

БИОПРЕПАРАТ ДЛЯ ОЧИСТКИ ВОДЫ от нефти и нефтепродуктов

Для очистки воды от нефтезагрязнений разработан биопрепарат на основе нефтеокисляющих микроорганизмов, иммобилизованных на твердом субстрате-носителе. В качестве субстрата применены алюмо-силикатные микросферы (сферозола), плотность которых в 2,5 раза меньше плотности воды. Биопрепарат обладает широким спектром деструкции углеводородов любой структуры (линейной, циклической, ароматической). Препарат разработан для очистки водной поверхности и сточных вод.



Введение

Мощное внедрение нефтедобывающего комплекса оказывает колоссальную техногенную нагрузку на естественные ландшафты нефтяных месторождений. В среднем 3 % добываемой нефти попадает в окружающую среду на этапе добычи и транспортировки, что составляет десятки миллионов тонн [1]. На основе деструктивной активности микроорганизмов разработаны десятки биопрепаратов, в состав которых входит от одного до нескольких штаммов, активно разрушающих углеводороды. Практическая значимость биопрепарата в конечном итоге определяется составом, который обеспечивает деструктивную активность в процессах окисления загрязнителей и характеристикой субстрата-носителя, обеспечивающего экологическую безопасность [2, 3]. Зависимость сорбции микроорганизмов от свойств твердой поверхности адсорбента является наиболее существенным фактором в процессе иммобилизации. Создание биопрепарата на основе субстрата-носителя с плотностью меньше единицы позволяет микробам-деструкторам держаться на водной поверхности и находиться в контакте с загрязняющими углеводородами. Цель настоящей работы – разработка биопрепарата на основе иммобилизованных на сферозоле углеводородокисляющих микро-

Л.И. Сваровская*,

кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник, Учреждение Российской академии наук Институт химии нефти Сибирского отделения РАН

Л.К. Алтунина,

доктор технических наук, профессор, директор, Учреждение Российской академии наук Институт химии нефти Сибирского отделения РАН

организмов для ликвидации последствий аварийных разливов нефти, загрязняющих открытые водоемы.

Материалы и методы исследования

Для создания биопрепарата использовали ассоциацию из 8 углеводородокисляющих штаммов, выделенных из нефти Советского месторождения Западной Сибири: *Bacillus cereus* шт. 245, *Bac. subtilis* шт. 246, *Pseudomonis fluorescens* шт. 247, *Ps. mesentericus* шт. 248, *Ps. denitrificans* шт. 249, *Arthrobacter globiformis* шт. 265, *Streptomyces (Actinomyces) griseus* шт. 257, и *S. glaucus* шт. 258. Определение их филогенетического положения и фенотипической характеристики проведено в Новосибирском ЦКП «Секвенирование». ДНК выделяли при помощи набора «Медиген». Полученные последовательности сравнивали с последовательностями из баз данных *nr Database NCBI*.

Отбор штаммов, утилизирующих углеводороды, проводили путём посева проб нефти на мясо-пептонный агар (МПА). Пробу нефти распределяли тонким слоем по повер-

* Адрес для корреспонденции: sli@ipc.tsc.ru

хности агаровой среды. Штаммы, проявляющие деструктивную активность, формировали вокруг колоний чистое, свободное от нефти пространство.

Способность штаммов к утилизации индивидуальных n-алканов и ароматических углеводов исследовали при их культивировании на минеральной среде Мюнца в парах жидких и твердых углеводов при 25 °С [4]. Положительную реакцию отмечали по формированию осадка и пленки на границе фаз среда – воздух.

Для иммобилизации микроорганизмов в качестве твердого субстрата-носителя использовали сферозолу (алюмо-силикатные микросферы) – отход в составе летучей золы при высокотемпературном сжигании углей на теплоэлектростанциях. Закономерность сорбции микроорганизмов исследовали в статическом и динамическом режимах. Сорбционную характеристику сферозолы определяли традиционным методом [5].

