

ГРАДОСТРОИТЕЛЬНАЯ ЭКОЛОГИЯ. РЕКУЛЬТИВАЦИЯ НАРУШЕННЫХ ТЕРРИТОРИЙ

УДК 504.53.054:622.323 + 504.064.2:579.69

М.В. Ахмадиев

Пермский национальный исследовательский
политехнический университет

ПРИМЕНЕНИЕ АБОРИГЕННЫХ ШТАММОВ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ БИОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ И ГРУНТОВ

Биоремедиация нефтезагрязненных почв и грунтов представляет собой длительный процесс, требующий интенсификации. Одно из направлений интенсификации биоремедиации – внесение в нефтезагрязненную почву или грунт штаммов углеводородоокисляющих микроорганизмов. Приоритетным направлением является внесение аборигенных штаммов микроорганизмов, выделенных из исходного нефтезагрязненного субстрата. Применение консорциума аборигенных микроорганизмов позволяет избежать биоценотического загрязнения, происходящего при применении промышленных биопрепаратов на основе углеводородоокисляющих микроорганизмов.

Ключевые слова: биоремедиация, рекультивация, нефтезагрязненные почвы, нефтезагрязненные грунты, углеводородоокисляющие микроорганизмы, биопрепарат.

Загрязнение окружающей среды углеводородами нефти в городской среде может происходить на территориях, связанных с переработкой или хранением нефтепродуктов. В результате аварийных ситуаций не исключено попадание различных фракций нефтепродуктов на рельеф, при этом образуются локальные участки нефтезагрязненной почвы или грунта.

Вследствие токсического эффекта, обусловленного наличием углеводородов нефти, нефтезагрязненная почва становится отходом, обладающим опасными свойствами и требующим переработки.

Попадание нефти в почву провоцирует изменение ее характеристик: микробиологических, физико-химических, агрохими-

ческих и биологических. Основной задачей при переработке нефтезагрязненной почвы является восстановление исходных характеристик почвы.

В настоящее время для восстановления нефтезагрязненных почв и грунтов широко применяют биотехнологические методы, которые основаны на естественных механизмах самоочищения почвы от ксенобиотиков при участии всех видов живых организмов, формирующих структуру биоценоза со скоростями, зависящими от условий проведения процесса [1, 2].

Метод биоремедиации нефтезагрязненных почв может быть реализован посредством двух технологий: биоремедиацией на открытых технологических площадках и биоремедиацией с применением биореакторной технологии.

1. Биоремедиация на технологических площадках. Технологическая площадка биоремедиации представляет собой открытую земельную территорию с гидроизоляционным основанием, в качестве которого используют геосинтетические материалы или природную глину с коэффициентом фильтрации не более 10^{-7} м/с.

2. Биоремедиация с использованием биореакторной технологии. Биореакторы представляют собой закрытую систему, в которой поддерживаются оптимальные условия, необходимые для активной жизнедеятельности углеводородокисляющей микрофлоры. Как правило, биореакторы – это емкости из инертного материала, оснащенные различными технологическими элементами (системой аэрации, системой орошения и т.д.) [3, 4].

Для того чтобы произвести интенсификацию процесса биоремедиации нефтезагрязненных почв и грунтов и, как следствие, сократить сроки биоремедиации, действуют в основном двумя способами: 1) активизацией метаболической активности естественной микрофлоры путем изменения соответствующих физико-химических условий среды (использование агротехнических приемов); 2) внесение специально подобранных нефтеокисляющих микроорганизмов в загрязненную почву [1, 3].

В настоящее время существует большое количество биопрепаратов на основе нефтеокисляющих культур. В табл. 1 представлены наиболее часто встречаемые в литературных источниках промышленные биопрепараты, используемые при ликвидации нефтяных загрязнений.

