

УДК 631.86:631.61

## МИКРОБНАЯ РЕМЕДИАЦИЯ ТЕХНОГЕННЫХ ПОВЕРХНОСТНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ КЕРЖЕНЕЦКОЙ НЕФТЕБАЗЫ

<sup>2</sup>Баландина А.В., <sup>1</sup>Еремченко О.З., <sup>2</sup>Одегова Т.Ф., <sup>2</sup>Кузнецов Д.Б.

<sup>1</sup>Пермский государственный университет, Пермь, e-mail: eremch@psu.ru;

<sup>2</sup>Пермская государственная фармацевтическая академия, Пермь, e-mail: balandinaa1@mail.ru

Существующие эколого-законодательные условия диктуют использования других, отличных от ранее использовавшихся методов восстановления почв, подвергшихся антропогенному загрязнению нефтью. Множество работ сосредоточены на исследовании применимости различных штаммов, биопрепаратов и иных биологических средств в методах рекультивации. В работе представлены результаты исследований восстановления почв, загрязненных нефтью, на территории Керженецкой нефтебазы. Результаты научных наблюдений показали, что процесс биоремедиации осуществляется благодаря активизации микробиоты путем фрезерования поверхностных слоев почв, а также применения комплекса биопрепаратов «Альбит», «Байкал ЭМ1» и минеральных удобрений. Установлено, что в биологической рекультивации принимают активное участие бактерии родов *Rhodococcus*, *Clotridium*, *Pseudomonas*, микромицеты *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Synchylium*. В процессе биоремедиации уровень активности ферментов инвертазы, дегидрогеназы и каталазы превысил фоновую величину; интенсивность денитрификации не уступила фоновым показателям, однако был подавлен процесс азотфиксации.

**Ключевые слова:** биоремедиация, загрязнения нефтью, биопрепараты

## MICROBIAL REMEDIATION OF TECHNOGENIC SURFACE FORMATIONS KERZHENETSKOY OIL BASE

<sup>2</sup>Balandina A.V., <sup>1</sup>Eremchenko O.Z., <sup>2</sup>Odegova T.F., <sup>2</sup>Kuznecov D.B.

<sup>1</sup>Perm of state University, Perm, e-mail: eremch@psu.ru;

<sup>2</sup>Perm of state pharmaceutical academia, Perm, e-mail: balandinaa1@mail.ru

Existing environmental and legislative conditions dictate the use of other than the previously used methods for remediation of soils affected by anthropogenic pollution by oil. A lot of work focused on the study of the applicability of various strains of biological products and other biological resources in remediation techniques. The paper presents the results of studies remediation of soils contaminated with oil in the tank farm Kerzhenetskoj. The results of scientific observations have shown that the process of bioremediation is due to activation of the microbiota by milling the surface layers of soil, and the use of complex biologics «album», «Baikal EM1» and mineral fertilizers. Found that in bioremediation are active bacteria of the genera *Rhodococcus*, *Clotridium*, *Pseudomonas*, fungi are *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Synchylium*. In the process of bioremediation level of enzyme activity of invertase, dehydrogenase and catalase exceeded the value of the background, the intensity of denitrification background values are not lost, but was silenced by the process of nitrogen fixation.

**Keywords:** bioremediation, oil pollution, biological preparations

Нефтяная промышленность является одной из отраслей, которая загрязняет окружающую среду, нанося ущерб биосфере. Отдельные территории вследствие разливов нефти приближаются по состоянию к районам экологического бедствия. Создается угроза устойчивой, часто необратимой, трансформации всех компонентов природной среды, что приводит к нарушению нормального функционирования природных экосистем и ухудшению условий жизни растений, животных, человека [1, 3]. Ранние работы авторов показали эффективность использования биологической рекультивации нефтезагрязненных почв с использованием штаммовых культур грибов-сапрофитов [2]. В настоящем исследовании показано, что возможно осуществлять рекультивацию комплексом биопрепаратов «Альбит», «Байкал ЭМ1» и минерального удобрения.

