

# ОЧИСТКА ВОДНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ОТ НЕФТИ ПРИ ПОМОЩИ углеводородоокисляющих микроорганизмов, адсорбированных **НА ЦЕОЛИТЕ**

**Исследование эффективности средней (1-2 мм) и мелкой (0,01-0,1 мм) фракций цеолита выявило тенденцию к увеличению глубины биodeградации углеводородов в водной среде при использовании мелкой фракции. Прием адсорбции на цеолите микробной нефтеокисляющей культуры *Pseudomonas putida* способствует увеличению численности микроорганизмов в воде, продлевает период их активности и способствует ускорению очистки воды от нефтепродуктов.**

## Введение

**Н**ефть и нефтепродукты являются одними из наиболее распространенных техногенных загрязнителей природных объектов в регионах нефтедобычи. При этом аварийные разливы происходят на всех этапах добычи, хранения, транспортировки и переработки углеводородного сырья. Загрязнение почвы и водоемов нефтепродуктами происходит также из-за несовершенства очистных систем и утечек топлива. В общей сложности ежегодные технологические и аварийные потери нефтепродуктов в России достигают 4,8 млн. тонн. В зоне месторождений и трасс нефтепроводов на каждый квадратный километр выливается в среднем 0,02 тонны нефти в год [1].

Поскольку нефтепродукты являются одним из наиболее распространенных и опасных видов загрязнения, создание и внедрение в практику новых технологий восстановления природных объектов, нарушенных в результате нефтяных разливов, относится к приоритетным направлениям научно-практических исследований в области охраны окружающей среды.

Особенно опасными считаются загрязнения нефтепродуктами водных объектов. Нега-

**Н.Н. Терещенко\***,  
доктор биологических наук, профессор кафедры экологической и сельскохозяйственной биотехнологии, Биологический институт национального исследовательского Томского государственного университета

**С.В. Лушников**,  
генеральный директор, ООО НТО «Приборсервис»

тивное воздействие нефтяной пленки на поверхности водоема не ограничивается только нарушением аэрации водоема, а дает начало целому каскаду разрушительных последствий для сообщества гидробионтов. Продукты деградации углеводородов нефти могут оказывать выраженное токсическое воздействие на самых разных уровнях трофической цепи биоценоза водоема. Дополнительная проблема очистки воды связана с технологической сложностью полного сбора нефти с водной поверхности в условиях пересеченной заболоченной местности.

Многолетняя практика биоремедиации свидетельствует о том, что наиболее полное восстановление экосистем обеспечивают биологические методы, основанные на стимулировании функциональной активности аборигенной нефтеокисляющей микрофлоры или интродукции активных штаммов углеводородоокисляющих микроорганизмов. Метод биоремедиации водных объектов, разработанный ООО НТО «Приборсервис», предполагает использование экологически оправданной схемы внесения минеральных удобрений и цеолитов для сорбции и стимулирования углеводородоокисляющей активности аборигенной микрофлоры [2]. Кроме того, в предварительных модельных испытаниях по очистке водной поверхности от нефти хорошо зарекомендовало себя применение нового перспективного биопрепарата на основе углеводородоокисляющих бактерий *Pseudomonas putida*, адсорбированных на цеолите [3]. Как известно, представители рода *Pseudomonas* довольно часто используются для биоремедиации и детоксикации

\* Адрес для корреспонденции: [ternat@mail.ru](mailto:ternat@mail.ru)

техногенно-загрязненных природных объектов [4, 5]. В частности, приведенные в [6] данные свидетельствуют о способности *Pseudomonas putida* утилизировать формальдегид и ряд других ароматических соединений с выраженной токсичностью. В работе [7] также показана высокая эффективность штамма *Pseudomonas putida* BS3701 при очистке почвы от фенантрена.

При очистке водных поверхностей от углеводородов в некоторых случаях используют различные субстраты с адсорбированными активными штаммами нефтедеструкторов. Так, например, в [8] показана высокая эффективность использования активных микробных штаммов, адсорбированных на поверхности хитина и веществ хитозанового ряда, для очистки морской воды от углеводородных загрязнителей.

