

УДК 57.083.12:[502.65:665.6]

Рогозина Е.А., Калимуллина Г.М.ФГУП «Всероссийский нефтяной научно-исследовательский геологоразведочный институт (ВНИГРИ)», Санкт-Петербург, Россия ins@vnigri.ru

БАЛАНСОВАЯ СТОРОНА И ДИНАМИКА УТИЛИЗАЦИИ МИКРООРГАНИЗМАМИ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВЫ

Проанализирована балансовая сторона и эффективность очистки биопрепаратами серии «НАФТОКС» искусственно загрязненной нефтью (10 л/м²) почвы. Эффективность очистки оценивалась по снижению содержания в загрязненной почве нефтепродуктов и хлороформенного битумоида. За 22 месяца очистки снижение нефтяного загрязнения нефтепродуктами составило около 72%, хлороформенным битумоидом – 53–55%. Балансовые расчеты степени утилизации различных составляющих хлороформенного битумоида показали насколько сложен процесс утилизации нефти микроорганизмами и как важно соблюдать режим проведения очистки и контроль за ее ходом не только по снижению нефтепродуктов в почве, но и хлороформенного битумоида.

Ключевые слова: почва, нефтяное загрязнение, биоочистка, биопрепарат, мониторинг, эффективность очистки.

В 1991–1992 гг. ВНИГРИ совместно с лабораторией технической микробиологии ВНИИСХМ была создана серия активных биологических препаратов под общим названием «НАФТОКС» для ускоренной очистки почв, грунтов и поверхностных вод от нефти и нефтепродуктов (НП). Основу препаратов составляют живые активные непатогенные углеводородоокисляющие микроорганизмы, выделенные из зон естественных или антропогенных нефтезагрязнений. Препараты прошли лабораторную проверку и испытания в полигонных и промышленных условиях. Высокая эффективность препаратов подтверждена соответствующими актами, заключениями независимых экспертиз, результаты опубликованы в печати.

Лабораторные испытания показали следующую эффективность окисления нефти и нефтепродуктов. Нефть в целом окисляется на 40%. Составляющие нефти окислялись максимально на: масла – 70,6%, Ме-На УВ – 95,8%, Аг УВ – 87% и н-алканы – 99% (%отн. от первоначального содержания). Окисление нефтепродуктов в зависимости от их состава происходило: керосин – на 96,5%, дизельное топливо – на 76%, мазут – на 36,4%. Эффективность очистки зависит не только от состава нефтяного загрязнения, его концентрации, глубины проникновения в почву (грунт), но и от состава почвы. Последние исследования ВНИГРИ показали, что различные типы почв на одно и то же нефтяное загрязнение реагируют неоднозначно.

По результатам моделирования и ранее проведенным собственным многолетним исследованиям и материалам опубликованных работ было отмечено следующее:

- в зависимости от состава нефтяного загрязнения одна и та же почва неоднозначно реагирует на антропогенную нагрузку;

- почвы, различающиеся по минералогическому составу, содержанию органического вещества, численности и составу почвенного микробиоценоза, по-разному реагируют на одно и то же нефтяное загрязнение;

- окислительно-восстановительная обстановка в загрязненной почве оказывает влияние на направленность изменения как самой почвы, так и углеводородного загрязнителя.

Одновременно с созданием биопрепаратов разрабатывались теоретические, методологические и методические основы очистки нефтезагрязненных почв с использованием биопрепаратов серии «НАФТОКС».

Были разработаны:

- методика проведения комплексной нефтэкологической экспертизы загрязненной территории как основы для выбора оптимального режима проведения очистных работ;
- технология очистки и рекультивации нефтезагрязненных земель;
- технологии полупромышленного и промышленного приготовления препаратов серии «НАФТОКС»;
- предложена концепция построения моделей изменения основных параметров почвенных экосистем под действием углеводородного загрязнения.

Большое внимание уделялось вопросам трансформации нефти и нефтепродуктов под действием углеводородокисляющих микроорганизмов. Известно, что различные классы углеводородов, входящие в состав нефтей и продуктов их переработки, в разной степени подвергаются окислению. Л.А. Кодина (1988) в составе нефтей выделила пять групп компонентов по их устойчивости к биodeградации – от высокоустойчивых до высокочувствительных. Степень биodeградации (в % к исходному содержанию) изменяется от 0 до 100% соответственно.

На сегодняшний день контроль за ходом очистки, как правило, проводится по снижению содержания до и после очистки так называемых нефтепродуктов. Согласно ГОСТу 17.1.4.01–80 (Охрана природы. Гидросфера) под нефтепродуктами понимается сумма малополярных углеводородов (алифатические, ароматические, алициклические), составляющих главную и наиболее характерную часть нефти и продуктов ее переработки.

Извлечение их производится CCl_4 или другими растворителями с последующими очисткой на хроматографической колонке с Al_2O_3 и анализом.

Вполне очевидно, что содержание фракции нефтепродуктов в разных типах нефтяного загрязнения различно. В связи с этим расчет эффективности утилизации нефтяного загрязнения по снижению содержания нефтепродуктов является величиной относительной. Она лишь показывает насколько полно прошла биодegradация данной фракции. Ранее этот вопрос нами неоднократно обсуждался, а проведенные лабораторные исследования показали, что вне рамок количественного определения степени утилизации при таком контроле может оказаться до 40% нефтяного загрязнителя.