### Материалы, методы и объекты рекультивации

Территория нефтебазы приурочена к надпойменной террасе правого берега р. Волги. Преобладающий рельеф террасы плоский и плоско-холмистый. Поверхность изрезана озерами и торфяными болотами, чередующимися с песчаными гривами, направленными параллельно руслу р. Волги. Для исследуемого участка характерно высокое залегание уровня грунтовых вод, вызывающих подтопление территории нефтебазы во влажные периоды года. Естественная растительность частично сведена при планировочных работах вокруг цистерн хранения нефтепродуктов. Оставшаяся растительность угнетена, разрежена и представлена участками злаково-разнотравных сообществ, а также кустарниками, редкими деревьями (клен, тополь, береза, ива). В соответствии с требованиями техники безопасности большая часть древесных пород на участках, непосредственно примыкающих к резервуарам хранения, была ликвидирована.

В 2002 г. на территории нефтебазы произошла утечка нефтепродукта из резервуара, что резко ухудшило экологическую обстановку на объекте.

Работы на Керженецкой нефтебазе начались в июне 2003 г., территорию базы покрывали техногенные поверхностные образования (ТПО), представляющие собой слоистые грунты разного гранулометрического состава с участками перемешанного почвенного материала, неравномерно пропитанные свежей и остаточной нефтью.

На весь загрязненный нефтью участок внесли минеральные удобрения – диамонийфосфат в дозе 40 кг/га. ТПО рыхлили 2 раза в месяц с целью увеличения доступа кислорода и ускорения процесса биодegradации нефтяных углеводородов. Затем для ускорения разложения нефтепродуктов внесли на почву биопрепараты «Альбит» + «Байкал ЭМ1» из расчета 200 л/га в соотношении 1:1, что обеспечивало содер-

жание интродуцированных бактерий (*Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Azotobakter* и т.д.) в почве на уровне не менее  $10^6$  клеток/г почвы.

Посев трав проводили в середине лета. Семена трав предварительно в течение нескольких часов замачивали в биопреparate «Альбит». Всходы трав появились через 15 дней после посева. Через 25 дней растения покрыли всю поверхность площади, подвергнутой рекультивации.

Образцы почвогрунта были отобраны из слоя 0–10 и 10–20 см из шести участков загрязненной территории для исследования агрохимических показателей (рис. 1) и десяти участков – для микробиологических показателей; для сравнения взяты образцы с незагрязненной (фоновой) территории.

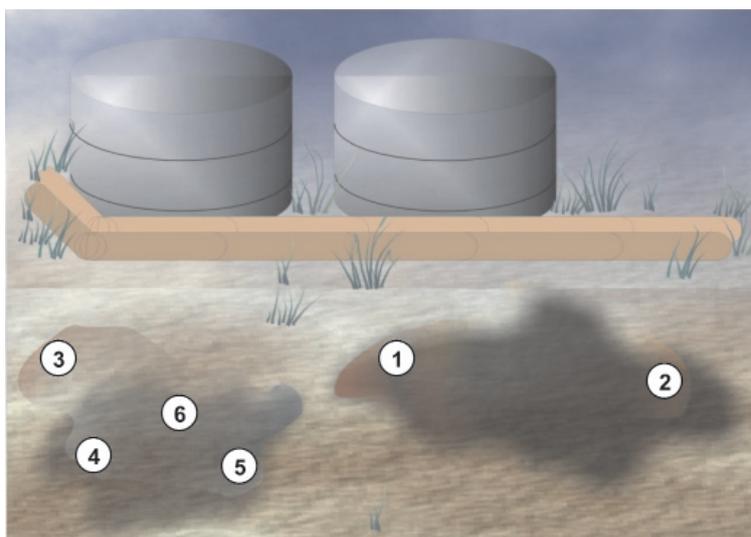


Рис. 1. Схема разлива нефти и точек отбора (1, 2, 3, 4, 5, 6) почвенных проб на территории Керженецкой нефтебазы

### Результаты исследования и их обсуждение

#### Изменение агрохимических показателей состояния ТПО

Агрохимические показатели состояния ТПО оценивались до начала рекультивации и спустя месяц в шести точках отбора на территории Керженецкой нефтебазы.

Перед началом рекультивации ТПО имели нейтральную реакцию среды, содержание углеводов колебалось от 2 до 15%, органического углерода – от 3 до 16% (табл. 2), изменчивость данных показателей обусловлена неравномерным загрязнением ТПО нефтью.