Целью исследований, представленных в данной публикации, была оценка эффективности цеолита различных фракций, а также приема адсорбции на его поверхности бактериальной культуры *Pseudomonas putida*, при очистке водной поверхности от нефти.

## Материалы и методы исследования

В модельном лабораторном опыте использовали цеолит Шивыртуйского месторождения (г. Красноярск), раздробленный до фракций 0,01–0,1 мм и 1,0–2,0 мм. Бактериальную культуру на цеолит наносили путём опрыскивания цеолита накопительной культурой *Pseudomonas putida* с титром  $N \times 10^9$  клеток в 1 мл и последующего высушивания без нагревания. Для стимулирования микробиологических процессов в воду, загрязненную нефтепродуктами, вносили мочевины и двойной суперфосфат в количестве 5,43 мг/л и 1,08 мг/л, соответственно. Цеолит, как с бактериальной культурой, так и без нее, вносили в дозе 2,0 г/л. При использовании бактериальной культуры без цеолита водную поверхность орошали жидкой накопительной культурой *Pseudomonas putida* вышеуказанного титра в количестве 3,3 мл/л.

Исходное содержание нефти в воде составляло 23,7 г/л. Для поддержания высокого уровня микробиологических процессов деградации нефти через 1,5 месяца проводили повторное внесение минеральных удобрений в дозе: мочевины – 54,3 мг/л, двойной суперфосфат – 11 мг/л. Для максимального приближения условий эксперимента к природным, аэрацию воды не проводили. Температуру воздуха поддерживали на уровне +20–22 °С.

**И.В. Русских,**  
научный сотрудник,  
Учреждение  
Российской академии  
наук Института химии  
нефти Сибирского  
отделения РАН

**А.Д. Писарчук,**  
младший научный  
сотрудник лаборатори-  
и биотехнологии,  
ГНУ Сибирский НИИ  
сельского хозяйства  
и торфа  
Россельхозакадемии

В ходе эксперимента проводили визуальные наблюдения за изменением состояния нефтяной пленки и определение численности углеводородокисляющей микрофлоры (УОМ) в динамике. Содержание остаточной нефти на поверхности воды и растворенных в воде углеводородов анализировали спустя 4 месяца после начала эксперимента.

Численность УОМ определяли посевом на агаризованную питательную среду с нефтью следующего состава (г/л):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 1,45;  $\text{KNO}_3$  – 1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 2,4;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,6;  $\text{NaCl}$  – 1;  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$  – 0,004;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,009;  $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,008;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,014; агар-агар – 20,0; сырая нефть – 10.

Содержание остаточных нефтепродуктов в воде определяли в соответствии с методикой [9] с использованием ИК-Фурье спектрометра Nicolet 5700 (разрешение  $4 \text{ см}^{-1}$ , число сканов пробы 64) в диапазоне  $3100\text{--}2700 \text{ см}^{-1}$ , в кюветах из  $\text{NaCl}$  с толщиной поглощающего слоя 10 мм. Экстракцию нефтепродуктов проводили четыреххлористым углеродом. Для остаточной нефти, собранной с поверхности воды, рассчитывали спектральные коэффициенты.

Модельный опыт закладывали по схеме, приведенной в табл. 1. Повторность опыта – 3-х кратная.

## Результаты и их обсуждение

Результаты анализа содержания остаточной нефти на поверхности воды показали, что в целом внесение цеолита способствовало заметному ускорению деградации нефтяной пленки не только по сравнению с контролем, но и по сравнению с внесением минеральных удобрений, т.е. фоном (табл. 1). Несмотря на то, что различия в эффективности средней и мелкой фракций цеолита оказались незначительными, в опыте прослеживается тенденция к ускорению процессов деградации нефти при использовании мелкой фракции цеолита.