Таблица 1

**Биопрепараты, применяемые для интенсификации
биоремедиации нефтезагрязненных почв и грунтов**

№ п/п	Биопрепарат	Используемые бактериальные культуры
1	Олеофильный	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ; <i>Rhodococcus ruber</i>
2	Деворойл	<i>Pseudomonas sp.</i> ; <i>Rhodococcus sp.</i> ; <i>Yarovvia sp.</i>
3	Микромицет	<i>Penicillium sp.</i>
4	Ленойл	<i>Bacillus brevis</i> ; <i>Arthrobacter sp.</i>
5	Дестройл	<i>Acinetobacter sp.</i>
6	Бациспекцин	<i>Bacillus sp.</i>
7	Путидойл	<i>Pseudomonas putida</i> 36
8	Олеоворин	<i>Acinetobacter oleovorum</i>
9	Сойлекс	Аэробные углеводородокисляющие непатогенные бактерии
10	Нафтокс	<i>Mycobacterium sp.</i> ; <i>Pseudomonas sp.</i> ; <i>Rhodococcus sp.</i>
11	Альбит	<i>Bacillus megaterium</i> ; <i>Pseudomonas aureofaciens</i>

Анализ литературных данных показал, что наиболее часто в состав биопрепаратов входят культуры следующих родов: *Rhodococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Acinetobacter sp.*

Первые бактериальные биопрепараты были изготовлены на основе активных штаммов-биодеструкторов углеводов нефти и состояли, как правило, из одного вида микроорганизмов (монокультура). Однако в дальнейшем было показано, что один микроорганизм не может использовать весь спектр углеводов нефти. В связи с этим стали разрабатываться бактериальные препараты, состоящие из двух и более видов микроорганизмов-биодеструкторов (поликультура) [4].

Во многих работах отмечают высокую эффективность применения поликультур, которые наиболее эффективны по сравнению с монокультурами. Высокая эффективность объясняется тем, что консорциум микроорганизмов (поликультура) способен ассимилировать более широкий спектр углеводов нефти, а также использовать промежуточные продукты, образующиеся при биодеструкции углеводов нефти другими микроорганизмами (спирты, альдегиды и т.д.) [4, 5].

Тенденцией последнего времени является создание биопрепаратов на основе аборигенной микрофлоры, т.е. микроорганиз-

мов, выделенных непосредственно из нефтезагрязненной почвы или грунта. Преимуществом использования аборигенной микрофлоры является адаптированность консорциума микроорганизмов к фракционному составу нефтепродуктов, которыми загрязнена перерабатываемая почва или грунт. Аборигенные культуры являются свойственными для сформировавшихся микробиоценозов, исключается интродукция посторонних штаммов, которые могут нарушать структуру биоценоза и являться источником биоценотического загрязнения.

Целью работы являлась оценка эффективности применения биопрепарата на основе аборигенных штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов, выделенных из нефтезагрязненной почвы.

Методическое обеспечение экспериментальных исследований. Экспериментальные исследования проводились в два этапа.

На первом этапе были определены исходные концентрации нефтепродуктов в нефтезагрязненной почве и выделены аборигенные культуры углеводородокисляющих микроорганизмов (УВОМ). На основе консорциума аборигенных УВОМ был создан биопрепарат, культивирование которого осуществляли в лабораторной модели ферментера.

На втором этапе оценивали влияние внесения биопрепарата на основе аборигенных культур УВОМ на эффективность биоремедиации нефтезагрязненной почвы.

Определение общего содержания нефтепродуктов в исходных образцах нефтезагрязненной почвы и в процессе ее очистки производили гравиметрическим методом.

Для выделения аборигенных культур УВОМ использовали почву, загрязненную нефтепродуктами Бугурусланского месторождения, характеристика нефти которых представлена в табл. 2.

Для выделения культур УВОМ производили посевы из почвенной болтушки на селективную среду Таусона следующего состава: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 1 г; KNO_3 – 0,25 г; MgSO_4 – 0,25 г; KH_2PO_4 – 0,25 г; K_2HPO_4 – 0,25 г; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ – 0,025 г; агар – 15 г; вода – 1000 мл [6].