В значительной степени варьировалось и количество нитратов. Количество подвижных фосфатов и калия в ТПО было низким и в меньшей степени изменялось по точкам отбора.

Спустя месяц с начала процесса рекультивации отмечено заметное изменение агрохимических свойств ТПО (табл. 3),

обоснованное статистическими критериями достоверности (табл. 1). Отмечено подкисление ТПО, но реакция среды остается в пределах нейтральных значений. Заметно снизилось содержание органического углерода и особенно углеводов (в среднем в 5 раз ниже). Благодаря удобрениям и биопрепаратам возросло содержание подвижных соединений азота, фосфора и калия.

#### Изменение микробиологических показателей состояния ТПО

До рекультивации в поверхностных слоях нефтезагрязненных ТПО редко обнаруживались микроорганизмы родов *Aspersillus*, *Mucor* и *Phytophthora*; не во всех пробах присутствовали *Erwinia*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Synchytsium*. Чаще и обильнее остальных представлены в ТПО бактерии *Clotridium* и *Pseudomonas*, их количество находилось в пределах десятков – сотен КОЕ/г почвы (табл. 4).

Таблица 1

Показатели агрохимического состояния ТПО до ремедиации (08.06.2004 г.)

Показатели	Повторность	Диапазон изменений		Среднее	Ошибка	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации, %
pH	6	7,02	7,73	7,35	0,11	0,27	3,7
C, %	6	3,4	16,04	8,96	2,17	5,31	59,3
У.В., %	6	2,4	15,2	7,6	2,02	4,95	65,1
N-NO <sub>3</sub> мг/100 г	6	4,77	16,61	7,99	1,77	4,33	54,1
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , мг/100 г	6	5,58	9,86	7,58	0,59	1,44	19,0
K <sub>2</sub> O, мг/100 г	6	3,04	7,00	5,11	0,60	1,47	28,7

Таблица 2

Показатели агрохимического состояния ТПО в процессе ремедиации (26.08.2004 г.)

Показатели	Повторность	Диапазон изменений		Среднее	Ошибка	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации, %
pH	6	6,9	7,1	6,98	0,03	0,08	1,2
C, %	6	3,59	6,04	5,16	0,36	0,89	17,2
У.В., %	6	0	2,48	1,39	0,33	0,81	58,3
N-NO <sub>3</sub> мг/100 г	6	10	18,14	14,63	1,29	3,15	21,5
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , мг/100 г	6	8,94	16,6	11,75	1,33	3,24	27,6
K <sub>2</sub> O, мг/100 г	6	5,92	14,39	9,11	1,43	3,51	38,6

Таблица 3

Средние значения показателей состояния ТПО и достоверность их различий до и спустя месяц после начала ремедиации

Показатели	Среднее до ремедиации	Среднее в процессе ремедиации	Критерий Фишера	Уровень значимости нулевой гипотезы
pH	7,35	6,98	9,85	0
C орг, %	8,96	5,16	2,99	0,013
У.В., %	7,6	1,39	9,12	0
N-NO <sub>3</sub> мг/100г	7,99	14,63	9,23	0
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , мг/100	7,58	11,75	8,24	0
K <sub>2</sub> O, мг/100г	5,11	9,11	6,62	0,001

После проведения мероприятий по рекультивации ТПО микробное сообщество изменилось качественно и количественно [4]. В нем присутствовали 1000...100000 КОЕ/г почвы бактерий родов *Rhodococcus*, *Clotridium*, *Pseudomonas*, 1000...10000 *Bacillus*, 10...1000 грибов *Pythium*, *Fusarium*, *Synchytsium*, *Erwinia*, *Rhizoctonia*, в том числе, ранее не обнаруженные *Aspersillus*, *Mucor*, *Phytophthora* (табл. 4). По-видимому, микроорганизмы были внесены с препаратом «Байкал ЭМ1», активизированы питательными и биохимически активными веществами препаратов и удобрений. В благоприятных условиях активно размножалась аборигенная микробиота. Благодаря углеводородокисляющим бактериям и грибам количество нефти в ТПО за месяц снизилось в среднем в 5 раз.