В связи с этим балансовая сторона и динамика биодеструкции нефтяного загрязнения почвы является одной из нерешенных проблем нефтеэкологии, хотя и представляет несомненный интерес в научном и практическом отношении.

Летом 2006 г. в Центре экологической безопасности (Санкт-Петербург) под руководством доктора биологических наук, профессора Л.П. Капелькиной были начаты исследования по оценке эффективности различных способов, включая биологический, очистки нефтезагрязненных почв. Испытания проходили на специально подготовленном полигоне, загрязненном нефтью из расчета 10 л/м². До начала работ по очистке загрязненный полигон в течение двух недель выдерживался без каких-либо нарушений.

ВНИГРИ приняло участие в этих исследованиях на следующих условиях:

- отбор контрольных и нефтезагрязненных проб почвы на отведенных институту участках до начала очистки;
- обработка загрязненных участков биопрепаратами серии «НАФТОКС» по ранее разработанной институтом технологии;
- отбор контрольных и нефтезагрязненных проб почвы через 2 месяца после начала очистки*;
- анализ отобранных проб почвы по разработанной в институте схеме проведения нефтеэкологической экспертизы и контроля за ходом очистных работ**;
- интерпретация полученных результатов биодеструкции нефтяного загрязнения.

По первоначальной дозе нефти (10 л/м²) трудно судить о фактической нефтяной нагрузке, поскольку за две недели внесенная в почву нефть частично испарилась, частично

* Отбор контрольных и нефтезагрязненных проб почвы был проведен через 2, 11 и 22 месяца после начала очистки.

** Анализы по разработанной нами схеме были выполнены в комплексной лаборатории химических и физических методов исследования УВ сырья и нефтегазоматеринских пород ВНИГРИ под руководством зав. лабораторией кандидата геол.-мин. наук А.И. Шапиро

проникла вглубь почвы. В связи с этим перед внесением биопрепарата на отведенных институту участках (7 и 8 в четырехкратной повторности), а также на контрольных участках в интервале глубин 0–5 см (согласно методическим рекомендациям основных исполнителей проекта) были отобраны способом «конверта» образцы почв.

Как показали анализы, нагрузка по нефтепродуктам в интервале 0–5 см для уч. 7 составила 48653–69637, в среднем 55544 мг/кг. Соответственно для уч. 8 содержание нефтепродуктов находилось в пределах 46150–59370, в среднем 52682 мг/кг. По данным химико-битуминологического анализа в осредненном образце почвы с уч. 7 содержание хлороформенного битумоида (ХБ) составило 85517 мг/кг, для уч. 8 – 87375 мг/кг. Таким образом, загрязненность полигона нефтепродуктами более чем в 10 раз превышала высокий уровень загрязнения почвы (3000–5000 мг/кг), установленный Госкомэкологией России в 1999 г. Нефтяное загрязнение участков, определенное по содержанию в почве ХБ, в среднем более чем в 1,5 раза превышало определенную по содержанию нефтепродуктов степень нефтяной нагрузки.

Содержание нефтепродуктов в осредненной с контрольных участков пробе почвы составляло 150 мг/кг, что оказалось в четыре раза меньше содержания в ней хлороформенного битумоида. Среднее содержание $C_{орг}$ в почве полигона до загрязнения её нефтью, как показал анализ почвы контрольных участков, составляло 2,66%.

В нефтезагрязненную почву были внесены биопрепараты Нафтокс-4Д (уч. 7) и Нафтокс-5КВ (уч. 8). Для испытания была выбрана жидкая форма препарата, приготовленная на основе активных штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов, титр которых в препаратах составлял $n \cdot 10^9$ кл/мл. Разрыхленная после отбора исходных образцов почва увлажнялась, в нее вносились необходимые для обеспечения жизнедеятельности микроорганизмов компоненты (N, K, P) и соответствующий биопрепарат. Затем участки вновь перекапывались на глубину 5 см и разрыхлялись.

Начало эксперимента проходило при температуре воздуха 20–25⁰С. Влажность, с учетом имеющейся, составляла на уч.7 20,9%, на уч. 8 – 19,7%. На контрольных участках после их увлажнения содержание влаги составило 14%.

Результаты исследования эффективности очистки нефтезагрязнений почвы через 2 и 11 месяцев после внесения биопрепаратов были опубликованы ранее [Рогозина, Калимуллина, 2007, 2008].

В 2008 г. через 22 месяца после начала очистки были отобраны в интервале 0–5 см образцы почвы контрольных и обработанных биопрепаратами участков и переданы на

анализ по ранее разработанной схеме. На основе результатов анализов нами были выполнены балансовые расчеты, позволившие оценить нефтезагрязненность участков через 22 месяца от начала очистки и не только сопоставить ее с исходной, через 2 и 11 месяцев после начала очистки, но и выявить динамику утилизации различных фракций нефтяного загрязнения и некоторых характеристик почвы.

