

Рогозина Е.А., Свечина Р.М., Шапиро А.И., Переходова Л.С., Тимергазина И.Ф.
Федеральное государственное унитарное предприятие «Всероссийский нефтяной научно-исследовательский геологоразведочный институт» (ФГУП «ВНИГРИ»), Санкт-Петербург, Россия, ins@vnigri.ru

МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ УТИЛИЗАЦИИ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ ШТАММАМИ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Рассматривается разработанный во ФГУП «ВНИГРИ» комплекс постановки лабораторных опытов по исследованию активности утилизации нефтяного загрязнителя штаммами углеводородокисляющих микроорганизмов. Особое внимание уделено детальному химико-битуминологическому анализу исходных и биоокисленных образцов, позволяющему проследить на балансовой основе утилизацию нефтяного загрязнителя в целом и конкретных входящих в его состав фракций (масла, нейтральные и кислые смолы, асфальтены, насыщенные и ароматические углеводороды). Применение комплексного химико-битуминологического анализа в отечественной практике очистных работ позволит более объективно судить об эффективности биопрепаратов по утилизации нефтяного загрязнения почв.

Ключевые слова: нефть, нефтяное загрязнение, углеводороды, нефтепродукты, штаммы углеводородокисляющих микроорганизмов, активность, биоокисление, химико-битуминологический анализ.

В последнее десятилетие в отечественной практике нефтеочистных работ широкое применение нашли технологии с использованием биопрепаратов, основу которых составляют углеводородокисляющие микроорганизмы. Из всех существующих технологий очистки нефтезагрязненных почв [Матвеев, 1995] использование биотехнологии признано как наиболее экономичное и экологически чистое. Для очистки и рекультивации нефтезагрязненных земель разработано достаточно много биопрепаратов, отличающихся по роду, виду, титру используемых углеводородокисляющих микроорганизмов, форме выпуска, технологии применения и эффективности очистки.

Проведенная сравнительная характеристика предлагаемых и применяемых на практике биопрепаратов [Акопова, 2008; Воденова, Хабарова, Донерьян, 2010; Рогозина, Андреева, Жаркова, Мартынова, Орлова, 2010] показывает, насколько широк диапазон изменения основных характеристик препаратов, технологий их использования и эффективности утилизации нефтяного загрязнения почв.

Эффективность утилизации нефтяного загрязнения является важнейшей характеристикой используемых биопрепаратов и представляет собой в процентном

отношении снижение по сравнению с исходным содержания нефти или нефтепродуктов (керосин, дизельное топливо, мазут) в очищенной почве.

На сегодняшний день нет общепринятой унифицированной методики определения эффективности биопрепаратов. В практике очистных работ используют различные методы определения содержания нефтяного загрязнителя в почве – гравиметрический, по оценке продуктивности сельскохозяйственных растений, ИКС, ЯМР 1Н, ГЖХ, хроматомасс-спектрометрии [Алехин и др., 1999; Технология очистки..., 2002; Киреева, Григориади, Хайбуллина, 2009; Киреева, 2010; Ивасишин и др., 2011]. Чаще всего используется рекомендованный метод определения содержания «нефтепродуктов» [ГОСТ 17.1.4.01-80; РД 52.18.575-96, 1999]. Под нефтепродуктами в данном случае понимается сумма малополярных углеводородов (алифатических, ароматических, алициклических), содержащихся в нефтяном загрязнителе. Вполне очевидно, что в разных типах нефтяного загрязнения содержание фракции «нефтепродуктов» различно. Отсюда следует, что определение эффективности утилизации нефтяного загрязнения данным методом является величиной относительной, характеризующей снижение только фракции нефтепродуктов, а не нефтяного загрязнения в целом. Этот вопрос имеет принципиальное значение, поскольку при рекламировании высокой эффективности биопрепарата значительная часть нефтяного загрязнения остается неучтенной.

Основой биопрепаратов, как отмечалось выше, являются углеводородокисляющие микроорганизмы, использующие нефть и нефтепродукты в качестве единственного источника углерода. В связи с этим поиск новых природных непатогенных активных штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов является значимой проблемой для практики нефтеочистных работ, не теряющей свою новизну и актуальность. Подтверждением этому служат многочисленные опубликованные и запатентованные результаты отечественных и зарубежных исследований по этой проблеме.