Для приготовления биопрепарата ассоциацию штаммов размножали в ферментере на минеральной среде Раймонда с добавлением 2 % смеси углеводов C₁₂-C₁₆, 0,5 % азотистого минерального субстрата и микроэлементов [6]. Для инокуляции среды взвесь из 8 штаммов готовили в равном соотношении. Поскольку скорость размножения микроорганизмов не одинакова, в процессе накопления биомассы соотношение численности штаммов изменяется. Культивирование микроорганизмов с исходной численностью 8 млн кл/мл проводили в течение 3-5 сут при температуре 25 °С. В период активного роста в среду вносили сферозолу в соотношении сорбент:среда 1:2. Сорбцию проводили при

Ключевые слова:

биодegradация,
нефтеокисляющие
микроорганизмы,
сферозола,
биопрепарат,
нефтяное
загрязнение

активном перемешивании в течение 4 ч, среду отфильтровывали, сорбент с иммобилизованной микрофлорой сушили на воздухе и определяли число микробных клеток на 1 г сорбента.

В высушенном состоянии биопрепарат при перемешивании опрыскивали питательным раствором в составе (масс. %): минеральный субстрат – 8,5-9,5; парафины nC₁₂-nC₁₆ – 6-7; глюкоза – 0,9-1,0. Состав минерального субстрата соответствует составу среды Раймонда. Соотношение массы биопрепарат : питательный раствор – 10:1 [7].

Углеводородокисляющую активность биопрепарата исследовали при внесении в воду, загрязненную нефтью, в концентрации от 5 до 30 г/л. Для загрязнения применяли нефть Советского месторождения Западной Сибири. Плотность нефти – 0,852 г/см³, вязкость при 20 °С – 7,2 мПас. Биопрепарат вносили в концентрации 0,2 г/л жидкой фазы. В процессе биодegradации определяли динамику численности микроорганизмов и накопление альдегидов, как продуктов метаболизма при биодеструкции углеводов нефти [8]. Вес нефти после биодegradации определяли гравиметрическим методом и рассчитывали процент деструкции [9].

Пробы исходной и остаточной нефтей анализировали методами хромато-масс-спектрометрии (NERMAG R10-10a) и газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) на хроматографе «Кристалл-2000» с кварцевой капиллярной колонкой 25 м*0,22 мм со стационарной фазой SE-52. Для хроматографических анализов пробу исходной и биодegradированной нефти очищали от смол и асфальтенов на колонке с окисью алюминия, экстракцию проводили гексаном [9].



Таблица 1

Характеристика сорбентов

Сорбент	Уд. поверхность, м ² /г	Насыпная плотность, г/см ³	Размер частиц, мкм	Уд. объем пор, см ³ /г
Сферозола	150-250	0,4	10-150	0,67-0,70
Силикагель L	600-750	0,8	40-100	0,6-0,75

Результаты и их обсуждения

Объектом исследования служил биопрепарат, разработанный на основе иммобилизованной ассоциации, состоящей из 8 углеводородокисляющих штаммов. При исследовании индивидуальной способности штаммов к утилизации отмечена их высокая активность по отношению к алифатическим (пентан, нонан, гексадекан) и ароматическим углеводородам (бензол, нафталин, фенантрен) с образованием донного и пристеночного осадков и мощных биопленок на границе среда – воздух. В ассоциации они наиболее полно способны к деструкции нефтей и нефтепродуктов, загрязняющих воду. Внедрение сорбционной технологии в различные технологические процессы требует применения сорбентов с высокой поглощающей способностью. В качестве субстрата-носителя для микроорганизмов нами выбрана сферозола, которая обладает совокупностью уникальных свойств: низкая плотность (0,4 г/см³), высокая температура плавления (1200 °С), химическая инертность – что позволило получить на их основе эффективный легкий сыпучий биопрепарат, который не тонет в воде, не загрязняет окружающую среду и характеризуется высокой деструктивной углеводородокисляющей активностью. Поглощающую способность сферозолы по отношению к ассоциации микроорганизмов исследовали в статичес-



ких и динамических условиях. В контрольном эксперименте в качестве сорбента применяли силикагель марки L, близкий по характеристике к сферозоле (табл. 1).

Процессы сорбции с применением сферозолы в статических условиях исследовали при значениях pH среды 3,5, 7,2 и 9,0 и одинаковым исходным числом микроорганизмов во всех вариантах опыта. Максимальная сорбция отмечена для среды с pH 7,2. В кислой и щелочной средах поглощающая способность силикагеля и сферозолы несколько снижается (табл. 2).