В табл. 1 приведены результаты мониторинга эффективности очистки нефтезагрязненной почвы. Степень нефтяной нагрузки определялась по содержанию в осредненных по участкам образцах нефтепродуктов и хлороформенного битумоида. Фракция нефтепродуктов в составе нефтяного загрязнения до начала очистки составляла 60–65%. По мере снижения нефтезагрязнения содержание ее снизилось до 35–40%, что свидетельствует об утилизации наиболее доступных для микроорганизмов компонентов нефтяного загрязнения и о накоплении в почве более высокомолекулярных соединений, несмотря на достаточно высокую степень очистки. По снижению содержания нефтепродуктов эффективность очистки за 22 месяца составила ~ 72%, по снижению содержания ХБ – ~ 53–55%. Из таблицы также следует, что наиболее активно утилизация нефтяного загрязнения происходила на втором этапе очистки (конец 2-го – конец 11-го месяцев от начала очистки).

Таблица 1

**Результаты мониторинга эффективности очистки нефтезагрязненной почвы
углеводородокисляющими микроорганизмами
(Срок очистки 22 месяца, интервал отбора образцов 0–5 см)**

Участок	Продолжительность очистки, мес.	Содержание в почве НП, мг/кг	% очистки от исх. содержания	Динамика очистки, %	Содержание в почве ХБ, мг/кг	% очистки от исх. содержания	Динамика очистки, %	НП/ХБ, %
7 – 4Д	0,0	55544	0,0	0,0	85517	0,0	0,0	65,0
	2	50703	8,6	8,6	82440	3,6	3,6	61,5
	11	25890	53,3	44,7	57300	33,0	29,4	45,2
	22	15365	72,3	19,0	38528	54,9	21,9	39,9
8 – 5КВ	0,0	52682	0,0	0,0	87375	0,0	0,0	60,3
	2	47900	9,1	9,1	85180	2,5	2,5	56,2
	11	26830	49,1	40,0	56300	35,6	33,1	47,7
	22	14494	72,5	23,4	41141	52,9	17,3	35,2

На этом этапе утилизируется 49–53% нефтепродуктов от исходного их содержания или 29–33% в целом битумоида. Таким образом, как отмечалось выше, оценка эффективности очистки нефтезагрязненной почвы по снижению содержания нефтепродуктов является завышенной и характеризует степень утилизации вышеуказанной фракции.

Как следует из таблицы, биodeградация задевает не только нефтепродукты, но и битумоид в целом. Динамику изменения группового состава ХБ и фракции масел можно проследить по представленным диаграммам (рис. 1, 2).

По сравнению с исходной нефтью в составе ХБ, извлеченного из почвы через две недели после загрязнения, снизилось содержание масел и несколько возросло содержание остальных фракций. Наиболее заметные изменения в групповом составе ХБ произошли через 11 и 22 месяца после начала очистки. К концу 22 месяца содержание масел в ХБ снизилось до 36% (уч.7– 4Д) и до 40% (уч. 8 – 5КВ). Соответственно возросло относительное содержание остальных фракций (см/б, см/сб, асф).

Биodeградация затронула и качественный состав фракции масел. Через 22 месяца после начала очистки содержание метаново-нафтеновых УВ снизилось от 66% до 47% (уч. 7 – 4Д) и от 62% до 36% (уч. 8 – 5КВ). Содержание Аг I и Аг II в составе масел, естественно, возросло. На втором (через 11 месяцев) и третьем (через 22 месяца) этапах очистки в составе фракции масел резко возросло относительное содержание Аг II на уч. 8 – 5КВ по сравнению с уч. 7 –4Д: 39% против 32% и 38% против 29% соответственно.

Произошедшие изменения в качественном составе в целом битумоидов и отдельных их фракций являются величинами относительными, не позволяющими судить о фактической утилизации составляющих исходного нефтяного загрязнения.

В связи с этим были проведены балансовые расчеты, по результатам которых оценивалась абсолютная потеря всех составляющих исходного битумоида и определена степень их утилизации на каждом этапе по отношению к исходному содержанию (табл. 2). Как следует из этой таблицы, на полигоне происходил сложный процесс биохимического преобразования нефтяного загрязнения. В нем участвовали все составляющие искусственно созданной экосистемы – почва полигона, нефтяное загрязнение, внесенные с биопрепаратами углеводородокисляющие микроорганизмы, компоненты их жизнеобеспечения, естественный биоценоз, влага, атмосферный кислород. Следует отметить, что, несмотря на полностью сбалансированную (до и после очистки) битумоидную составляющую (хлороформенный битумоид), система в целом остается открытой. Изменения содержащегося в загрязненной почве органического вещества, минеральной составляющей остались не исследованными.