Выделяемые из природных объектов углеводородокисляющие микроорганизмы проходят тест на активность биоокисления индивидуальных классов нефтяных углеводородов или нефтяного загрязнителя в целом. Активность биоокисления (утилизации) нефтяных углеводородов отдельными штаммами или ассоциациями углеводородокисляющих микроорганизмов выражается отношением окисленного в течение определенного временного интервала количества нефтяного загрязнителя к начальному в процентном отношении.

В данном случае, как и при определении эффективности биопрепаратов, принципиальное значение имеет методика определения этой характеристики. При этих исследованиях используются перечисленные выше, за исключением оценки продуктивности сельскохозяйственных растений, методы. В некоторых работах практикуется наблюдение за динамикой роста микроорганизмов или за исчезновением в опытах нефтяной (углеводородной) пленки.

ФГУП «ВНИГРИ» располагает большим опытом проведения научно-экспериментальных исследований по проблемам преобразования нефтей микроорганизмами [Преобразование нефтей..., 1970] и создания биопрепаратов для очистки почв от нефтяного загрязнения [Рогозина и др., 1995; Рогозина, Калимуллина, 2009; Рогозина, 2006, 2009]. При этих исследованиях применяемая методика анализов позволяет определить степень биоокисления нефтей и нефтяного загрязнения в целом и конкретных фракций, входящих в их состав. Комплекс конкретных детальных химико-аналитических методов исследования изложен в соответствующих руководствах [Руководство по анализу нефтей..., 1966; Руководство по анализу битумов..., 1966].

По разработанной программе исследования активности утилизации нефтей и нефтепродуктов штаммами углеводородокисляющих микроорганизмов, как основы для создания биопрепаратов, включают три этапа проведения лабораторно-экспериментальных работ:

- постановку микробиологических опытов по биоокислению нефтяного загрязнителя тестируемыми штаммами углеводородокисляющих микроорганизмов;
- анализ послеопытных образцов комплексом химико-битуминологических методов;
- проведение по результатам анализа балансовых расчетов процесса биоокисления нефтяного загрязнителя тестируемыми штаммами с определением их активности.

На рис. 1 представлена принципиальная схема методики проведения опытов по биоокислению нефти и нефтепродуктов углеводородокисляющими микроорганизмами в лабораторных условиях. Самостоятельными и независимыми статьями перед постановкой опытов выступают:

- штаммы углеводородокисляющих микроорганизмов;
- условия опытов и жизнеобеспечения углеводородокисляющих микроорганизмов;
- нефтяной загрязнитель;
- продолжительность опытов.

Сценарий постановки конкретной серии опытов обусловлен целью и задачами проводимых исследований, в зависимости от которых, как правило, два параметра в опытах становятся переменными, остальные – постоянными.

