

**Е. К. Емельянова¹, А. Ю. Алексеев¹, А. В. Мокеева¹, М. В. Тарасова¹,
М. А. Шестопапов², Е. В. Карпова^{1,3}, В. А. Забелин⁴,
А. М. Шестопапов¹, Т. Н. Ильичева¹**

¹ Новосибирский государственный университет
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия

² Новосибирский институт неорганической химии им. А. В. Николаева СО РАН
пр. Акад. Лаврентьева, 3, Новосибирск, 630090, Россия

³ Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН
пр. Акад. Лаврентьева, 9, Новосибирск, 630090, Россия

⁴ ЗАО «Биоойл»
Красный пр., 13, Новосибирск, 630007, Россия

E-mail: ilyichev@mail.ru

БИОРЕКУЛЬТИВАЦИЯ ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЬЮ ОБЪЕКТОВ В ТЮМЕНСКОЙ ОБЛАСТИ*

Разработана эффективная в условиях северных регионов методика комплексной биорекультивации болотных ландшафтов Тюменской области, загрязненных нефтью. Основные приемы, входящие в состав биовосстановительной программы: агротехнические мероприятия, внесение удобрений и бактериального препарата «Биоойл-СН» методом дождевания, фиторемедиация.

Ключевые слова: рекультивация, биоремедиация, нефтяное загрязнение, микроорганизмы-деструкторы.

Острой экологической проблемой северных территорий Сибири являются разливы нефти. Низкие температуры воздуха и почвы неблагоприятно влияют на микробиологические и физические процессы естественного самоочищения экосистем, имеющих небольшую биологическую активность, относительную обедненность видового состава. В связи с этим процессы биодеструкции нефтепродуктов и других загрязнителей происходят медленно и носят кратковременный характер.

Большинство разливов нефти приурочено к буровым площадкам, местам прокладки нефтепроводов или первичной переработки нефти. Наибольшее число зафиксированных разливов нефти происходит в результате порывов нефтепроводов, обусловленных кор-

розией труб. Средний срок службы внутри-промысловых коллекторов до первой аварии составляет от 2 до 3 лет [1]. Анализ официальных данных по аварийности в системе нефтесбора на территории Ханты-Мансийского автономного округа (ХМАО) показывает, что в среднем происходит от 1 600 до 2 000 аварий в год [2]. Инвентаризация загрязненных участков на территории ХМАО показала преобладание мелких разливов площадью менее 1 га. Средняя площадь загрязненных участков колебалась в зависимости от типа ландшафта в пределах 0,6–1,7 га. Площадь загрязненных заболоченных плоских ландшафтов в 4,2 раза больше по сравнению с загрязнениями на дренированных территориях с увалистым рельефом [3]. Именно участки верховых

* Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Использование микроорганизмов-нефтедеструкторов для решения острых экологических проблем Сибирского Севера» (регистрационный номер 2.1.1/124).

олиготрофных болот наиболее тяжело поддаются рекультивации. Это связано с высоким уровнем грунтовых вод, анаэробными условиями, препятствующими окислению нефти, сложностями с доставкой техники. Рекультивация на выработанных месторождениях осложняется наличием нефтеводосолевой эмульсии, состоящей из нефти, нефтепромысловых вод, растворенных газов.

В суровых климатических условиях севера опробованы большинство методов ликвидации разливов нефти: фрезерование верхних горизонтов грунта, применение удобрений, раскислителей, фиторемедиация, внесение микробосодержащих препаратов, комплекса ферментов «Fuge-Zime» [4; 5]. К сожалению, они часто оказываются неэффективными [6]. Наиболее оптимальным способом биоремедиации в условиях Сибири, по заключению ряда авторов [7; 8] и исходя из собственного опыта, является комплексный подход, сочетающий в себе несколько интенсивных приемов.

Целью исследования была разработка перспективной комплексной технологии, обеспечивающей эффективную биодеструкцию нефти в течение короткого времени в условиях Сибирского Севера.