Интродукция нефтеокисляющих бактерий *Pseudomonas putida* на поверхности обеих фракций цеолита способствовала еще большему стимулированию биодеградации нефти в воде. В вариантах с совместным использованием цеолита и бактерий были достигнуты максимальные показатели биодеградации нефтяной пленки на поверхности воды, составившие для вариантов с мелкой и средней фракцией цеолита 35,0 % и 33,5 %, соответственно. По сравнению с фоновым вариантом, где использовались только минеральные удобрения, ускорение

**Таблица 1**

Содержание остаточной нефти на поверхности воды спустя 4 месяца после начала опыта

№ пробы	Вариант опыта	Масса нефти, г/л	Степень биодegradации нефти, %	Разница с контролем, %
	Исходное содержание нефти	23,70	---	---
1	Контроль – нефть	17,60 ± 0,03	25,7	---
2	Нефть + минеральные удобрения = Фон	16,75 ± 0,71	29,3	4,83
3	Фон + цеолит (мелкая фракция)	16,00 ± 0,05	32,5	9,1
4	Фон + цеолит (мелкая фракция) + <i>Ps. putida</i>	15,42 ± 0,11*	35,0	12,40
5	Фон + цеолит (средняя фракция)	16,05 ± 0,06	32,3	8,80
6	Фон + цеолит (средняя фракция) + <i>Ps. putida</i>	15,75 ± 0,03*	33,5	10,51
7	Фон + <i>Ps. putida</i>	16,45 ± 0,10	30,6	6,53

Примечание \* – здесь и далее различия с Фоном по критерию Стьюдента достоверны при 95 %-м уровне значимости

биодegradации нефти в вариантах с применением мелкой и средней фракций цеолита совместно с микроорганизмами составило 8 % и 6 %, соответственно. По отношению к контролю содержание остаточной нефти в воде данных вариантов снизилось, соответственно, на 12,4 % и 10,5 % (табл. 1).

Данные ИК-спектрометрического определения концентрации растворенных нефтепродуктов в воде в целом соответствуют показателям интенсивности биодegradации нефтяной пленки в вариантах опыта. Количество растворенных в воде нефтепродуктов вполне логично находится в обратной зависимости от содержания остаточной нефти на водной поверхности. При этом минимальное содержание растворенных нефтепродуктов в воде контрольного варианта обусловлено минимальной степенью окисления нефтяной пленки в данном варианте (табл. 2).

Наибольшее содержание растворенных в воде нефтепродуктов было отмечено в вариантах с применением мелкой фракции цеолита. При этом адсорбция бактериальной культуры *Pseudomonas putida* на поверхности цеолита обеих исследованных фракций привела к увеличению концентрации растворенных в воде нефтепродуктов в результате усиления в данных вариантах опыта интенсивности микробной биодegradации нефтяной пленки на поверхности воды.

Данные микробиологического анализа воды показали, что во всех вариантах опыта на всем протяжении периода наблюдений численность УОМ была заметно выше, чем в контроле (рис. 1). Повторное внесение минеральных удобрений спустя 1,5 месяца после начала опыта не обеспечило дополнительной вспышки численности УОМ, однако способствовало поддержанию плотности попу-

**Таблица 2**

Средние значения концентраций растворенных нефтепродуктов в воде

№ пробы	Вариант опыта	Концентрация нефтепродуктов, мг/л
1	Контроль – нефть	6,40 ± 1,53
2	Нефть + минеральные удобрения = Фон	22,06 ± 5,50
3	Фон + цеолит (мелкая фракция)	91,41 ± 9,14*
4	Фон + цеолит (мелкая фракция) + <i>Ps. putida</i>	110,15 ± 11,01*
5	Фон + цеолит (средняя фракция)	88,37 ± 8,84*
6	Фон + цеолит (средняя фракция) + <i>Ps. putida</i>	86,03 ± 8,60*
7	Фон + <i>Ps. putida</i>	10,31 ± 2,47*



Рис. 1. Динамика численности углеводородокисляющих микроорганизмов в вариантах модельного опыта.