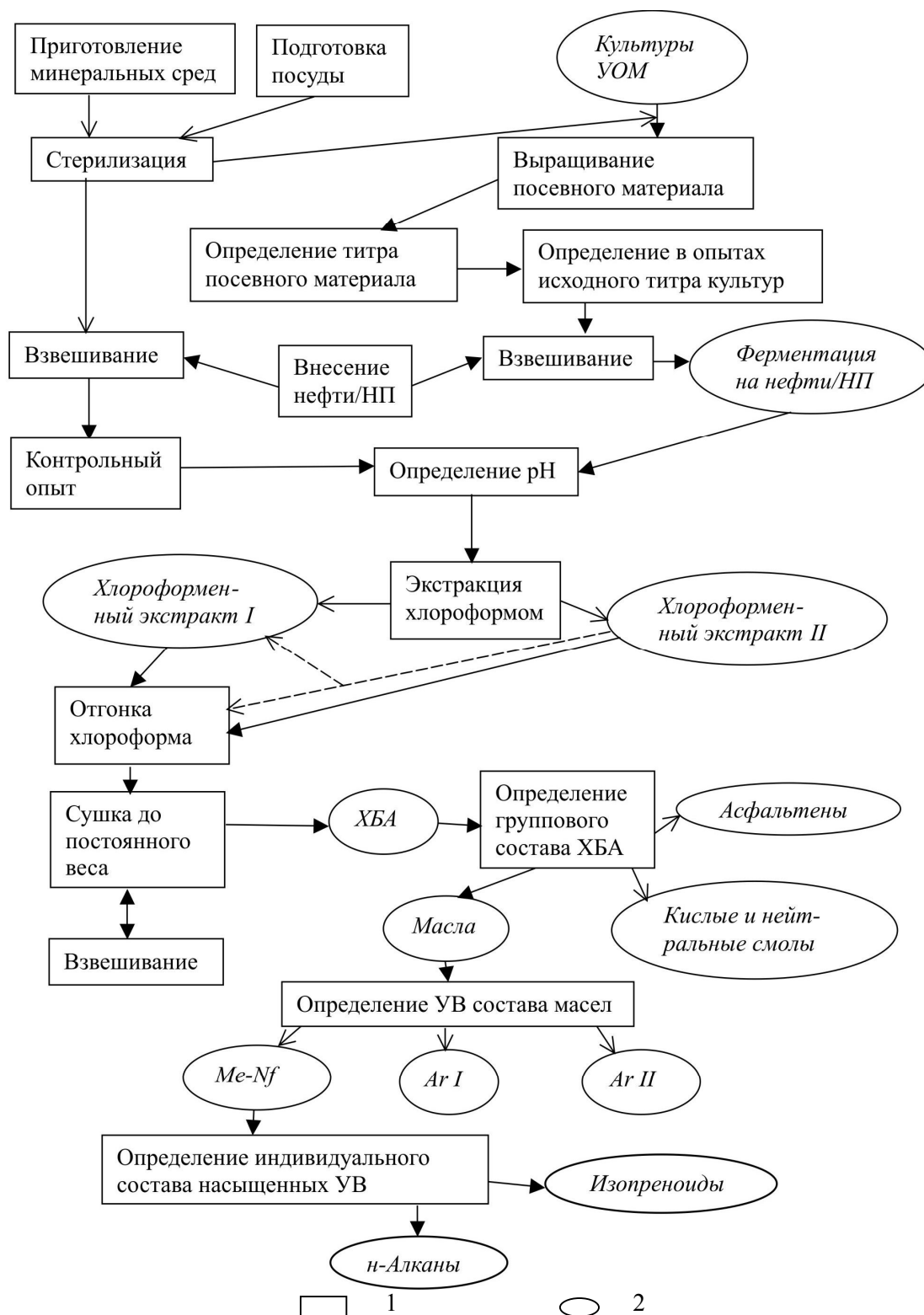


Рис. 1. Принципиальная схема методики проведения опытов по биоокислению нефти и нефтепродуктов углеводородокисляющими микроорганизмами в лабораторных условиях
 1 - производимые действия; 2 - получаемые результаты. НП – нефтепродукты; УОМ - углеводородокисляющие микроорганизмы.

Производимые действия и получаемые результаты при проведении микробиологических опытов достаточно четко представлены на приведенной выше схеме.

Экстракция нефтяного загрязнителя после завершения опытов производится хлороформом, при этом хлороформенный экстракт I содержит оставшийся в опыте неиспользованный нефтяной загрязнитель, а хлороформенный экстракт II содержит битумоид, извлеченный из культуральной среды и биомассы, $X_{БНЗ}$ и $X_{БКС}$ соответственно. Суммарный послеопытный хлороформенный битумоид ($X_{БНЗ} + X_{БКС}$) характеризует в целом прошедший в опыте процесс биоокисления и позволяет судить об активности тестируемого штамма. $X_{БНЗ}$ и $X_{БКС}$ дают определенную информацию о соотношении оставшегося в опыте нефтяного загрязнителя и промежуточных продуктах его окисления. Динамика изменения их соотношения свидетельствует, как показали наши исследования, о разном механизме утилизации нефтяного загрязнителя различными штаммами углеводородокисляющих микроорганизмов. Так, при окислении дизельного топлива штаммом 4-Д рода *Pseudomonas* отношение $X_{БДТ}/X_{БКС}$ составило 29,9; 26,4 и 189,0; а штаммом 99-Г того же рода – 12,8; 0,89 и 1,85 соответственно через 14, 28 и 42 суток продолжительности опытов. Согласно этим данным, биоокисление дизельного топлива штаммом 4-Д сопровождается новообразованием промежуточных продуктов в большей степени в начале процесса, чем в конце, а штаммом 99-Г – наоборот.

Детальный комплексный химико-битуминологический анализ суммарного битумоида ($X_{Б\Sigma}$) позволяет определить его качественный состав в процентном отношении (масла, бензолные смолы, спиртобензолные смолы, асфальтены), состав масел (Me-Nf углеводороды, ароматические углеводороды) и индивидуальный состав насыщенных углеводородов Me-Nf фракции (n-алканы, изопреноиды).