Материал и методы

Выделение микроорганизмов-нефтедеструкторов. Образцы почвы и воды, полученные из загрязненных нефтью территорий, инкубировали в жидкой селективной питательной среде 8E (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 1,5; KH_2PO_4 – 0,7; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8; NaCl – 0,5; pH 7,2 с добавлением нефтепродукта по весу (до 0,5–2 %) на качалке при температуре 10 °С; затем полученные накопительные культуры переносили на агаризованную среду 8E для получения чистых культур углеводородокисляющих микроорганизмов.

Морфологические признаки полученных изолятов-деструкторов изучали с помощью световой микроскопии живых и окрашенных клеток с использованием микроскопа Carl Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия).

Идентификацию штаммов бактерий осуществляли по определителю Берджи [9]. Оценку способности микроорганизмов к деструкции нефти осуществляли в жидкой

питательной среде с добавлением нефти месторождений Западной Сибири в качестве единственного источника углерода. Биоэмульгирующие и биodeградирующие способности микроорганизмов оценивали визуально и с помощью газовой хроматографии. Выбор эффективных штаммов-деструкторов осуществляли по результатам хроматографических исследований и способности к росту и утилизации нефти при температуре 4–6 °С. Для создания препаративной формы микроорганизмы-нефтедеструкторы лиофильно высушивали.

Хроматографический анализ. Для проведения хроматографического анализа из пробы экстрагировали нефть диэтиловым эфиром. После чего эфирный раствор очищали от остатков воды и высококипящей фракции путем пропускания раствора через Al_2O_3 . Полученные растворы анализировались на газовом хроматографе 6890 N (Agilent Tech., США) с масс-селективным детектором 5973 INERT (Agilent Tech., США) на капиллярной колонке HP-5MS (0,25 мм Ø × 30 м × 0,25 μм, Agilent Tech., США). Температура термостата колонки 50 °С / 2 мин., градиент температуры – 5 °С/мин. до 100 °С, 10 °С/мин. до 280 °С / 5 мин. Температура испарителя и интерфейса – 280 °С. Газ-носитель – гелий (скорость потока 1 мл/мин., деление потока 99 : 1). Развертка – от m/z 29 до m/z 500. Количество вводимой пробы – 1 мкл.

Рекультивация нефтезагрязненных территорий. Биоремедиация включала сбор нефти, агротехнические мероприятия, внесение удобрений, применение растений-фиторемедиантов, бактериального препарата на основе микроорганизмов-нефтедеструкторов, выделенных из загрязненной почвы и воды на территории Тюменской области.

Рыхление грунта осуществляли ручным мотокультиватором. Внесение удобрений (карбамид Б) проводили из расчета 150 кг/га методом дождевания, предварительно растворив их в воде. Одновременно с внесением удобрений проводили внесение растворенного в воде препарата «Биоойл-СН», представляющего собой сухой порошок, в количестве 10 г на 1 га (10–50 т воды на гектар загрязненной территории). В случае необходимости на сильно загрязненных участках рыхление, внесение удобрений и микробного препарата повторяли через 2–3 недели. Семена смеси однолетней культу-

ры – овес сорта «Антей» (200 кг/га) и многолетних трав – костер безостый, тимофеевка луговая, овсяница луговая, райграс пастбищный (20 кг/га) вносили на необводненные участки грунта спустя 2 недели после применения удобрений и препарата «Биоойл-СН».

Результаты исследования и обсуждение

Для очистки водных объектов и межбугорных понижений болот Тюменской области применялся сбор нефти с последующим внесением препарата «Биоойл-СН» и удобрений. Агротехнические мероприятия, осуществленные для грунта, включали рыхление верхних горизонтов (10–15 см), что позволяло улучшить аэрацию, разрушить смолисто-асфальтовую корку, а также внесение азотсодержащих удобрений, растворенных в воде, методом дождевания (распыления). Этот способ нанесения позволял «взмучивать» иловые и грунтовые частицы, сорбированную на них эндогенную микробиоту и способствовал перемешиванию и аэрации. Добавление биогенных элементов, входящих в состав удобрений, способствовало росту и развитию штаммов-деструкторов из вносимого препарата, аборигенных микроорганизмов и растений.