К анализу микробного сообщества ТПО до начала рекультивации и спустя один месяц применили ранее использованный метод оптимизации [2]. Для углеводородокисляющих микроорганизмов *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Clotridium*, *Pseudomonas*, *Aspersillus*, *Pythium*, *Synchytsium* использовали при расчете нормированных показателей в качестве экстремума максимальные значения. Для групп с представителями фитопатогенных видов (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Erwinia*, *Mucor*, *Phytophthora*) были применены минимальные (но отличные от нуля) экстремумы. Нормированные показатели и критерии оптимизации рассчитаны для каждой пробы ТПО в оба срока наблюдений (табл. 5). Критерии оптимизации поверхностных слоев нефтезагрязненных ТПО до рекультивации колебались в пределах

0–5,5. После проведения рекультивационных мероприятий ТПО границы колебаний критериев оптимизации составили 3–12, при этом критерий ниже 5 единиц имели 5 проб из 20 (25%). По отдельным точкам отбора критерий оптимизации микробного сообщества ТПО увеличился в десятки раз.

Таким образом, можно утверждать, что сообщество микроорганизмов благодаря рекультивационным мероприятиям оптимизировано на количественном и качественном уровне, как и экологическое состояние ТПО в целом, включая агрохимические показатели и количество остаточной нефти.

**Таблица 4**

Количество микроорганизмов в ТПО нефтебазы до начала и в процессе ремедиации

Показатель	Erwinia	Bacillina	Rhodococcus	Clotridium	Pseudomonas	Aspergillus	Mucor	Phytophthora	Pythium	Fusarium	Rhizoctonia	Synchytrium
До ремедиации												
Количество проб	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Среднее	0	10	10	10	10	0	0	0	0	0	10	10
Доверительный интервал: –0,95%	0	0	0	10	10	0	0	0	0	0	0	0
Доверительный интервал: 0,95%	10	10	10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	0	0	0	10	10	10	10
В процессе ремедиации												
Количество проб	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Среднее	10	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	10	10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>
Доверительный интервал: –0,95%	10	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10	10	10	10	10	10	10
Доверительный интервал: 0,95%	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>

**Таблица 5**

Нормированные критерии оптимизации количества микроорганизмов в ТПО нефтебазы Керженец

Номера проб	Глубина, см	Критерий оптимизации до ремедиации	Критерий оптимизации в процессе ремедиации	Разность критериев оптимизации
1	0–12	0,25	5,89	5,39
	12–24	1,17	7,46	5,13
2	0–12	1,25	5,62	3,12
	12–24	1,08	5,58	3,41
3	0–12	2,25	8,00	3,50
	12–24	2,16	7,48	3,15
4	0–12	5,5	12,07	1,07
	12–24	3,08	9,65	3,48
5	0–12	0,25	6,10	5,60
	12–24	1,00	6,80	4,80
6	0–12	0,92	5,14	3,30
	12–24	0,83	5,96	4,29
7	0–12	2,58	8,38	3,21
	12–24	3,83	10,25	2,58
8	0–12	0,33	3,23	2,56
	12–24	0,25	4,36	3,86
9	0–12	2,17	6,06	1,73
	12–24	1,00	5,56	3,56
10	0–12	0	5,41	5,41
	12–24	0	5,44	5,44

### Ферментативная активность ТПО

Для характеристики биохимической активности ТПО были исследованы показатели активности почвенных ферментов, относящихся к группам оксидоредуктаз (каталазная и дегидрогеназная активность) и гидролаз (инвертазная активность почв).

После рекультивации ТПО активность каталазы повышена относительно фонового уровня (рис. 2, а). Активность инвертазы и особенно дегидрогеназы выше активности этих ферментов в фоновых ТПО (рис. 3, б). Известно, что основными по-

ставщиками ферментов в почвы служат микроорганизмы, в меньшей мере растения. По-видимому, благодаря проведению мероприятий по рекультивации ТПО усилилась выработка некоторых экзоферментов почвенной микробиотой.

Образцы нефтезагрязненных ТПО характеризовались меньшей скоростью азотфиксации, чем образец фоновой ТПО (рис. 3, а), что соответствует литературным данным о снижении азотфиксации в нефтезагрязненных почвах [5]. Скорость денитрификации почти не отличается от фона (рис. 3, б).