Полученный в результате анализов фактический материал по изменению состава исходного для опытов нефтяного загрязнителя и послеопытных его образцов позволяет провести балансовые расчеты процесса утилизации. При этом оценивается биодеструкция нефтяного загрязнителя в целом и отдельных фракций, входящих в его состав в процентах относительно исходного их содержания.

Сравнительная характеристика тестируемых штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов по активности биоокисления нефтяного загрязнителя дает возможность выбрать наиболее активные для создания на их основе биопрепаратов. Избирательная способность штаммов к окислению конкретных фракций нефтяного загрязнителя служит основой для создания препаратов целевого назначения.

Представленный выше разработанный и практикуемый во ФГУП «ВНИГРИ» лабораторный комплекс детального исследования активности биоокисления нефтяного загрязнителя углеводородокисляющими микроорганизмами и эффективности биопрепаратов не имеет аналогов в отечественной практике создания биопрепаратов и очистки нефтезагрязненных почв.

Литература

Матвеев Ю.М. Технологии очистки территорий, загрязненных нефтепродуктами. - Доклады Первой Всеросс. конференции «Поиски нефти, нефтяная индустрия и охрана окружающей среды». - СПб., 1995. - С. 126-130.

Акопова Г.С. Очистка техногенных сред, загрязненных углеводородами, с использованием биопрепаратов // Газовая промышленность, 2008. - № 6. - С. 69-71.

Воденова М.А., Хабарова Е.И., Донерьян Л.Г. Анализ существующих микробиологических препаратов, используемых для биодegradации нефти в почве // Горный информационный аналитический бюллетень (научно-технический журнал), 2010. - Семинар № 10. - С. 253-258.

Рогозина Е.А., Андреева О.А., Жаркова С.И., Мартынова Д.А., Орлова Н.А. Сравнительная характеристика отечественных биопрепаратов, предлагаемых для очистки почв и грунтов от загрязнения нефтью и нефтепродуктами // Нефтегазовая геология. Теория и практика. - 2010. - Т.5. - №3. - http://www.ngtp.ru/rub/7/37_2010/pdf

Алехин В.Г., Фахрутдинов А.И., Малышкина Л.А., Ситников А.В., Емцев В.Т., Хотянович А.В. Сравнительная эффективность деструкции нефтепродуктов различными биопрепаратами при разных уровнях загрязнения торфогрунтов // Биологические ресурсы и природопользование. - Сб. научных тр. - Нижневартовск: Нижневартовский пед. ин-т, 1999. - Вып. 3. - С. 96-106.

Технология очистки различных сред и поверхностей, загрязненных углеводородами // РД 39-1.13-056-2002. - М.: ОАО «Газпром», 2002.

Киреева Н.А., Григориади А.С., Хайбуллина Е.Ф. Ассоциация углеводородокисляющих микроорганизмов для биоремедиации нефтезагрязненных почв // Вестник Башкирского унта, 2009. - Т.14. - №2. - С. 392-394.

Ивасишин П.Л., Морюгина Т.А., Савонина Е.Ю., Талис Р.А. Эффективность применения биопрепаратов, гуматов и сорбентов для снижения остаточного содержания нефтепродуктов в торфах при рекультивации // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе, 2011. - № 5. - С. 19-23.

Киреева Н.А., Водопьянов В.В., Григориади А.С., Новоселова Е.И., Багаутдинова Г.Г., Гареева А.Р., Лобастова Е.Ю. Эффективность применения биопрепаратов для восстановления плодородия техногенно-загрязненных почв // Изв. Самарского НЦ РАН, 2010. - Т.12. - №1(4). - С. 1023-1026.

РД 52.18.575-96 Методические указания. Определение валового содержания нефтепродуктов в пробах почвы методом ИКС. Методика выполнения измерений. - Федеральная служба России по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды. - М., 1999.

Преобразование нефтей микроорганизмами // Тр. ВНИГРИ. - Л.: ВНИГРИ, 1970. - Вып. 281.

Рогозина Е.А., Хотянович А.В., Архангельская Р.А., Жаркова С.И., Ипатов Ю.И., Костюничева Е.В., Орлова Н.А., Свечина Р.М., Сергеенок Л.И., Шапиро А.И. Биопрепараты серии НАФТОКС для очистки почвенных и водных экосистем от нефтезагрязнения // Поиски

нефти, нефтяная индустрия и охрана окружающей среды. - Доклады 1-ой Всеросс. конф. 17-22 апреля 1995. - СПб.: ВНИГРИ, 1995. - С. 137-144.