Поскольку значительная часть территорий, загрязненных нефтью, являлась грядово-мочажинными болотами, биотопы которых формировались на протяжении столетий, стояла задача сохранить сложившиеся уязвимые экосистемы. Применение тяжелой техники и глубокое фрезерование приводят к полному структурному и функциональному разрушению деятельного (торфогенного) аэрируемого слоя торфяной залежи, очень важного компонента болотных биогеоценозов. Фрезерование способствует задержке деструкции нефти из-за ее перемешивания с нижними горизонтами почвы (40–50 см), где температура становится положительной (+4 °С) только в середине августа [8; 10]. Поэтому для разрушения битумизированной корки в микроповышениях нами были применены ручные мотокультиваторы, а в межбугорных понижениях с поверхности воды был осуществлен сбор нефти, что способствовало интенсификации самовосстановления биоценозов.

Одним из решающих приемов биорекультивации загрязненных нефтью объектов является внесение биопрепарата на основе микроорганизмов-нефтедеструкторов. Известно, что для лучшей деструкции нескольких сотен различных химических соединений, входящих в состав нефти, необходимо включать в состав препарата не один штамм микроорганизмов, а ассоциацию штаммов, относящихся к разным видам и родам. Использование в препарате штаммов нескольких видов и родов, отличающихся по спектру потребляемых субстратов, сопровождается наиболее полной биодеградацией, поскольку разные виды и роды имеют приоритетные предпочтения в окислении компонентов нефти, обладают разной скоростью роста [11].

В связи с вышеизложенным авторами был разработан препарат «Биоойл-СН», который можно использовать для биологической рекультивации нефтезагрязненных земель при температуре от +4 до +35 °С. Микроорганизмы, входящие в состав препарата, были выделены из образцов воды, грунта, торфа ЯНАО и ХМАО в местах разливов нефти. Отбор микроорганизмов осуществлялся не только по принципу наилучшей нефтеутилизирующей активности, но и по способности к росту при пониженных температурах (психротрофности). Из наиболее активных штаммов создана ассоциация микроорганизмов – деструкторов нефти, где каждый штамм окислял разные компоненты нефти и поэтому в ассоциации был более эффективен, чем в чистой культуре.

В связи с тем что гены ферментов, ответственных за биодеградацию отдельных компонентов нефти, располагаются преимущественно в плазмидной ДНК бактериальных штаммов [12], мы провели первичное исследование плазмидного профиля в клетках бактерий-деструкторов. Было показано присутствие плазмид у штаммов *Pseudomonas sp.* и *Acinetobacter sp.* Суперскрученные формы плазмид имели электрофоретическую активность, соответствующую длинам фрагментов ДНК от 1 500 до 6 000 п. н. (рис. 1).

Хроматографические исследования показали убыль предельных и ароматических углеводородов в питательной среде, содержащей нефть, после культивирования с отдельными штаммами микроорганизмов и ассоциации. Например, входящий в состав

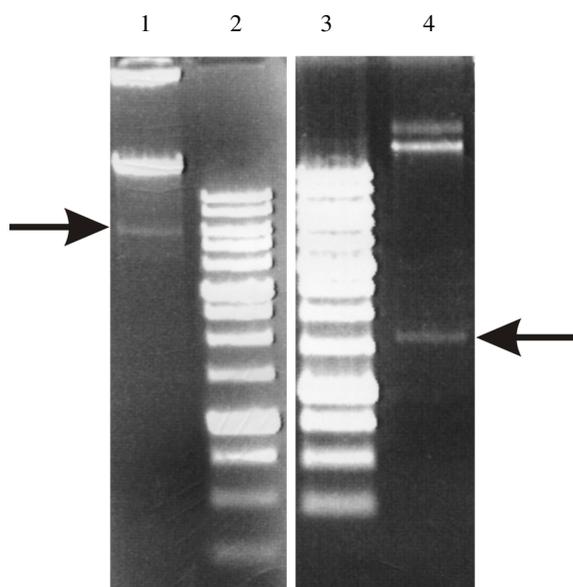


Рис. 1. Электрофореграммы плазмидного профиля бактерий-деструкторов. Дорожки: 1 – *Pseudomonas sp.*; 2, 3 – маркеры 1 kb; 4 – штамм *Acinetobacter sp.* Стрелками указаны полосы, соответствующие плазмидной ДНК

препарата психротрофный бактериальный штамм *Bacillus sp.* отличался способностью к утилизации предельных линейных и разветвленных углеводов при температуре +10 °C (рис. 2).

