деструктора *Dietzia maris* AM3 и стимуляции естественной микрофлоры для ремедиации загрязненной нефтью почвы. В почве со свежим нефтяным загрязнением интродукция штамма *D. maris* AM3 ускорила процесс очистки в 2 раза в течение первого месяца в сравнении со стимуляцией, через 3 месяца уровень очистки был примерно одина-

ковым. По окончании ремедиации почва с интродуцентом отличалась более высокой дегидрогеназной и каталазной активностью [18].

При исследовании влияния бактерий рода *Azotobacter* на эффективность использования препарата «Деворойл» для биоремедиации нефтезагрязненной почвы была подтверждена эффективность совместного применения биопрепарата и азотобактера. Определение содержания нефти в почве показало, что через 6 недель эксперимента количество нефти в контроле снизилось на 37%, при обработке загрязнённой почвы препаратом «Деворойл» - на 69%, при интродукции популяции на - 64%, а при одновременной обработке почвы препаратом «Деворойл» и суспензией клеток *Azotobacter* - на 79%. При этом всхожесть семян пшеницы в контроле составляла 30%, при применении препарата «Деворойл» - 58%, а при совместном применении препарата и азотобактера - 80% [19].

В настоящее время предлагается для использования достаточно широкий набор препаратов.

Для очистки нефтезагрязненных почв фирма «Ноггерат» [20] предлагает использовать биопрепарат «Noggies», представляющий собой смешанные культуры специальных штаммов микроорганизмов, безвредных для людей и животных. Они предназначены для разложения в почве мазута, дизельного топлива, бензина, керосина, фенолов и формальдегидов.

Препарат «Hydrobac» представляет собой смесь штаммов бактерий, адаптированных к разрушению ряда углеводов. При обработке препаратом загрязненной почвы содержание нефти снижается на 66% за 35 дней, и к концу второго месяца после обработки она была пригодна для посева сельскохозяйственных растений [21].

На основе нового селекционного бактериального штамма *Bacillus megaterium* разработан биопрепарат, который применяется с поверхностно-активным веществом, обладающим пенообразующим и эмульгирующим эффектом по отношению к нефтепродуктам [22].

Сравнительный эксперимент 5-ти биопрепаратов («Биоприн», «Руден», «Путидойл», «Биосорб» и «Олеоворин») показал, что наиболее эффективными для биодеструкции мазута оказались «Олеоворин» и «Руден». Степень биодеструкции благодаря этим препаратом достигала 94% и 74%, соответственно [1].

Биопрепарат «Родер» представляет собой смесь двух жизнеспособных и активных штаммов родококков, выделенных из природных загрязненных нефтью объектов. Полевые испытания на застарелом мазуте и железнодорожном шламе показали, что за три обработки препарат способен снизить концентрацию углеводов на 65-84% и 22-54% соответственно [23, 24].

На нефтепромысле Татарстана в полевом эксперименте испытан препарат «Деворойл» [25], который представляет собой ассоциацию, состоящую из *Rhodococcus sp.*, *Rhodococcus maris*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Candida sp.* Назначение биопрепарата – очистка воды (пресные и соленые водоемы) и почвы с нефтезагрязнения до 100 кг/м<sup>3</sup>; очистка грунтов и рекультивация территорий нефтедобычи и нефтепереработки, депарафинизация нефтяных скважин и очистка буровых шламов от углеводов. Специальные добавки в составе биопрепарата активизируют процесс деструкции нефти. Простота технологии применения препарата позволяет использовать обычные механизированные средства для распыления, а на больших площадях – авиацию. Технология очистки загрязненных нефтепродуктами почвогрунтов, водоемов с использованием препарата «Деворойл» применялась при ликвидации аварийных разливов трубопроводов, поломках технологического оборудования на ряде объектов Оренбургской области и республики Башкортостан. Эффективность очистки почв и водоемов составляла 85 и 98% соответственно. Препарат окислял нефть во всех вариантах эксперимента при следующих уровнях загрязнения: девонской нефтью – 60 до 180 м<sup>3</sup>/га и бобринской – 120 м<sup>3</sup>/га. Максимум углеводородокисляющей активности микроорганизмов пришел на первые три месяца после внесения препарата, когда содержание нефти в почве снизилось на 78,8 % (по сравнению с первоначальным содержанием), а степень фитотоксичности почвы достигла фонового уровня.