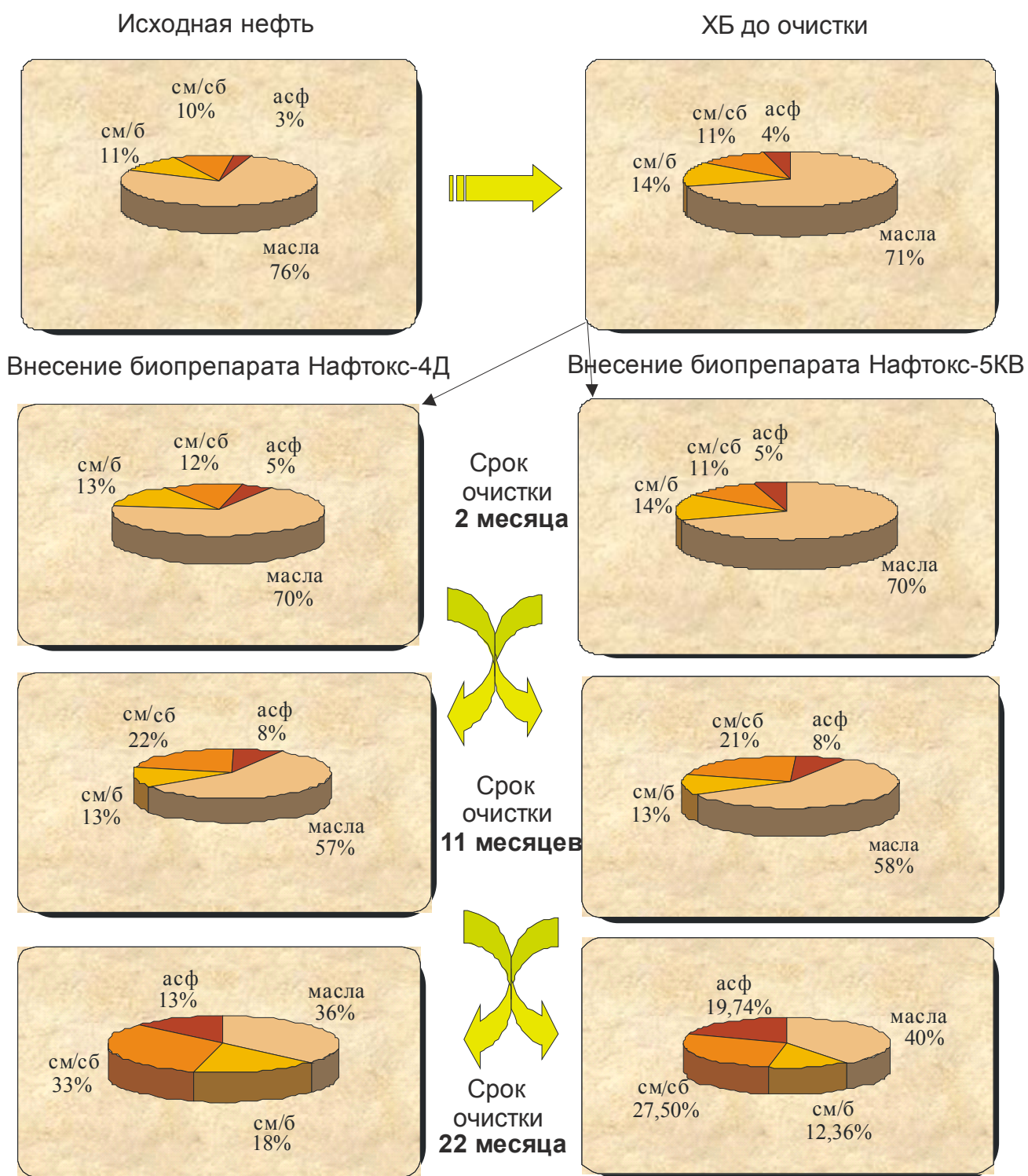


Рис. 1. Динамика изменения группового состава (% отн.) нефтяного загрязнения почвы в процессе очистки биопрепаратами серии «Нафтокс»