Анализируя данные, полученные в статических условиях, можно сделать вывод, что поглощающая способность сферозолы по отношению к микроорганизмам сопоставима с силикагелем. Разница в удельной поверхности сорбентов не приводит к получению ярко выраженной зависимости. Почти одинаковый объем пор твердых носителей определяет их близкий эффект адсорбции. Полученные данные позволили рассчитать величину адгезии (%) и сорбционную емкость 1 г сорбента (табл. 2).

Таблица 2

Процессы сорбции ассоциации микроорганизмов в статических условиях в зависимости от pH среды

Исследуемые показатели	pH 7,2		pH 3,5		pH 9,0	
	сферо-зола	силика-гель	сферо-зола	силика-гель	сферо-зола	силика-гель
Объем микробной взвеси, см ³	20	20	20	20	20	20
Общее число микроорганизмов в исх. взвеси, млн. клет	100	100	100	100	100	100
Вес сорбента, г	2	2	2	2	2	2
Общее число сорбированных клеток, млн. клет.	93,6	94	90,3	91	91,6	92,3
Сорбция клеток на 1 г сорбента, млн. клет./г	46,8	47	45,15	45,5	45,8	46,15
Адгезия микроорганизмов, %	93,6	94	90,3	91	91,6	92,3

Таблица 3

Сорбция микробных клеток рода *Micrococcus* в динамических условиях фильтрации через колонки, заполненные сорбентом

Исследуемые показатели	Исходное число микроорганизмов			
	300 млн. клет.		180 млн. клет.	
	сорбент			
	сферозола	силикагель	сферозола	силикагель
Вес сорбента, г	2,5	2,5	2,5	2,5
Высота сорбента в колонке, см	14,5	16,0	15,0	16,0
Объем микробной взвеси для фильтрации, см ³	10	10	10	10
Скорость фильтрации, мл/мин	0,9	1,4	1,02	1,4
Число микроорганизмов после фильтрации, млн. клет.	7,8	5,9	6,1	4,3
Общее число сорбированных микробных клеток, млн. клет.	292,2	294,1	173,9	175,7
Сорбция микробных клеток на 1 г сорбента, млн. клет./г	116,9	117,6	69,6	70,3
Адгезия микробных клеток, %	97,4	98,0	96,6	97,6

Сорбцию в динамических условиях исследовали при фильтрации микробной взвеси с исходным числом 300 и 180 млн. клеток в объеме взвеси (табл. 3).

Вес сорбента в вариантах опыта одинаков, разница в скорости фильтрации незначительна и зависит от насыпной плотности сорбента. Сорбция микробных клеток на 1 г сорбента зависит от их числа в исходной взвеси. Величина адгезии и удельная сорбция клеток имеют незначительные отличия, несмотря на большую разницу (в 4 раза) удельной поверхности сорбентов (табл. 3). Следовательно, удельная поверхность носителя не является гарантией эффективной адсорбции микроорганизмов.

В 1 г биопрепарата, полученного на основе сферозолы, содержится 2,5109 микробных клеток. Первоначально равное соотношение численности штаммов в процессе создания

Таблица 4

Биодеградация нефти в воде с применением биопрепарата

Концентрация нефти, г/л	Время биодеструкции, сут	Содержание остаточных углеводородов, г/л	Биодеградация нефти, %
5	5	0,15	97
10	10	0,7	93
20	20	1,3	93,5
30	30	2,5	91,7

биопрепарата нарушается, доминируют штаммы *Pseudomonas* (№№ 245, 246) и *Bacillus* (№№ 247-249). Деструктивная активность биопрепарата испытана в модельных экспериментах по очистке загрязненной нефтью воды в различной концентрации. Биодеградация нефти в разных вариантах опыта составила 91,7-97 %, остаточное содер-