Отмечена высокая степень утилизации штаммом *Bacillus sp.* углеводов с большим числом атомов углерода: докозана, трикозана, тетракозана, пентакозана и др.

Одним из перспективных направлений доочистки загрязненных земель от нефтепродуктов является фиторемедиация. В качестве растения-фиторемедианта в первый год рекультивации был использован овес. Несмотря на то, что овес за летний период в условиях севера не способен дать семена, он может произрастать на загрязненных нефтью почвах, и его корневая система способствует образованию почвенных пор, благодаря которым усиливается доступ кислорода в нижележащие слои грунта. Корни овса способствуют развитию ризосферной микробиоты, синтезируют ферменты, активизирующие рост микроорганизмов и разрушение компонентов нефти. По наблюдениям,

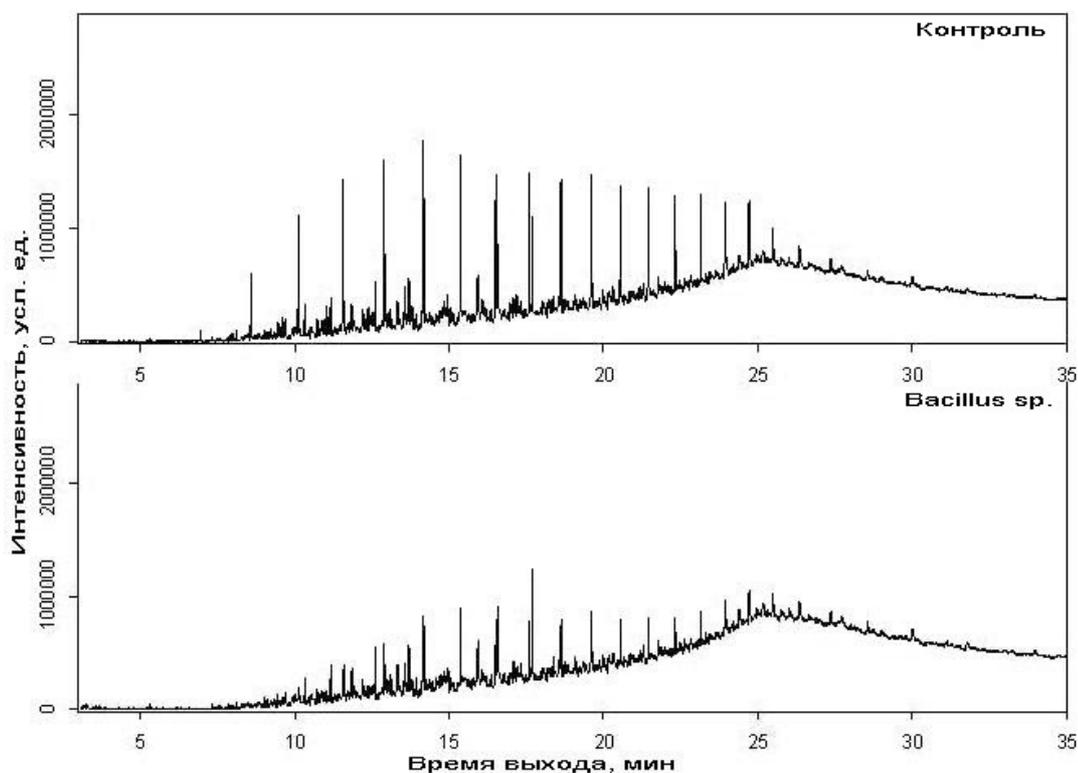


Рис. 2. Газовая хроматограмма раствора нефти в диэтиловом эфире без добавления деструкторов (контроль) и после биодеструкции бактериальным штаммом *Bacillus sp.* в течение 10 сут. инкубирования при температуре 10 °C

сделанным в течение 2004–2009 гг., обильная наземная биомасса овса задерживает гумусосодержащие почвенные частицы, семена аборигенных растений, прорастающих в следующем сезоне на подготовленной овсом почве. Мониторинг участков, на которых была проведена фиторекультивация с применением овса, показал стабильное увеличение проективного покрытия и последующее зарастание фоновой растительностью.