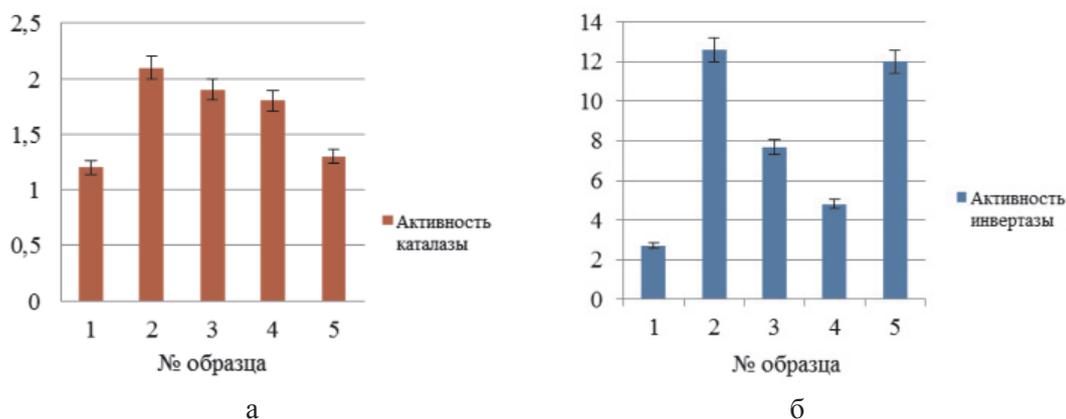


Рис. 2. а – активность каталазы, см<sup>3</sup> 0,1 KMnO<sub>4</sub>/г, мин:

1 – проба фоновой ТПО; 2, 3, 4, 5 – пробы ТПО в процессе рекультивации; б – активность инвертазы, мг глюкозы/г, 24 ч: 1 – проба фоновой ТПО; 2, 3, 4, 5 – пробы в процессе рекультивации

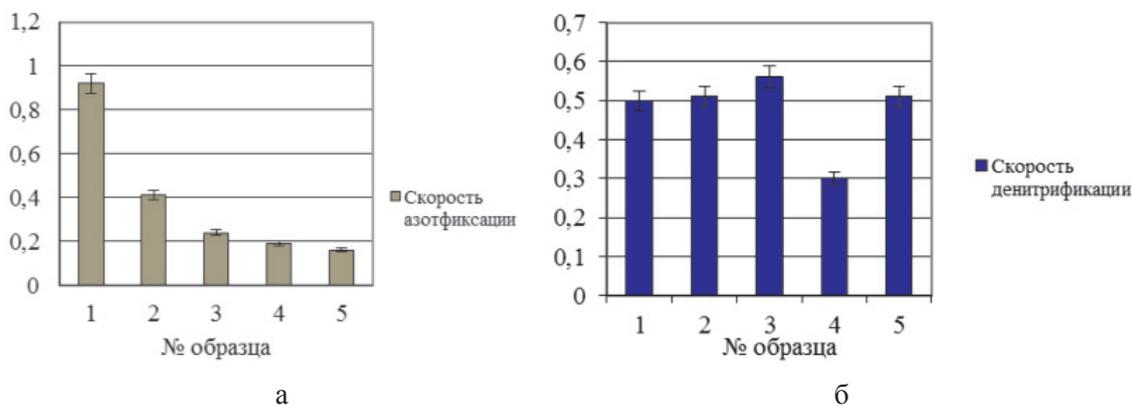


Рис. 3. а – скорость азотфиксации, нмоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/г, 24 ч: 1 – проба фоновой ТПО; 2, 3, 4, 5 – пробы ТПО в процессе рекультивации; б – скорость денитрификации, мкмоль N<sub>2</sub>O/г, 24 ч: 1 – проба фоновой почвы; 2, 3, 4, 5 – пробы после рекультивации

Поверхностные слои ТПО более однородны по каталазной активности и скорости денитрификации; выше изменчивость ТПО по активности инвертазы, дегидрогеназы и скорости азотфиксации.