Таблица 2

Характеристика нефти Бугурусланского месторождения

№ п/п	Наименование показателя	Значение показателя	Метод исследований
1	Температура нефти при условиях измерений объема, °С	33	МВИ СИКН №274
2	Температура нефти при измерении плотности ареометром, °С	23	ГОСТ 3900
3	Плотность нефти, измеренная ареометром, кг/м ³	272,7	ГОСТ 3900
4	Плотность нефти при условиях измерения объема, кг/м ³	866,3	МИ2153
5	Плотность нефти при 20 °С, кгс/м ³	874,6	ГОСТ 3900
6	Массовая доля воды, %	0,14	ГОСТ 2477
7	Концентрация хлористых солей, мг/дм ³	23	ГОСТ 21534
8	Массовая доля хлористых солей, %	0,0023	ГОСТ 21534
9	Массовая доля механических примесей, %	0,0064	ГОСТ 6370
10	Массовая доля балласта всего, %	0,149	ГОСТ 6370

Микроскопию выделенных аборигенных культур осуществляли с применением электронного микроскопа Carl Zeiss с увеличением 20×40 и стереомикроскопа OLYMPUS SZX 10 с максимальной разрешающей способностью 375.

Культивирование выделенной из исходных образцов аборигенной микрофлоры производили в лабораторной установке.

Определение активности каталазы осуществляли газометрическим методом [7].

Результаты экспериментальных исследований. Анализ исходных данных нефтезагрязненной почвы показал высокое содержание нефтепродуктов в почве $96,0 \pm 6,9$ г/кг, что могло обуславливать высокую численность УВОМ $(5,77 \pm 0,44) \cdot 10^7$ КОЕ/г. УВОМ представляли собой консорциум микроорганизмов различных систематических групп: бактерии, грибы, актиномицеты.

С целью создания и культивирования биопрепарата на основе аборигенных культур была собрана лабораторная модель ферментера (рис. 1).

Лабораторная установка представляла собой стеклянную емкость объемом 0,5 л с отводом б, в горло которой с целью снижения испарения жидкости была вмонтирована резиновая пробка с тремя

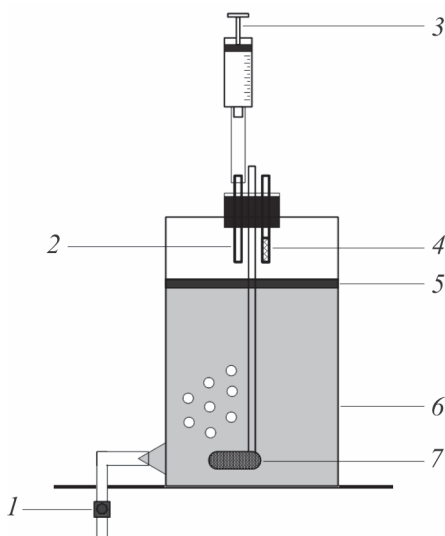


Рис. 1. Лабораторная модель ферментера: 1 – зажим; 2 – стеклянная трубка; 3 – шприц; 4 – стеклянная трубка со стекловолокном; 5 – нефтяная пленка; 6 – стеклянная емкость с отводом; 7 – аэратор



Рис. 2. Диспергирование нефти, разрушение поверхностной нефтяной пленки

отводами. Через стеклянную трубку 2 посредством шприца 3 происходила инокуляция аборигенных культур УВОМ. Через аэратор 7 осуществляли аэрацию суспензии УВОМ. Стеклянный отвод 4, наполненный стекловолокном, был необходим для выхода воздуха из установки. Посредством шланга и зажима 1 производили слив части или всего объема биопрепарата. Лабораторная установка могла работать как в дискретном, так и в непрерывном режиме.

В процессе культивирования аборигенных культур УВОМ в качестве единственного источника углеводов в субстрат вносили сырую нефть Бугурус-ланского месторождения, к которой уже были адаптированы выделенные аборигенные культуры УВОМ.