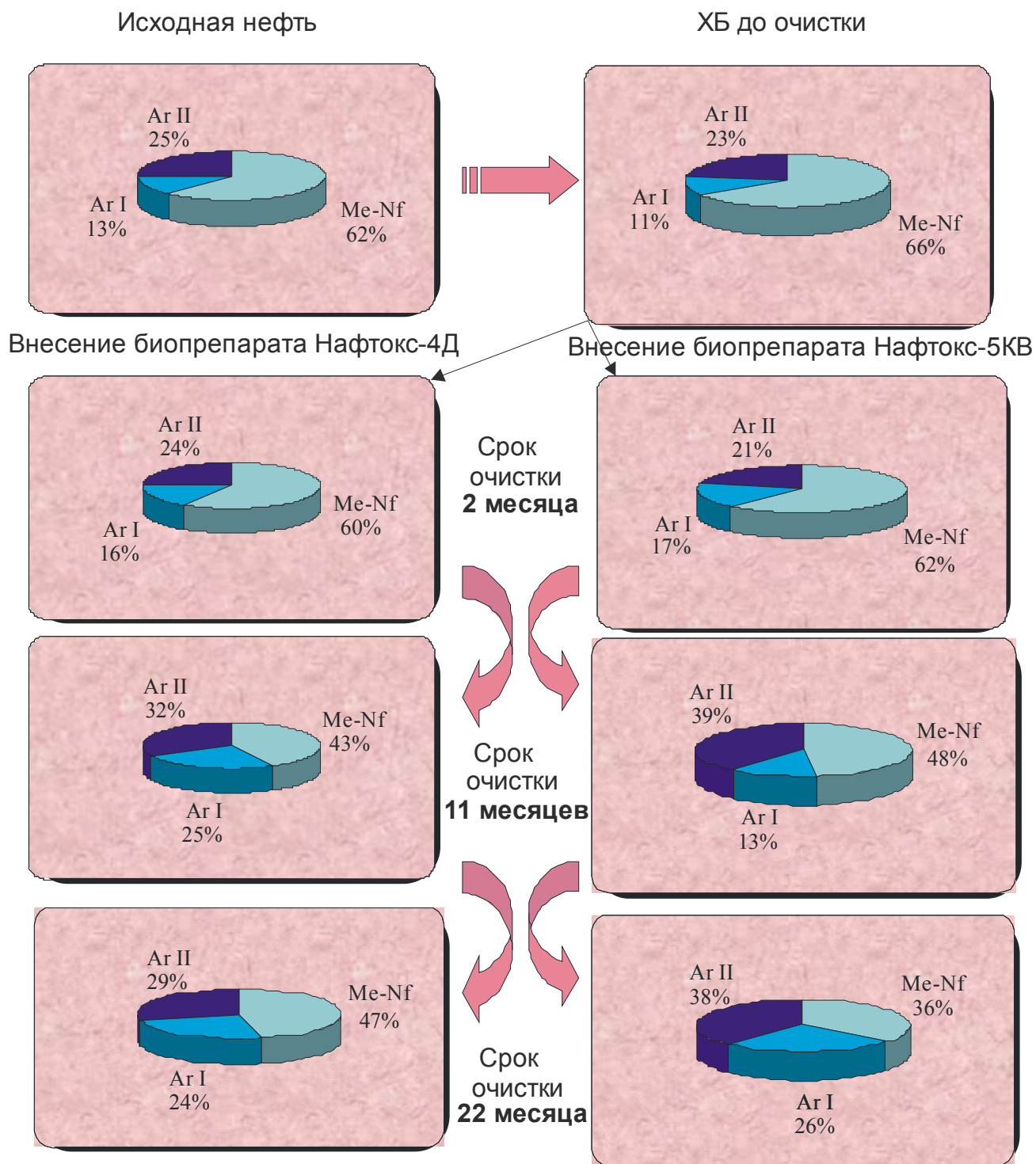


Рис. 2. Динамика изменения качественного состава (% отн.) фракции масел нефтяного загрязнения почвы в процессе очистки биопрепаратами серии «Нафтокс»

Таблица 2

Балансовая сторона утилизации нефтяного загрязнения углеводородокисляющими микроорганизмами (Глубина загрязнения 0 –5см, продолжительность очистки 22 месяца)

Участок	Продолжительность очистки, мес.	Утилизация различных фракций ХБ (% отн. исходного содержания)									
		ХБ	Масла	Смолы бенз.	Смолы сп/б	Асф.	Ме-Нф	Ar I	Ar II	н-алканы	изопреноиды
7 – 4Д	2	3,6	5,2	9,1	+9,6	+9,5	15,1	+43,0	+0,6	33,5	+64,8
	11	33,0	46,0	40,5	+40,0	+30,6	65,4	+27,2	24,5	*	*
	22	55,0	76,9	44,0	+39,6	+43,5	83,7	47,6	71,1	*	*
8 – 5КВ	2	2,5	4,1	4,5	+4,3	+15,0	10,3	47,7	10,9	17,6	+21,8
	11	35,6	47,2	42,0	+30,5	+17,7	61,3	36,5	11,4	*	*
	22	52,9	73,2	59,0	+22,5	+55,8	85,4	35,4	55,9	*	*

* Результаты выполненных в лаборатории анализов фракции Ме-Нф углеводородов до настоящего времени не переданы авторам.

За 22 месяца снижение содержания ХБ по сравнению с исходным на уч. 7 – 4Д произошло на 55,0%, на уч. 8 – 5КВ – 52,9%. Однако, утилизация нефтяного загрязнения не является однонаправленным процессом – содержание ряда фракций (М, см/б, Ме-Нф, н-алканы) снижается, других (см, сп/б, асф, изопреноиды) возрастает. Фракции Ar I и Ar II на уч. 7 – 4Д изменялись разнонаправлено, на уч. 8 – 5КВ зафиксировано их снижение на всех этапах очистки. Различна и степень утилизации фракций – масла и Ме-Нф углеводороды разрушают на 73,2 – 76,9% и 83,5 – 85,4% соответственно. На диаграммах (рис. 3, 4) приведено содержание в почве битумоида в целом и отдельных его фракций в нефтезагрязненной почве через 22 месяца после начала очистки. Несмотря на высокую степень очистки нефтезагрязненность полигона остается высокой (по содержанию нефтепродуктов 14494 – 15365 мг/кг, по содержанию ХБ 38528 – 41141 мг/кг). Превышение ПДК по нефтепродуктам ~ в 1500 раз.

Мониторинг эффективности очистки был дополнен мониторингом содержания в нефтезагрязненной почве микроорганизмов, влаги, значения рН. К сожалению, нам не удалось провести комплекс агротехнических и агрохимических мероприятий, предусмотренный разработанной во ВНИГРИ технологией биоочистки почв от нефтяного загрязнения. Имеющийся фактический материал показал следующее.