Рогозина Е.А., Хотянович А.В. Биорекреация нефтезагрязненных почвенных и водных экосистем // Поиски нефти, нефтяная индустрия и охрана окружающей среды. - Доклады 1-ой Всеросс. конф. 17-22 апреля 1995. - СПб.: ВНИГРИ, 1995. - С. 131-136.

Рогозина Е.А., Калимуллина Г.М. Балансовая сторона и динамика утилизации нефтяного загрязнения почвы // Нефтегазовая геология. Теория и практика. - 2009. - Т.4. - №4. - http://www.ngtp.ru/rub/7/19_2009/pdf

Рогозина Е.А. Актуальные вопросы проблемы очистки нефтезагрязненных почв // Нефтегазовая геология. Теория и практика. - 2006. - № 1. - <http://www.ngtp.ru/rub/7/02.pdf>

Рогозина Е.А. Геохимические изменения в составе нефтей при биодegradации // Разведка и охрана недр, 2010. - № 4. - С. 63-68.

Руководство по анализу нефтей (для лабораторий геологоразведочных организаций) / Под ред. А.И. Богомолова и Л.И. Хотынцевой. - Л.: Мин. Геол. СССР, ВНИГРИ, ВНИГНИ, 1966. - 299 с.

Руководство по анализу битумов и рассеянного органического вещества горных пород / Под ред. В.А. Успенского. - Л.: Недра, 1966. - 290 с.

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

Rogozina E.A., Svechina R.M., Shapiro A.I., Perekhodova L.S., Timergazina I.F.
All-Russia petroleum research exploration institute (VNIGRI), Saint Petersburg, Russia,
ins@vnigri.ru

INVESTIGATION OF UTILIZING OIL AND OIL PRODUCTS BY STRAINS OF HYDROCARBON-OXIDIZING MICROORGANISMS - METHODOLOGICAL ASPECTS

The complex of laboratory experiments on the activity of utilizing contaminant oil by strains of hydrocarbon-oxidizing microorganisms developed in VNIGRI is analyzed. Particular attention is given to a detailed chemical bitumen analysis of initial and bio-oxidized samples, allowing investigating of utilization of contaminant oil and its fractions (oils, neutral and acidic resins, asphaltenes, saturated and aromatic hydrocarbons). Use of integrated chemical bitumen analysis in extraction contributes to objectiveness in evaluation the effectiveness of biological products for utilizing oil pollution of soil.

Key words: oil, oil pollution, hydrocarbons, petroleum products, strains of hydrocarbon-oxidizing microorganisms, activity, bio-oxidation, chemical bitumen analysis.

References

Matveev Ū.M. Tehnologii oĉistki territorij, zagrâznennyh nefteproduktami. - Doklady Pervoj Vseross. konferencii «Poiski nefti, neftânaâ industriâ i ohrana okružaûšej sredy». - SPb., 1995. - S. 126-130.

Akopova G.S. Oĉistka tehnogennyh sred, zagrâznennyh uglevodorodami, s ispol'zovaniem biopreparatov // *Gazovaâ promyšlennost'*, 2008. - # 6. - S. 69-71.

Vodenova M.A., Habarova E.I., Doner'ân L.G. Analiz sušestvuûših mikrobiologičeskikh preparatov, ispol'zuemyh dlâ biodegradacii nefti v počve // *Gornyj informacionnyj analitiĉeskij bûlleten' (nauĉno-tehniĉeskij ŷurnal)*, 2010. - Seminar # 10. - S. 253-258.

Rogozina E.A., Andreeva O.A., Źarkova S.I., Martynova D.A., Orlova N.A. Sravnitel'naâ harakteristika oteĉestvennyh biopreparatov, predlagaemyh dlâ oĉistki počv i gruntov ot zagrâzneniâ neft'û i nefteproduktami // *Neftegasovaâ geologiâ. Teoriâ i praktika.* - 2010. - T.5. - #3. - http://www.ngtp.ru/rub/7/37_2010/pdf

Alehin V.G., Fahrutdinov A.I., Malyškina L.A., Sitnikov A.V., Emcev V.T., Hotânoviĉ A.V. Sravnitel'naâ èffektivnost' destrucii nefteproduktov razliĉnymi biopreparatami pri raznyh urovnâh zagrâzneniâ torfogruntov // *Biologičeskie resursy i prirodepol'zovanie.* - Sb. nauĉnyh tr. - Nižnevartovsk: Nižnevartovskij ped. in-t, 1999. - Vyp. 3. - S. 96-106.