**Таблица 3**

Глубина деградации остаточной нефти в соответствии со спектральными коэффициентами

№ пробы	Вариант опыта	$C_1 = 1603/723$	$C_2 = 1702/1460$	$C_3 = 1377/1460$
1	Контроль – нефть	0,734884	0,056594	0,546735
2	Нефть + минеральные удобрения = Фон	0,713559	0,051355	0,553495
3	Фон + цеолит (мелкая фракция)	0,862069	0,053750	0,550000
4	Фон + цеолит (мелкая фракция) + <i>Ps. putida</i>	0,850442	0,047821	0,540473
5	Фон + цеолит (средняя фракция)	0,863248	0,060052	0,565722
6	Фон + цеолит (средняя фракция) + <i>Ps. putida</i>	0,822549	0,058583	0,579528
7	Фон + <i>Ps. putida</i>	0,752500	0,055128	0,568376
	Нефть исходная	0,632203	0	0,520420

ляции нефтеокисляющих микроорганизмов на довольно высоком уровне. Во всех вариантах с применением цеолита, независимо от использованной фракции, численность УОМ оставалась максимально высокой вплоть до окончания периода наблюдений.

Согласно данным, представленным на рисунке, адгезия клеток *Pseudomonas putida* на цеолите как мелкой, так и средней фракций обеспечила существенное протекторное воздействие на микроорганизмы. Это выразилось как в увеличении абсолютных показателей плотности бактериальной культуры в данных вариантах, так и в более длительном сохранении этих высоких показателей на всем протяжении периода наблюдений. Примечательно, что в отличие от вариантов с применением бактерий на цеолите, в варианте с использованием жидкой бактериальной культуры численность нефтедеструкторов резко сократилась уже к концу второго месяца опыта.

Для более детального анализа характера биодеградации углеводородов в образцах остаточной нефти были рассчитаны спектральные коэффициенты. В соответствии со спектральным коэффициентом  $C_1$ , характеризующим соотношение ароматических и алифатических углеводородов, наибольшей степенью окисления углеводородов алифатического ряда отличаются все варианты с применением цеолита (табл. 3). При этом в фоновом варианте внесение только минеральных удобрений на соотношении ароматических и алифатических углеводородов сказалось незначительно. Использование *Pseudomonas putida* без цеолита также оказало весьма слабое влияние на данный коэффициент (табл. 3).

Коэффициент  $C_2$ , отражающий количество кислородсодержащих соединений в углеводородах, возрастает по сравнению с контролем только в вариантах с применением сред-

ней фракции цеолита и уменьшается в варианте с добавлением мелкой фракции цеолита и культуры *Pseudomonas putida* (табл. 3). Снижение количества кислородсодержащих соединений в составе остаточной нефти в вариантах с применением бактерий, по-видимому, объясняется более глубокой степенью биодеградации остаточных углеводородов, в результате чего промежуточные продукты окисления превращаются в высокомолекулярные соединения, либо в конечном итоге в  $CO_2$  и  $H_2O$  [10].

Варианты с цеолитом, а также вариант с применением культуры *Pseudomonas putida* без цеолита отличаются максимальными значениями коэффициента  $C_3$ , отражающего соотношение нафтенов и алифатических углеводородов в остаточной нефти. Этот факт свидетельствует о преобладании нафтеновых углеводородов над парафиновыми, что объясняется большей устойчивостью нафтенов к биодеструкции. Какие-либо четкие закономерности в распределении спектральных коэффициентов  $C_2$  и  $C_3$  в вариантах опыта с применением мелкой фракции цеолита и внесением минерального удобрения не установлены (табл. 3).

### Заключение

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать заключение о том, что использование цеолита способствует заметному ускорению процессов микробной деградации углеводородов нефти в водной среде. При этом эффективность цеолита возрастает при увеличении степени его размола. Применение микробной нефтеокисляющей культуры *Pseudomonas putida* на поверхности цеолита способствует увеличению ее численности в воде и продлевает период активности бактерий.