Готовность биопрепарата определяли по внешним признакам – диспергированию сырой нефти и разрушению поверхностной нефтяной пленки в лабораторной модели ферментера (рис. 2), а также микроскопии биопрепарата (рис. 3). Параллельно ставили контрольный вариант без внесения культур УВОМ.

На рис. 3 представлена микроскопическая картина капель сырой нефти в вариантах опыта с внесением и без внесения культур УВОМ.

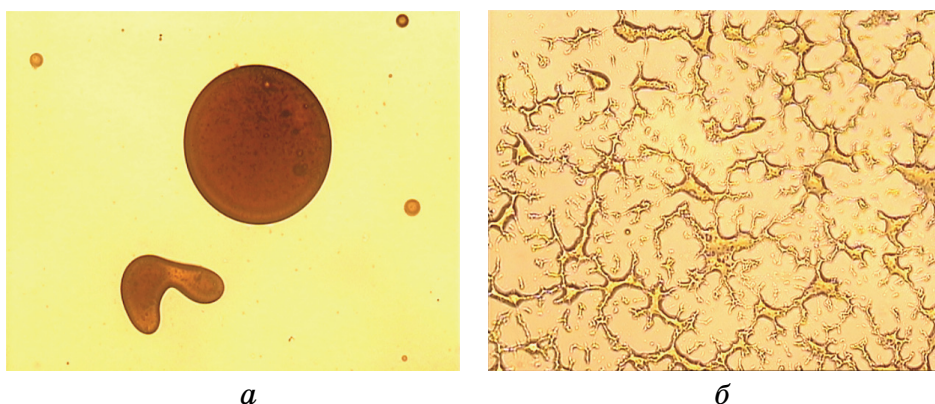


Рис. 3. Микроскопическая картина разрушения сырой нефти микроорганизмами ($\times 800$): *а* – контрольный вариант без внесения УВОМ; *б* – вариант с внесением УВОМ

Микроскопия в процессе подготовки биопрепарата показала, что постепенно происходит процесс разрушения нефти и ее ассимиляция микроорганизмами (рис. 3, *а*), в то время как в варианте опыта без внесения УВОМ биodeградации нефти не происходило (рис. 3, *б*).

В процессе созревания биопрепарата наблюдали интенсивное развитие культур УВОМ (рис. 4).

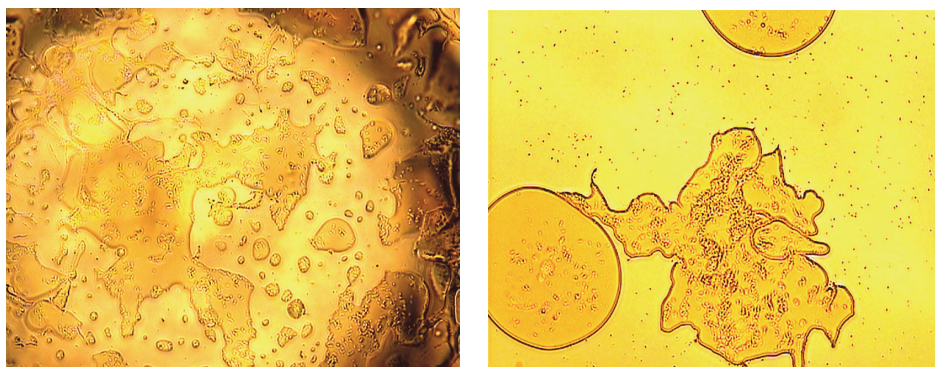


Рис. 4. Микроскопия суспензии УВОМ ($\times 800$)

При достижении концентрации клеток в биопрепарате 10^8 кл./мл биопрепарат вносили в нефтезагрязненную почву в количестве 20 мл на 1 кг загрязненной почвы. Внесение биопрепарата осуществляли на начальном этапе экспозиции.

Биоремедиацию нефтезагрязненной почвы проводили при следующих параметрах процесса: температура субстрата $(+20 \pm 2)$ °С, влажность субстрата 70–80 %, объемная доля структуратора 30 % (опил размером 5–7 мм). Оптимальные параметры биоремедиации были установлены на основании ранее проведенных экспериментальных исследований [8].