Для очистки территорий, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, предлагается использовать биопрепарат «Экойл», созданный на основе штаммов *P.putida* 9, *Mycobacterium flavescens* EX-91 и *Acinetibacter sp.* НБ-1 [26]. Этот препарат прошел успешные испытания в реальных условиях в ПО «Нижевожскнефть», где производили очистку водоема, загрязненного

нефтью в результате аварийного разлива нефтепровода. Через 2 месяца с начала использования биопрепарата, загрязненность водоема составила 0,06%.

Использование биопрепарата «Путидойл», созданного на основе штамма *P. putida* 36 в исследованиях по деструкции нефтепродуктов во флотаторах установки по очистке балластных вод, показало снижение содержания нефтепродуктов в сбросных водах установок в 30-100 раз [27]. Кроме этого, при использовании препарата, значительно повышается аэрация воды, что ускоряет процессы естественного самоочищения морской воды от нефтепродуктов в районах сброса балластных вод в море.

Биопрепарат «Экогеос-1», предлагаемый для очистки нефтезагрязненных почв, включает адаптированную к углеводородам нефти бактериальную культуру *P. putida* и биогенные добавки (азот и фосфор). Используемый иммобилизатор-гидрофобизированный торф, является не только носителем бактериальных клеток, но также адсорбентом нефтепродуктов, за счет чего происходит разрушение нефтяной пленки и увеличение доступа кислорода, что активизирует процесс биодеструкции нефтепродуктов.

При биоремедиации нефтезагрязненных почв Тюменской области (Сургутский район) с использованием биопрепарата «Псевдомин», созданного на основе активного штамма - нефтедеструктора *P. putida* 91-96 в течение 25 месяцев происходит почти полное разложение дизельного топлива, мазута и биопрепарата эффективности очистки достигает 98,1%. Микробиологический анализ образцов рекультивируемой почвы выявил высокую активность штамма и его способность размножаться в загрязненной почве [1].

Таким образом, анализ литературных данных позволяет констатировать, что биологический способ очистки окружающей среды и, в частности, почвы, от загрязнения нефтью и нефтепродуктами, является одним из наиболее доступных, экологических и экономически оправданных методов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кураков А.В., Ильинский В.В., Котелевцев С.В., Садчиков А.П. Биоиндикация и реабилитация экосистем при нефтяных загрязнениях. М.: Изд-во «Графикон», 2006. 336 с.
2. Коронелли Т.В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводородов в окружающей

среде // Прикл. биохимия и микробиология. 1996. Т. 32, № 6. С. 579-585.

3. Кобзев Е.Н., Петрикевич С.Б., Шкидченко А.Н. Исследование устойчивости ассоциации микроорганизмов-нефтедеструкторов в открытой системе // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. № 4. С. 413-417.

4. Рахимова Э.Р., Оситова А.Л., Зарипова С.К. Очистка почвы от нефтяного загрязнения с использованием денитрифицирующих углеводородокисляющих микроорганизмов // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. № 6. С. 649-653.

5. Гарейшина А.З., Кузнецова Т.А., Остробокова С.И. и др. Влияние закачки аэрированных растворов минеральных солей на микрофлору воды призабойных зон нагнетательных скважин нефтеместорождений // Микробиология. 1991. Т. 60, № 4. С. 741-745.

6. Исмаилов Н.М. Микробиология и ферментативная активность нефтезагрязненных почв // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М., 1988. С. 42-56.

7. Smith A.D. Stimulation of Oil Biodegradation by Using Slow-release Fertilizers // Biochem. Soc. Trans. 1985. V. 13, N 2. P. 523-525.

8. Sirvins A., Angeles M. Biodegradation of petroleum hydrocarbons // NATO ASI Series. 1986. V. G9. P. 253-258.

9. De Borger R., Vanlooche R., Verlind A., Verstraete W. Microbial degradation of oil in surface soil horizons // Rev. Ecol. et Biol. sol. 1978. V. 15, N 4. P. 445-452.

10. Самосова С.М., Мигибаев В.Г., Артемьева Т.И. Влияние засоления почвы нефтепромысловыми сточными водами на свойства почвы и ее биологическую активность // Мат. 2 симп. «Биодинамика почв. Сезонная динамика почвенных процессов». Таллин, 1979. С. 183-185.

11. Солнцева Н.П. Геохимическая трансформация дерново-подзолистых почв под влиянием потоков высокоминерализованных сточных и пластовых вод. Техногенные потоки веществ в ландшафтах и состояние экосистем. М.: Наука, 1981. С. 155-193.

12. Мукатанов Ф.Х., Ривкин П.Р. Влияние нефти на свойства почв // Нефтяное хоз-во. 1980. № 4. С. 53-54.