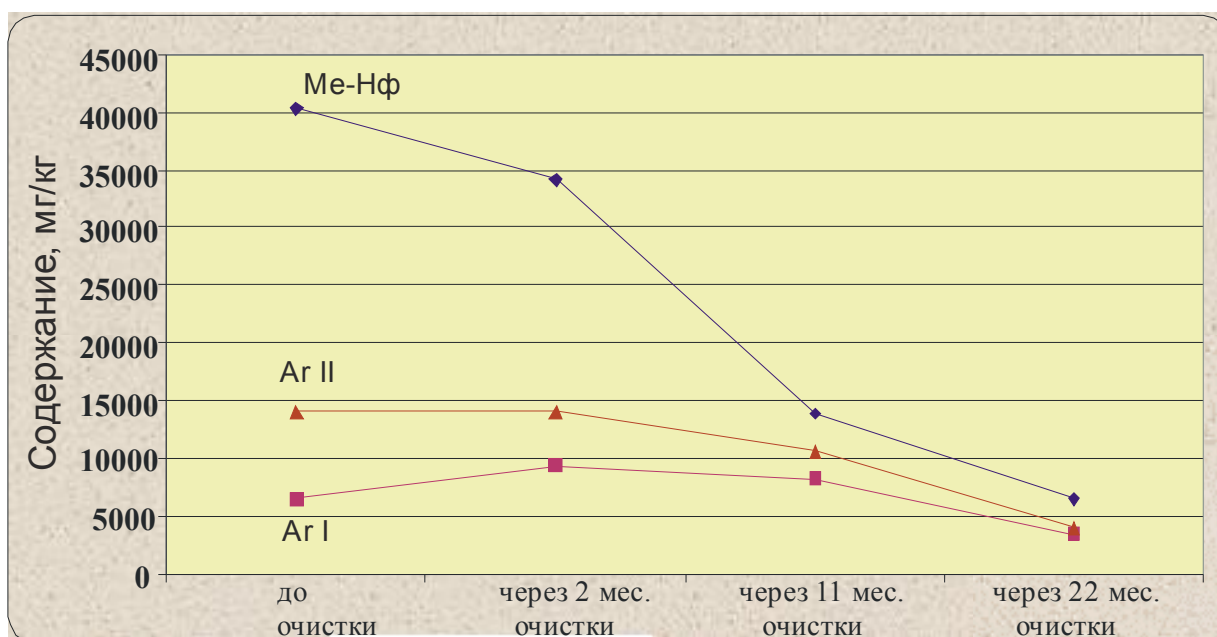
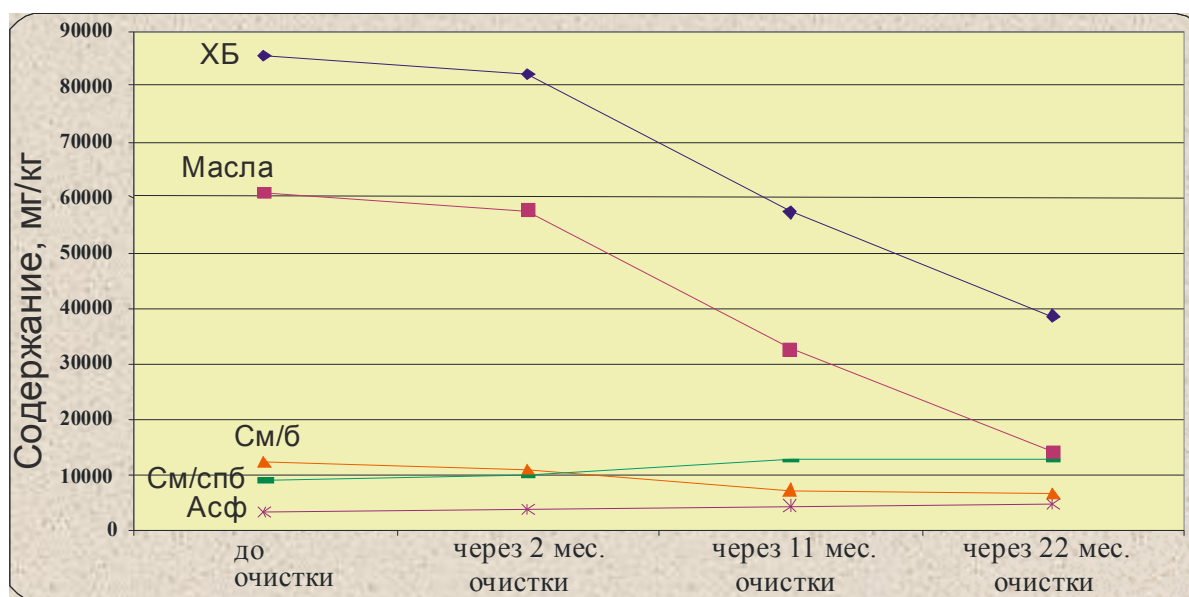


Рис. 3. Динамика изменения содержания хлороформного битумоида и отдельных его фракций в процессе очистки нефтезагрязненной почвы биопрепаратом Нафтокс-4Д

Содержание влаги в почве контролируется такими факторами как ее влагоёмкость, рельеф местности, обилие атмосферных осадков, температура воздуха. Большое влияние оказывает степень нефтяного загрязнения почвы. Содержание влаги в контрольном и загрязненных участках за время проведения эксперимента составляло:

2006 г. – 21,1% (К); 1,7% (уч. 7 –4Д); 0,7% (уч. 8 – 5КВ).