Таким образом, в нефтезагрязненном ТПО, спустя один месяц после начала рекультивации, по сравнению с фоновым ТПО повышена активность каталазы, инвертазы

и особенно дегидрогеназы, что отражает развивающиеся процессы микробной рекультивации, направленные на деструкцию нефти. Активность азотфиксации в ТПО понижена, что характерно для нефтезагрязненных почв по сравнению с контролем. Процессы денитрификации не отличаются в целом от фонового уровня, что свидетельствует об аэробной обстановке,

не благоприятствующей восстановлению азота и его потере в форме газообразных соединений.

### Выводы

1. Процесс рекультивации нефтезагрязненных ТПО развивался благодаря активизации микробиоты путем рыхления поверхностных слоев, применения биопрепаратов «Альбит», «Байкал ЭМ1» и минерального удобрения. В ТПО повысилось содержание подвижных форм фосфора и калия и в несколько раз уменьшилось количество нефти.

2. В микробной ремедиации ТПО принимали активное участие бактерии (*Rhodococcus*, *Clotridium*, *Pseudomonas*) и микромицеты (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Synchylium*), количество которых увеличилось на несколько порядков в течение месяца на фоне рыхления, применения препаратов «Альбит», «Байкал ЭМ1» и минеральных удобрений. В соответствии с нормированным коэффициентом оптимизации экологическое состояние поверхностных слоев ТПО менее чем за два месяца улучшилось в несколько раз, что позволило сформировать покров из сеянных толерантных трав.

3. В процессе микробной рекультивации нефтезагрязненных ТПО уровень активности ферментов инвертазы, дегидрогеназы и каталазы превысил фоновую величину; интенсивность денитрификации не уступила фоновым показателям, однако был подавлен процесс азотфиксации.

### Список литературы

1. Баландина А.В., Кузнецов Д.Б. Остаточные нефтепродукты в дерново-карбонатных почвах после рекультивации и самоочищения // Успехи современного естествознания. – 2013. – № 7. – С. 95–100.

2. Применение штаммовых культур грибов-сапрофитов в методике рекультивации почв, загрязненных нефтью / А.В. Баландина, Т.Ф. Одегова, А.В. Казаков, Д.Б. Кузнецов // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 6 (часть 3). – С. 668–672.

3. Еремченко О.З., Филькин Т.Г., Шестаков И.Е. Редкие и исчезающие почвы Пермского края. – Пермь, 2010.

4. Естеровская Л.В., Шелнова Л.Д. Изменение свойств почв в связи с загрязнением при разведке и добыче нефти и газа // Агрохимия и почвоведение. – 1975. – Вып. 29. – С. 3–7.

5. Исмаилов Н.М. Микробиология и ферментативная активность нефтезагрязненных почв // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. – М.: Наука, 1988. – С. 42–57.

### References

1. Balandina A.V., Kuznecov D.B. Ostatechnye nefteprodukty v dernovo-karbonatnyh pochvah posle rekul'tivacii i samoochishhenija // Uspehisovremennogoestestvoznaniya. no. 7, 2013, pp. 95–100

2. Balandina A.V., Odegova T.F., Kazakov A.V., Kuznecov D.B. Primenenie shtammovyh kul'tur gribov-saprofitov v metodike rekul'tivacii pochv, zagrijaznennyh nef'tju // Fundamental'nyeissledovaniya. 2013. no. 6 (chast' 3). pp. 668–672.

3. Eremchenko O.Z., Fil'kin T.G., Shestakov I.E. Redkie i ischezajushhie pochvy Permskogo kraja, Perm' 2010.

4. Esterovskaja L.V., Shelnova L.D. Izmenenie svojstv pochv v svjazi s zagrijazneniem pri razvedke i dobyche nef'tiigaza // Agrohimiijapochvovedenie. 1975, vyp. 29. pp. 3–7.

5. Ismailov N.M. Mikrobiologijai fermentativnaja aktivnost' neftezagrijaznennyh pochv // Vosstanovlenie neftezagrijaznennyh pochvennyh jekosistem. M.: Nauka, 1988. pp. 42–57.

### Рецензенты:

Глушков В.А., д.х.н., доцент, ФГБУН «Институт технической химии» УрО РАН, г. Пермь;

Леснов А.Е., д.х.н., профессор кафедры экологии Пермской государственной сельскохозяйственной академии имени академика Д.Н. Прянишникова, г. Пермь.

Работа поступила в редакцию 07.08.2013.