Внесение семян многолетних трав в первый или во второй год рекультивации также преследовало цель – создать благоприятный воздушный режим в почве, снабдить почву органическим веществом за счет отмирающих клеток корней и выделения различных биоактивных веществ (факторов роста, ферментов), которые могут непосредственно разрушать загрязнитель или способствовать росту ризосферных микроорганизмов-деструкторов.

По результатам практического применения биопрепарата в составе комплексной биоремедиации на больших площадях загрязненных земель, следует отметить факт существенного снижения токсичной фракции нефти в течение 2–4 недель до уровня, позволяющего успешно произрастать посеянными травам [13]. Хроматографический анализ образцов, отобранных до и после биоремедиации нефтезагрязненных участков, показал снижение количества нефтепродуктов от 10 до 70 % от исходного содержания.

Территории, подлежащие биорекультивации, располагались преимущественно на участках труднодоступных верховых болот, в пойменных участках рек Пуровского и Надымского районов Ямало-Ненецкого автономного округа (ЯНАО), Сургутского района ХМАО и различались по степени загрязнения и уровню обводненности. Ликвидация разливов нефти осуществлялась также на техногенных песчаных отсыпках. Очищению подлежали грунты с давностью загрязнения от одного месяца до полутора лет на территории деятельности ОАО «Газпромнефть – Ноябрьскнефтегаз».

На экспериментальном участке месторождения «Западно-Ноябрьское», где уровень начального содержания нефтепродуктов был 80,73 %, произошло снижение уровня

до 45,13 %; на экспериментальном участке месторождения «Крайнее» – с 64,15 до 12,07 %; на экспериментальном участке месторождения «Пограничное» – с 49,5 до 9,01 %. На экспериментальном участке месторождения Холмогорское в результате биоремедиации произошло снижение концентрации нефтепродуктов с 44,15 до 4,11 % с последующим зарастанием грунта растительным покровом и достижением 100 %-го проективного покрытия. Биоремедиация участка Спорышевского месторождения позволила снизить концентрацию нефтепродуктов с 34,27 до 5,69 % с последующим достижением проективного покрытия растениями на 80 %.

На рис. 3 представлен экспериментальный участок на территории деятельности ОАО «Газпромнефть – Нефтегаз», где была проведена рекультивация с применением разработанной авторами комплексной технологии.

После проведения активных работ по биоремедиации объектов, загрязненных нефтью, на месторождениях Пограничное, Холмогорское, Спорышевское, Западно-Ноябрьское, Вынгапуровское, Вынгайхинское, Муравленковское, Суторминское, Сугмутское, Западно-Суторминское, Крайнее (территория деятельности ОАО «Газпромнефть – Ноябрьскнефтегаз»), Западно-Крапивинское (территория деятельности ООО «Газпромнефть – Восток») наблюдались увеличение флористического проективного покрытия и начальные этапы восстановления исходного фитообразия. Наземная фитомасса растений при этом не отличалась от фитомассы растений на контрольных незагрязненных участках.

На основании пятилетних наблюдений (2004–2009 гг.) в загрязненных нефтью биоценозах верховых болот сукцессионные изменения заключаются в исчезновении уязвимого мохово-лишайникового горизонта фитоценоза, а после испарения легких фракций нефти – появлении в качестве пионерных видов пушицы, осоки, ситника, хвоща, рогоза как наиболее устойчивых к нефти растений.

Заключение

Основное достоинство предлагаемой методики состоит в том, что не разрушается



Рис. 3. Загрязненный нефтью участок до (а) и после (б) биоремедиации. Фотография с месторождения «Пограничное» ОАО Газпромнефть – Ноябрьскнефтегаз, Сургутский район Ханты-Мансийского автономного округа. Фотографии участка сделаны 20 июня 2008 г. (а) и 17 августа 2008 г. (б)

торфогенный слой, не требуется применения специальной техники, практически не оказывает отрицательного влияния на сложившиеся биогеоценозы. В процессе биоремедиации происходит кратковременное повышение биогенности грунта за счет внесенных удобрений и микроорганизмов, что способствует в дальнейшем активизации природных резервов экосистемы – увеличению численности аборигенной микробиоты и росту растений. Внесение удобрений, на наш взгляд, является оправданным, поскольку основная их часть сразу же расходуется для роста биомассы привнесенных микроорганизмов и растений и не оказывает негативного воздействия на биоценоз, а только способствует происходящим сукцессионным изменениям, направленным на восстановление.