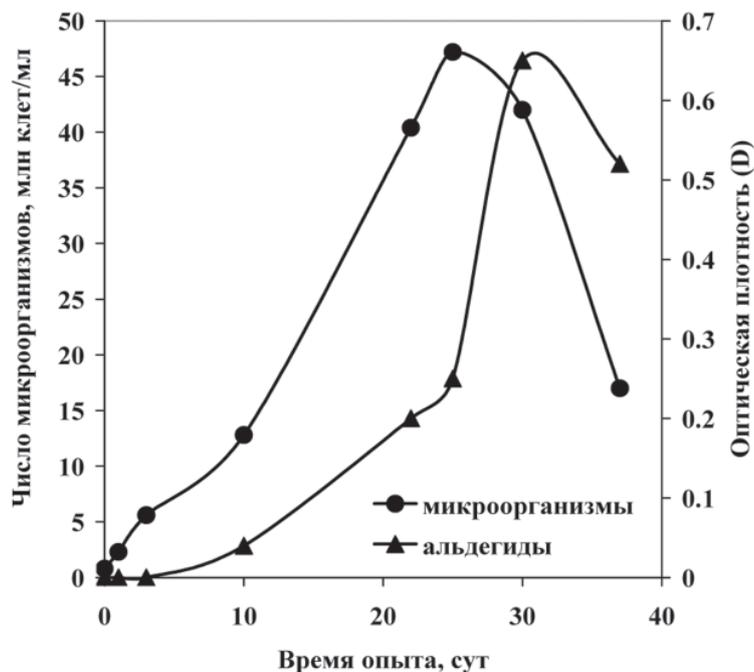
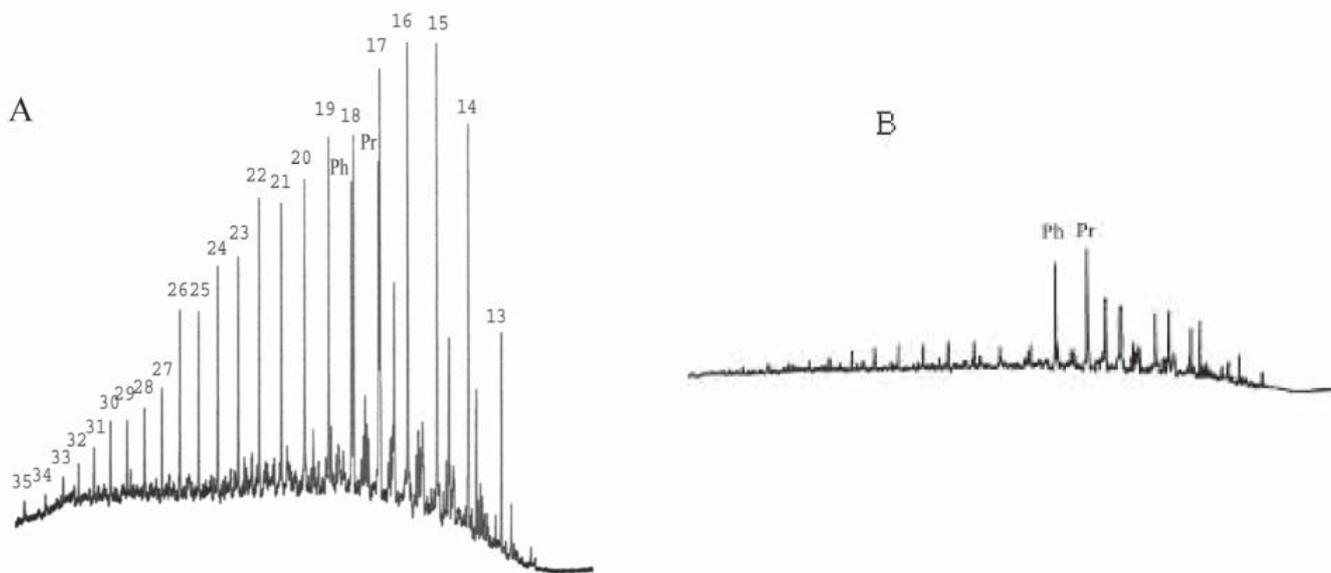


Рис. 1. Динамика накопления альдегидов и численности микроорганизмов при деградации нефтезагрязнения с применением биопрепарата.

жание нефтепродуктов в воде – 0,15-2,5 г/л (табл. 4). Без внесения биопрепарата биодegradация углеводородов нефти за 30 сут не превышала 15 %.

Процессы биодеструкции нефти в жидкой среде сопровождаются накоплением промежуточных продуктов окисления углеводородов. Наиболее устойчивыми из них являются альдегиды. Закономерность динамики накопления альдегидов и численности микроорганизмов представлена на рис. 1. Почти

Рис. 2. Хроматограммы насыщенных ациклических углеводородов нефти, содержащихся до (А) и после (В) биодegradации нефтезагрязнения водной среды.