По прошествии 45 дней экспозиции было оценено изменение общего содержания нефтепродуктов в нефтезагрязненной почве (рис. 5), а также произведено сравнение эффективности биоремедиации в вариантах опыта с внесением и без внесения биопрепарата на основе аборигенных культур УВОМ.

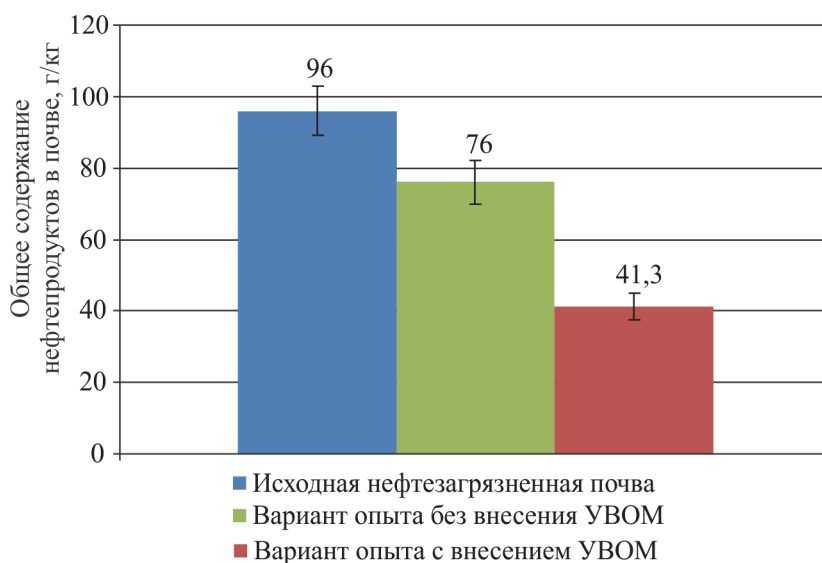


Рис. 5. Изменение общего содержания нефтепродуктов в нефтезагрязненной почве

Анализ общего содержания нефтепродуктов по прошествии 45 дней экспозиции показал значительное снижение содержания нефтепродуктов в нефтезагрязненной почве с внесением биопрепарата на основе аборигенных культур УВОМ. В варианте опыта с внесением культур УВОМ отмечали снижение концентрации нефтепродуктов с 96 до 41,3 г/кг, в то время как в варианте без внесения культур УВОМ отмечали снижение концентрации нефтепродуктов с 96 до 76 г/кг.

Эффективность очистки в варианте с внесением биопрепарата составила 56,98 %, что значительно выше по сравнению с вариантом без внесения биопрепарата 20,83 %.

Информативным показателем при очистке нефтезагрязненных почв является каталитическая активность нефтезагрязненной почвы. Изменение активности каталазы в нефтезагрязненной почве связывается с изменением численности микроорганизмов, особенно углеводородокисляющих [2]. При загрязнении почвы углеводородами активность каталазы снижается, что может быть связано с наличием фенола в нефти, тяжелых металлов, с избытком органического вещества нефти, обогащенной серой, сероводородом, меркаптанами, являющимися ингибиторами этого фермента, а также уменьшением концентрации кислорода и снижением численности аэробных групп микроорганизмов в результате закупорки воздушных пор и полостей почвы [2]. Оценку каталазной активности почвы проводили в начальный и конечный этап экспозиции (рис. 6).