Всего на территории севера Сибири было очищено более 500 га. Из-за неблагоприятного температурного фактора и короткого репродуктивного периода биодеструкторов и фиторемедиантов некоторые сильно загрязненные нефтью участки (содержание нефтепродуктов более 70 %) подлежали обработке в последующие 2–3 сезона.

Список литературы

1. Соромотин А. В. Нефтяное загрязнение земель в зоне средней тайги Западной Сибири // Экология и промышленность России. 2004. № 8. С. 8–11.
2. Соромотин А. В. Экологические проблемы нефтегазодобычи в Западной Сибири // Вестн. ТюмГУ. 2005. № 3. С. 137–145.
3. Чижов Б. Е., Долингер В. А., Захаров И. А. Особенности нефтяного загрязнения территории Ханты-Мансийского автономного округа // Вестн. экологии, лесоведения и ландшафтоведения. 2008. № 8. С. 15–21.
4. Калюжин В. А. Биодegradация нефти // Исследования эколого-географических проблем природопользования для обеспечения территориальной организации и устойчивости развития нефтегазовых регионов

России: теория, методы и практика. Нижневартовск, 2000. С. 229–230.

5. Куреева Н. А., Водопьянов В. В., Новоселова Е. И., Онегова Т. С., Жданова Н. В. Микробиологическая рекультивация нефтезагрязненных почв. М., 2001. 40 с.

6. Захарова К. А., Мусеев В. В., Шулаев М. В., Емельянов В. М. Исследование деструкции нефтезагрязнений в подзолистых и торфяных почвах Западно-Сибирского региона // Экология человека. 2007. № 11. С. 17–22.

7. Вершинин Ю. А., Вершинин М. Ю. Экологическая оценка технологий рекультивации загрязненных нефтью олиготрофных болот // Проблемы региональной экологии. 2006. № 3. С. 36–40.

8. Мурыгина В. П., Калюжный С. В. Биоремедиация загрязненных углеводородами территорий в северных регионах России // Мир нефтепродуктов. 2008. № 4. С. 30–36.

9. *Определитель* бактерий Берджи: В 2 т. М.: Мир, 1997.

10. Зубайдуллин А. А. Рекультивация нефтезагрязненных земель в Среднем Приобье: недостатки и основные причины низкой эффективности // Биологические ресурсы и природопользование: Сб. науч. тр. Сургут, 2003. Вып. 2. С. 129–139.

11. Андреева И. С., Емельянова Е. К., Загребельный С. Н., Олькин С. Е., Резникова И. К., Репин В. Е. Психротолерантные штаммы нефтедеструкторы для биоремедиации почв и водной среды // Биотехнология. 2006. № 1. С. 43–52.

12. Ono A., Miyazaki R., Sota M., Ohtsubo Y., Nagata Y., Tsuda M. Isolation and characterization of naphthalene-catabolic genes and plasmids from oil-contaminated soil by using two cultivation-independent approaches // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. Vol. 74. P. 501–510.

13. Алексеев А. Ю., Забелин В. А., Куц С. А., Пушкарев Н. С. Практика биологической рекультивации // Нефтяное хозяйство. 2006. № 10. С. 12–13.

Материал поступил в редколлегию 30.04.2010

E. K. Emeljanova, A. Yu. Alekseev, A. V. Mokeeva, M. V. Tarasova, M. A. Shestopalov,
E. V. Karpova, V. A. Zabelin, A. M. Shestopalov, T. N. Iljicheva

BIOREMEDIATION OF OIL POLLUTION OBJECTS IN THE TYUMEN REGION

We have developed a method effective in circumstances of north regions. It was worked out for complex bioremediation of swamp landscapes contaminated with petroleum in Tyumen region. The main procedures of bioremediation program are agrotechnical measures, application of fertilizers and bacterial preparation «Biooil-CH» by sprinkling irrigation.

Keywords: remediation, bioremediation, oil pollution, microorganism-destroyer.