Tehnologiâ oĉistki razliĉnyh sred i poverhnostej, zagrâznennyh uglevodorodami // RD 39-1.13-056-2002. - M.: OAO «Gazprom», 2002.

Kireeva N.A., Grigoriadi A.S., Hajbullina E.F. Asociaciâ uglevodorodokislâûših mikroorganizmov dlâ bioremediacii neftezagrâznennyh počv // *Vestnik Baškirskogo un-ta*, 2009. - T14. - #2. - S. 392-394.

Ivasišin P.L., Morûgina T.A., Savonina E.Ū., Talis R.A. Èffektivnost' primeneniâ biopreparatov, gumatov i sorbentov dlâ sniŷeniâ ostatoĉnogo sodержaniâ nefteproduktov v torfah pri rekul'tivacii // *Zašita okružaûšej sredy v neftegazovom komplekse*, 2011. - # 5. - S. 19-23.

Kireeva N.A., Vodop'ânov V.V., Grigoriadi A.S., Novoselova E.I., Bagautdinova G.G., Gareeva A.R., Lobastova E.Ū. Èffektivnost' primeneniâ biopreparatov dlâ vosstanovleniâ plodorodiâ tehnogenno-zagrâznennyh počv // *Izv. Samarskogo NC RAN*, 2010. - T.12. - #1(4). - S. 1023-1026.

RD 52.18.575-96 Metodičeskie ukazaniâ. Opredelenie valovogo sodержaniâ nefteproduktov v probah počvy metodom IKS. Metodika vypolneniâ izmerenij. - Federal'naâ služba Rossii po gidrometeorologii i monitoringu okružaûšej sredy. - M., 1999.

Preobrazovanie neftej mikroorganizmami // Tr. VNIGRI. - L.: VNIGRI, 1970. - Vyp. 281.

Rogozina E.A., Hotânovič A.V., Arhangel'skaâ R.A., Žarkova S.I., Ipatov Ū.I., Kostûničeva E.V., Orlova N.A., Svečina R.M., Sergeenok L.I., Šapiro A.I. Biopreparaty serii NAFTOKS dlâ očistki počvennyh i vodnyh èkosistem ot neftezagrâzneniâ // Poiski nefti, neftânaâ industriâ i ohrana okružaûšej sredey. - Doklady 1-oj Vseross. konf. 17-22 aprilâ 1995. - SPb.: VNIGRI, 1995. - S. 137-144.

Rogozina E.A., Hotânovič A.V. Biorekreaciâ neftezagrâznennyh počvennyh i vodnyh èkosistem // Poiski nefti, neftânaâ industriâ i ohrana okružaûšej sredey. - Doklady 1-oj Vseross. konf. 17-22 aprilâ 1995. - SPb.: VNIGRI, 1995. - S. 131-136.

Rogozina E.A., Kalimullina G.M. Balansovaâ storona i dinamika utilizacii neftânogo zagrâzneniâ počvy // Neftegazovaâ geologiâ. Teoriâ i praktika. - 2009. - T.4. - #4. - http://www.ngtp.ru/rub/7/19_2009/pdf

Rogozina E.A. Aktual'nye voprosy problemy očistki neftezagrâznennyh počv // Neftegazovaâ geologiâ. Teoriâ i praktika. - 2006. - # 1. - <http://www.ngtp.ru/rub/7/02.pdf>

Rogozina E.A. Geohimičeskie izmeneniâ v sostave neftej pri biodegradacii // Razvedka i ohrana neдр, 2010. - # 4. - S. 63-68.

Rukovodstvo po analizu neftej (dlâ laboratorij geologorazvedočnyh organizacij) / Pod red. A.I. Bogomolova i L.I. Hotyncevoj. - L.: Min. Geol. SSSR, VNIGRI, VNIGNI, 1966. - 299 s.

Rukovodstvo po analizu bitumov i rasseânnoogo organičeskogo vešestva gornyh porod / Pod red. V.A. Uspenskogo. - L.: Nedra, 1966. - 290 s.