13. Odu C.T.I. Oil degradation and microbiological chance in soils deliberately contaminated with petroleum hydrocarbons // Inst. Petrol. 1977. N. 5. P. 1-11.

14. Baehr A.L., Hoag G.E. A modeling and Experimental Investigation of Induced Venting of Gasoline-Contaminated Soils // Soils Cont. by Petrol (ed. By Calabrese a. P.T. Kostecki) - New York etc.: Wiley-Intersci. Publ. 1988. P. 113-123.

15. Hoeppel R.E., Hinchee R.E., Arthur M.F. Bioventing soils contaminated with petroleum hydrocarbons // J. Industr. Microbiol. 1991. V. 8. P. 141-146.

16. Куреева Н.А., Ямалетдинова Г.Ф. Изменение видового разнообразия микроорганизмов в нефтезагрязненных почвах Республики Башкортостан // Матер. междунар. конф.: «Биоразнообразие и биоресурсы Урала и сопредельных территорий». Оренбург, 2001. С. 12-13.

17. Суржко Л.Ф., Финкельштейн З.И., Баскунов Б.П., Головлева Л.А. Утилизация нефти в почве и воде микробными клетками // Прикл. биохимия и микробиология. 1995. Т. 64, № 3. С. 393-398.

18. Плевакова Е.В., Дубровская Е.В., Рурковская О.В. Сравнение эффективности интродукции нефтеокисляющего штамма *Dietzia maris* и стимуляции естественных

микробных сообществ для ремедиации загрязненной почвы // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. № 4. С. 430-437.

18. Градова Н.Б., Горнова И.Б., Эддауди Р., Салина Р.Н. Использование бактерий рода *Azotobacter* при биоремедиации нефтезагрязненных почв // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. № 3. С. 318-321.

19. Schussler H. "Noggies" naschen 01 // Umweltschultz. 1988. N 10. P. 14-19.

20. Киреева Н.А. Микробиологические процессы в нефтезагрязненных почвах. Уфа: БашГУ, 1994. 172 с.

21. Москвиченко М.В., Стабникова Е.В., Иванов В.Н., Панежда И.А. Использование биогенных поверхностно-активных веществ в микробиологической очистке почвы от углеводородов нефти // Микробиол. журнал. 1993. Т. 55, № 1. С. 75-78.

22. Мурыгина В.П., Калюжный С.В. Биорекультивация препаратом-нефтедеструктором Родер почв и водной поверхности, загрязненных углеводородами // Мир нефтепродуктов. 2008. № 8. С. 24-29.

23. Мурыгина В.П., Тумасянц А.И., Янкевич М.И., Жуков Д.В., Калюжный С.В. Биоремедиация застарелого мазута и железнодорожного шлама препаратом-нефтедеструктором «Родер» (полевые испытания) // 4-й Московский междунар. конгр. «Биотехнология: состояние и перспективы развития»: Тезисы докл. М., 2007. С. 132.

24. Борзенков И.А., Милехина Е.И. и др. Патент РФ № 2805 Консорциум микроорганизмов «Deveoroil», используемый для очистки почвенных и солоноватоводных экосистем от загрязнения нефтепродуктами. Опубл. 15.12.95.

25. Чугунов В.А., Холоденко В.П., Кобелев В.С. Разработка и испытание жидких препаратов «Экойл» на основе нефтеокисляющих бактерий // VI конф. РФ «Новые направления биотехнологии»: тезисы докл. Пущино, 1994. С. 56.

26. Сидоров Д.Г., Борзенков И.А. Очистка почвы от нефтяного загрязнения с использованием микробиологического препарата в условиях полевого эксперимента // 3-я Междунар. конф. «Освоение Севера и проблемы рекультивации»: Тезисы докл. СПб., 1996. С. 174-175.

## Резюме

Шолуда мұнаймен ластанған топырақты қайта қалпына келтірудің әдістері қарастырылады. Мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған топырақты биоремедиациялау үшін екі әдіс қолданылады: табиғи мұнай тотықтырушы микрофлораны және оның дамуына қолайлы жағдай жасау арқылы стимуляциялау; белсенді көмірсутек тотықтырушы микроорганизмдерді мен әртүрлі қоспаларды ластанған экожүйеге енгізу.

## Summary

This review describes methods for recovering of oil-polluted soils. For the bioremediation of soils contaminated with petroleum and petroleum products, it is used two methods: the stimulation of natural oil-oxidizing microflora by creating optimal conditions for its development, the introduction of active hydrocarbon-oxidizing microorganisms with various additives.