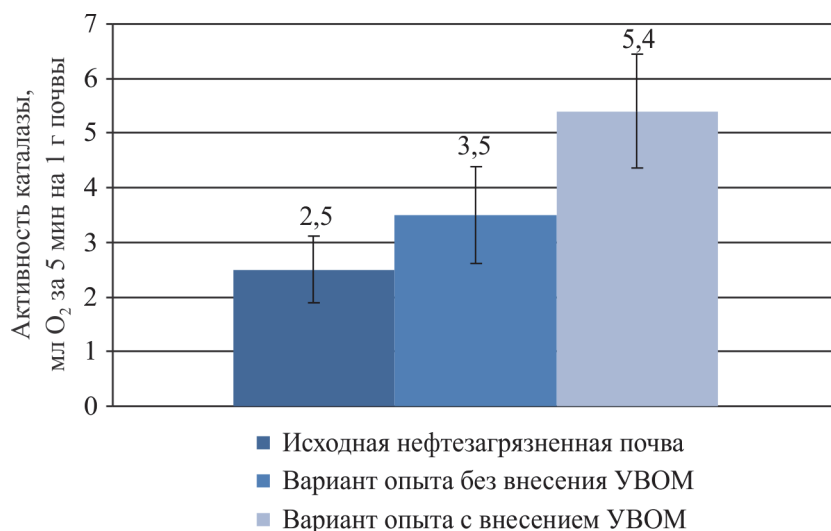


Рис. 6. Изменение активности каталазы

В процессе очистки нефтезагрязненной почвы отмечали увеличение активности каталазы с 2,5 до 5,4 мл O₂ за 5 мин на 1 г почвы в варианте опыта с внесением биопрепарата, в то время как в варианте опыта без внесения биопрепарата активность ка-

талазы изменялась с 2,5 до 3,5 мл O_2 за 5 мин на 1 г почвы. Высокая каталитическая активность в варианте опыта с внесением УВОМ могла быть связана со снижением общей концентрации нефтепродуктов и, как следствие, снижением токсического эффекта углеводов нефти, а также улучшением воздушного режима почвы. Снижение активности каталазы вследствие нефтяного загрязнения почвы также согласуется с литературными данными [2].

Выводы. При внесении биопрепарата происходило увеличение скорости очистки нефтезагрязненной почвы за счет роста численности физиологической группы микроорганизмов, использующей углеводороды нефти в качестве питательного субстрата.

На основании данных об изменении концентрации нефтепродуктов в почве был сделан вывод об увеличении эффективности биоремедиации с 20,83 до 56,98 при использовании биопрепарата на основе аборигенных культур УВОМ.

Снижение концентрации нефтепродуктов приводило к увеличению активности каталазы, что могло быть обусловлено снижением токсического эффекта углеводов нефти на почвенный микробиоценоз.

В биопрепарате, созданном на основе консорциума аборигенных культур микроорганизмов, присутствовали культуры адаптированные к биодеструкции углеводов нефти Бугурусланского месторождения и способные к усваиванию широкого спектра фракций углеводов нефти.

При внесении биопрепарата на основе аборигенных культур биодеструкция углеводов нефти микроорганизмами происходила непосредственно после внесения биопрепарата в нефтезагрязненную почву, без временных затрат на адаптацию культур к актуальному фракционному составу нефтепродуктов.

Преимуществом внесения биопрепарата на основе аборигенных культур является предотвращение биоценотического загрязнения почвы.

При применении аборигенных культур УВОМ в процессе биоремедиации происходит восстановление естественных биоценозов и нефтезагрязненные почвы постепенно приближаются к фоновым показателям незагрязненных природных почв.

Библиографический список

1. Пиковский Ю.И. Природные и техногенные потоки углеводородов в окружающей среде. – М.: Изд-во МГУ, 1993. – 208 с.
2. Киреева Н.А., Водопьянов В.В., Мифтахова А.М. Биологическая активность нефтезагрязненных почв. – Уфа: Гилем, 2001. – 376 с.
3. Современные методы переработки нефтешламов / Г.Г. Ягафарова, С.В. Леонтьева, А.Х. Сафарова, И.Р. Ягафаров. – М.: Химия, 2010. – 190 с.
4. Рекультивация нефтезагрязненных почв / Ф.М. Кузнецов, А.П. Козлов, В.В. Середин, Е.В. Пименова; Перм. гос. сельхоз. акад. – Пермь, 2003. – 196 с.
5. Прикладная экобиотехнология: учеб. пособие: в 2 т. / А.Е. Кузнецов [и др.]. – Т. 1. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – 629 с.
6. Таусон В.О. Основные положения растительной биоэнергетики. – М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1950. – 552 с.
7. Федорец Н.Г., Медведева М.В. Методика исследования почв урбанизированных территорий / Карел. науч. центр РАН. – Петрозаводск, 2009. – 84 с.
8. Бикмансурова Э.Х., Рудакова Л.В., Ахмадиев М.В. Исследование процессов биоремедиации нефтезагрязненных почв в лабораторных биореакторах различного типа // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2008. – № 12. – С. 21–26.