2007 г. – 32,2% (К); 18,1% (уч. 7 –4Д); 14,4% (уч. 8 – 5КВ).

2008 г. – 27,0% (К); 13,0% (уч. 7 – 4Д); 21,5% (уч. 8 – 5КВ).

На очищаемых от нефтяного загрязнения участках возрасла влагоемкость почвы.

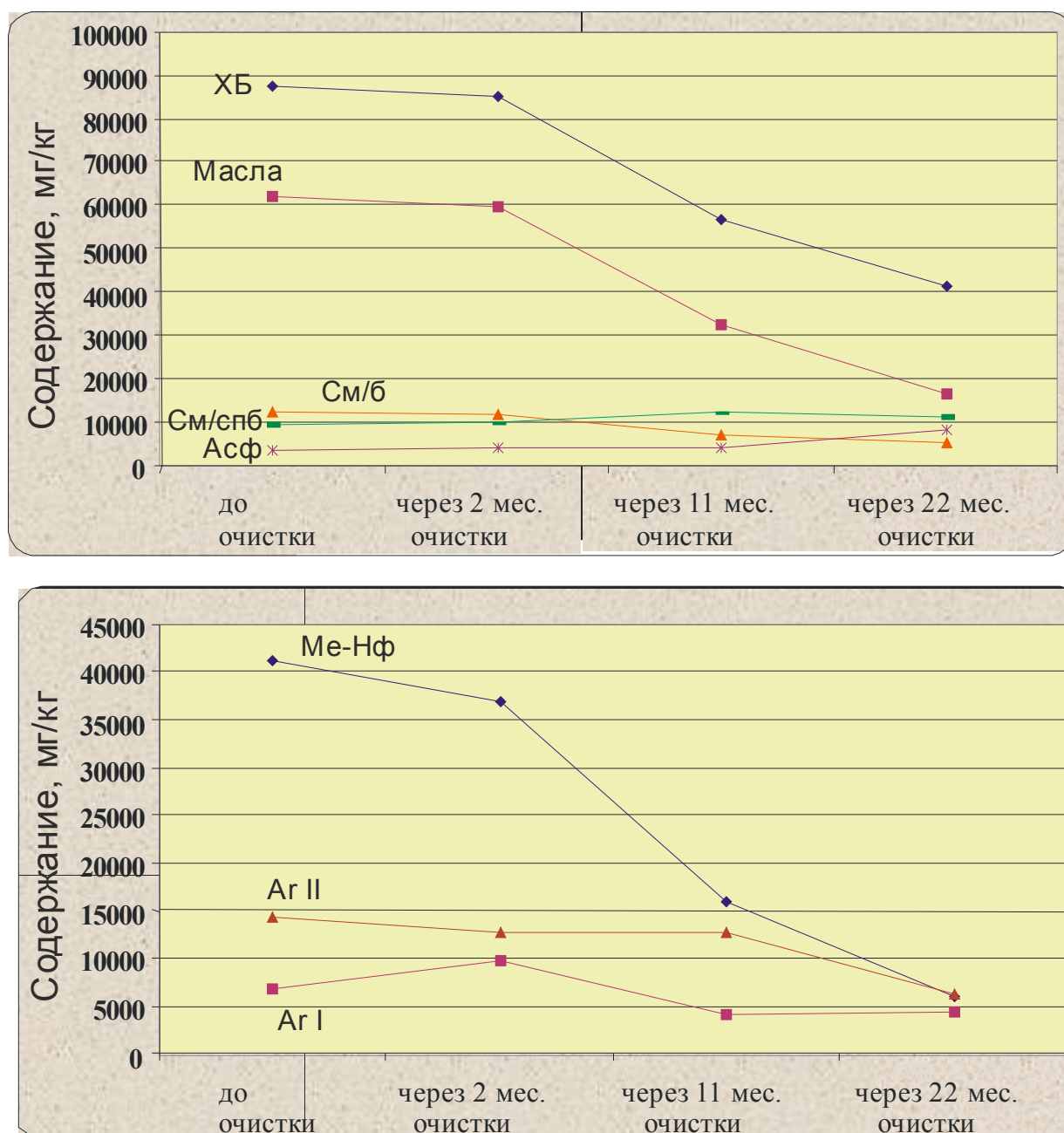


Рис. 4. Динамика изменения содержания хлороформенного битумоида и отдельных его фракций в процессе очистки нефтезагрязненной почвы биопрепаратом «Нафтокс» - 5КВ

На загрязненных участках до внесения биопрепаратов значение рН соответствовало нейтральной обстановке (6,8 – 7,0), к концу второго и на последующих этапах очистки рН нефтезагрязненной почвы соответствовало значению рН слабокислой области (5,5 – 6,2).