одновременное максимальное накопление альдегидов и численности микроорганизмов свидетельствует о деструктивной активности биопрепарата.

Хроматографический анализ загрязненной воды до и после биодеструкции показал значительные изменения молекулярно-массового распределения n-алканов и изоалканов, общая деструкция которых составила 99,3 % (рис. 2).

На рис. 2А представлена хроматограмма распределения индивидуальных n-алканов nC_{13} - nC_{35} и изоалканов исходного загрязнения. На рис. 2В – хроматограмма биодegradированной нефти, где на фоне параллельной биодеструкции n-алканов относительная высота пиков изоалканов пристана (Pr) и фитана (Ph) увеличивается. Степень биодеструкции углеводородов, рассчитанная по формуле $(Pr+Ph)/(nC_{17}+nC_{18})$, составила 0,6 и 6,5, соответственно.

Как показал хромато-масс-спектральный анализ биодegradированной нефти, максимальные изменения для ароматических углеводородов отмечены в области алкилнафталинов – деструкция метилнафталинов составила 100 %, диметилнафталинов – 78 % и триметилнафталинов – 52 %. Деструкция фенантронов составила 48 %. Таким образом, результаты модельных экспериментов показали, что применение разработанного биопрепарата, содержащего ассоциацию углеводородокисляющих штаммов, снижает общую концентрацию нефти, загрязняющей воду, на 91,7-97 % в зависимости от степени загрязнения и времени биодеструкции. Степень биодеструкции углеводородов за 30 сут составила 6,5, что свидетельствует о высокой деструктивной активности биопрепарата. Эта величина, рассчитанная по вышеуказанной формуле для исходной

нефти, загрязняющей воду, составляет 0,6. Биопрепарат не имеет аналогов, обладает широким спектром биodeградации углеводов любой структуры (линейной, циклической), что позволяет рекомендовать его для ликвидации аварийных разливов нефти и нефтепродуктов.

Литература

1. Илларионов С.А. Экологические аспекты восстановления нефтезагрязненных почв Екатеринбург: УрОРАН, 2004. 194 с.
2. Сваровская Л.И. Получение наноразмерных частиц SnO_2 и CoFe_2O_4 для очистки воды от микроорганизмов и органических загрязнителей / Л.И. Сваровская, О.Г. Терехова, Д.А. Филатов // Вода: химия и экология. 2010. № 7. С. 36-39.
3. Имобилизованные клетки и ферменты / Под ред. Дж. Вудворда. М.: Мир, 1988. 215 с.
4. Романенко В.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов / В.И Романенко, С.И. Кузнецов // Лабораторное руководство. Л.: Наука, 1974. С. 44-45.

5. Кельцев Н.В. Основы адсорбционной техники. М.: Химия, 1984. 486 с.
6. Розанова Е.П. Угледородоокисляющие бактерии и их активность в нефтяных пластах / Е.П.Розанова, Т.Н. Назина // Микробиология. 1982. Т. 51. № 2. С. 342-348.
7. Пат. № 2361686 РФ / Сваровская Л.И., Писарева С.И., Алтунина Л.К. Биопрепарат для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов // Заявлено 13.08.2007. Опубликовано 20.07.2009. Бюл. № 20.
8. Файгель Ф. Капельный анализ органических веществ. М.: Государственное научно-техническое издательство химической литературы. 1962. 803 с.
9. Другов Ю.С. Экологические анализы при разливе нефти и нефтепродуктов / Ю.С. Другов, А.А. Родин // Практическое руководство М.: Бинوم. Лаборатория знаний. 2007. С. 37-49, 69-75.



L.I. Svarovskaya, L.K. Altunina

OIL WATER PURIFICATION BY BIOLOGICAL PRODUCTS

Biopreparation for water purification based on oil oxidizing microorganisms immobilized on solid substrate carrier has been developed. Alumina silicate microspheres (spherical ash) were used as substrate

carrier, its density being 2,5 times less than density of water. Biological product destruct a wide range of hydrocarbons (linear, cyclic, aromatic). The product is designed for water surface purification and waste water

treatment.

Key words: biodegradation, oil-oxidizing microorganisms, spherical ash, biopreparation, oil pollution