References

1. Pikovskij Yu. I. Prirodnye i tekhnogennye potoki uglevodorodov v okruzhaushchej srede [Natural and anthropogenic streams of hydrocarbon in environment]. Moskowsky gosudarstvennyi universitet, 1993. 208 p.
2. Kireeva N.A., Vodopianov V.V., Miftakhova A.M. Biologicheskaja aktivnost neftezagryasnennykh pochv [Biological activity of oil-contaminated soils]. Ufa: Gilem, 2001. 376 p.
3. Iagafarova G.G., Leontieva S.V., Safarova A.Kh., Iagafarov I.R. Sovremennye metody pererabotki nefteshlamov [Modern methods of oil-sludge treatment]. Moscow: Khimiya, 2010. 190 p.
4. Kuznetsov F.M., Kozlov A.P., Seredin V.V., Pimenova E.V. Rekultivatsia neftezagryasnennykh pochv [Reclaiming of oil-contaminated soils]. Permskaya gosudarstvennaya selskokhozyajstvennaya akademija, Perm, 2003. 196 p.
5. Kuznetsov A.E. [et al.] Prikladnaya ekobiotekhnologiya [Applied ecobiotechnology]. Moscow: BINOM. Laboratoriia znaniy, 2010. 629 p.
6. Tauson V.O. Osnovnye polozheniya rastitelnoi bioenergetiki [Basic positions of plant bioenergetics]. Moscow; Leningrad: Akademiya nauk SSSR, 1950. 552 p.
7. Fedorets N.G., Medvedeva M.V. Metodika issledovaniya pochv urbanizirovannykh territorij [Methods of soil research of urban areas]. Petrozavodsk: Karelskiy nauchnyi tsentr RAN, 2009. 84 p.
8. Bikmansurova E.Kh., Rudakova L.V., Akhmadiev M.V. Issledovanie protsessov bioremediatsii neftezagryasnennykh pochv v laboratornykh bioreaktorakh razlichnogo tipa [Research of processes bioremediation of oil-contaminated soils in bioreactors of different types]. Zashchita okruzhaushei sredy v neftegazovom komplekse, 2008, no. 12, pp. 21–26.

Получено 30.05.2014

M. Akhmadiev

**USING OF ABORIGINAL HYDROCARBONS-OXIDIZING
MICROORGANISMS IN THE BIOREMEDIATION
OF CONTAMINATED SOIL AND GROUND**

Bioremediation of oil-contaminated soils and grounds is a slow process. This process is necessary to intensify. One of the directions for intensification of oil-contaminated soil is using of hydrocarbon-oxidizing microorganisms. The priority is the using of microorganisms which was isolated from oil-contaminated soil. Using of consortium aboriginal microorganisms avoids contamination of biocenosis that happens using of industrial biologics based on hydrocarbon-oxidizing microorganisms.

Keywords: bioremediation, reclaiming, oil-contaminated soil, oil-contaminated ground, hydrocarbon oxidizing microorganisms, biopreparation.

Ахмадиев Максим Владимирович (Пермь, Россия) – ассистент кафедры охраны окружающей среды, Пермский национальный исследовательский политехнический университет (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29, e-mail: akhmadiev-m@yandex.ru).

Akhmadiev Maksim (Perm, Russia) – Assistant Lecturer, Department of Environmental Protection, Perm National Research Polytechnic University (614990, Perm, Komsomolskij av., 29, e-mail: akhmadiev-m@yandex.ru).