За 22 месяца значительные изменения произошли в микробиологической обстановке очищаемых участков. В 2006 г. через 2 месяца после начала эксперимента, несмотря на резкое снижение влаги и перехода значения рН почвы в слабокислую область, в почве, обработанной биопрепаратами в интервале глубин 0–5 см сохранился, наряду с грибами и бациллами, высокий титр углеводородоксилирующих микроорганизмов – $n \cdot 10^6$ на уч. 7 – 4Д и $n \cdot 10^7$ – на уч. 8 – 5КВ. В почве контрольных участков присутствовали только грибы и бациллы.

Микробиологическим анализом, проведенным через 11 месяцев после начала очистных работ на участках 7 – 4Д и 8 – 5КВ в интервале глубин 0 – 5 см, углеводородоксилирующие микроорганизмы (шт. 4Д и шт. 5КВ) в разведении 10^4 не обнаружены, в разведении ниже их присутствие не исследовалось. Во всех пробах почвы, включая контрольные, обнаружены в большом количестве грибы ($n \cdot 10^6$), в основном рода *Penicillum*, *Aspergillum*, и палочки ($n \cdot 10^5$ – $n \cdot 10^6$). Анализ проводился в среде МПА. На среде в присутствии $C_{15}H_{32}$ во всех пробах, включая пробы почвы контрольных участков, наблюдался значительный рост грибов ($n \cdot 10^6$) и палочек ($n \cdot 10^5$ – $n \cdot 10^6$). Внесенные в почву углеводородоксилирующие микроорганизмы не были обнаружены.

В 2008 г. присутствия в почве углеводородоксилирующих бактерий (шт. 4Д и шт. 5КВ) не обнаружено, общее количество микроорганизмов (грибы, палочки и др.), по сравнению с 2007 г., не уменьшилось ($n \cdot 10^6$ – $n \cdot 10^7$).

Третий этап биодegradации нефтяного загрязнения в силу сложившихся обстоятельств, в том числе и нарушения режима очистки, следует рассматривать как этап самоочистки почвы под действием естественного биоценоза.

Исследования балансовой стороны и динамики утилизации микроорганизмами нефтяного загрязнения почвы показали насколько сложны процессы биохимической очистки почвы, как важно соблюдать режим ее проведения и как важен контроль за ходом очистных работ не только по снижению в почве нефтепродуктов, но и битумоида в целом и отдельных его фракций.

Авторы благодарны Л.П. Капелькиной и Л.Г. Бакиной за предоставленную возможность проведения эксперимента, Н.А. Орловой за помощь и консультации при исследовании микробиологической обстановки на полигоне и надеются на дальнейшее сотрудничество.

Литература

Рогозина Е.А., Калимуллина Г.К. Балансовая сторона утилизации нефтяного загрязнения почвы биопрепаратами серии «Нафтотокс» // Нефтегазовая геология. Теория и практика. Электрон. науч. журнал, 2007(2). URL <http://www.ngtp.ru/rub/7/022.pdf>

Рогозина Е.А., Калимуллина Г.К. Динамика утилизации нефтяного загрязнения почвы биопрепаратами серии «Нафтотокс» 0420800064\0011 // Нефтегазовая геология. Теория и практика. Электрон. науч. журнал, 2008 (3). URL http://www.ngtp.ru/rub/7/7_2008.pdf

Рецензент: Якуцени Вера Прокофьевна, доктор геолого-минералогических наук, профессор

Rogozina E.A., Kalimullina G.M.

All Russia Petroleum Research Exploration Institute (VNIGRI), St. Petersburg, Russia
ins@vnigri.ru

THE BALANCE ASPECT AND DYNAMICS OF UTILIZING THE SOIL OIL POLLUTION BY MICROORGANISMS

The balance aspect and the efficiency of cleaning up the artificially oil polluted soil (10 l/m²) by the biopreparations of the "NAFTOKS" series is analyzed. The efficiency of such cleanup has been estimated on decreasing the content of oil products (OP) and chloroform bituminoids (CB) in polluted soil. After 22 months, of cleanup in the first case the decrease of oil pollution was about 72%, in the second case – 53-55%. The balance calculations of the degree of utilizing the different components of CB have shown the complication of the oil utilization process by microorganisms and necessity to keep strictly to the regime of cleanup and its control not only over OP decrease in soil but over CB decrease.

Key words: soil, oil pollution, biocleanup, biopreparation, monitoring, cleanup efficiency.

References

Rogozina E.A., Kalimullina G.K. Balansovaâ storona utilizacii neftânogo zagrâzneniâ počvy biopreperatami serii «Naftoks» // Neftegasovaâ geologiâ. Teoriâ i praktika. Èlektron. nauč. Žurnal, 2007 (2). URL <http://www.ngtp.ru/rub/7/022.pdf>

Rogozina E.A., Kalimullina G.K. Dinamika utilizacii neftânogo zagrâzneniâ počvy biopreperatami serii «Naftoks» 0420800064\0011 // Neftegasovaâ geologiâ. Teoriâ i praktika. Èlektron. nauč. Žurnal, 2008 (3). URL http://www.ngtp.ru/rub/7/7_2008.pdf