Однако для снижения в воде концентрации растворенных нефтепродуктов, накапливающихся в процессе биodeградации нефти, перед применением цеолитов и бактериальной культуры необходимо проводить как можно более полный сбор нефти с поверхности воды при помощи различных сорбентов.

### Литература

1. Абросимов А.А. Экология переработки углеводородных систем. М.: Химия, 2002. 608 с.
2. Tereshchenko N.N. Using of zeolites for biological remediation of oil contaminated soil / N.N. Tereshchenko, S.V. Lushnicov, A.B. Bubina // Geomias. 2008. V. 36. № 45. P. 23–26.
3. Терещенко Н.Н. Перспективы комплексного использования цеолита и бактериального препарата для очистки почвенных грунтов и водной поверхности / Н.Н. Терещенко, С.В. Лушников, И.В. Русских, Ю.А. Франк // Материалы Московской международной научно-практической конференции «Биотехнология: экология крупных городов». М.: Изд-во ? 2010. С. 145-146.
4. Suominen L. Evaluation of the Galega-Rhizobium galegae system for the bioremediation of oil-contaminated soil / M.M. Jussila, K. Makelainen, M. Romantschuk, K. Lindstrom // Environmental Pollution, 2000. № 107. P. 239–244.
5. Wolicka D. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-

### Ключевые слова:

очистка воды,  
углеводород-  
окисляющие  
микробные культуры,  
цеолиты,  
нефть  
и нефтепродукты,  
биodeградация

East India / D. Wolicka, A. Suszek, A. Borkowski, A. Bielecka // Bioresource Technology, 2009. V. 100. Iss. 13. P. 3221–3227.

6. Овчинникова А.А. Биodeградация фенантрена и взаимодействие *Pseudomonas putida* BS3701 и *Burkholderia sp.* BS3702 в ризосфере растений / А.А. Овчинникова, А.А. Ветрова, А.Е. Филонов, А.М. Боронин // Микробиология. 2009. Т. 78. № 4. С. 484-490.

7. Roca A. Physiological responses of *Pseudomonas putida* to formaldehyde during detoxification / A. Roca, J.-J. Rodriguez-Herva, E. Duque, J.L. Ramos // Microbial Biotechnology. 2008. V 1. Issue 2. P. 158-169

8. Alejandro R. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes / R. Alejandro, A.R. Gentili, M.A. Cubitto, M. Ferrero, M.S. Rodriguez // International Biodeterioration & Biodegradation, 2006. V.57. Issue. 4. P. 222–228.

9. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в природных и очищенных сточных водах методом колоночной хроматографии со спектрофотометрическим окончанием. ПНД Ф 14.1:2.62-96, М.: Мин-во охраны окружающей среды и природных ресурсов Российской Федерации, 1996. 16 с.

10. Мокрушина Е.В. Особенности распределения битумоидов на поверхности нефтепроявления «Сохочул» / Е.В. Мокрушина, И.В. Русских, Э.М. Омаров // Матер. VI междунар. конф. «Химия нефти и газа», Томск: Изд-во ИОА СО РАН, 2006. Т. 1. С. 135–137.

N.N. Tereshchenko, S.V. Lushnikov, A.D. Pisarchuk

## OIL WATER PURIFICATION BY HYDROCARBON OXIDIZING MICROBIC CULTURES ABSORBED ON ZEOLITES

The effectiveness of middle (1-2 mm) and fine (0.01-0.1 mm) fractions of the zeolite showed a tendency to increase the depth of biodegradation of hydrocarbons in the aquatic environment by using fine

fraction. Absorption of microbic oxidizing culture *Pseudomonas putida* on the zeolites increases the number of microorganisms in water, extend the period of their activity and facilitates water purification from oil products.

**Key words:** the water purification, hydrocarbon oxidizing microbic cultures, zeolites, oil and oil products, biodegradation