

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОПТИМИЗИРОВАННОЙ ТЕХНОЛОГИИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПРИРОДНЫХ ОБЪЕКТОВ НА СЕВЕРЕ



РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
КОМИ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ
ЗАО «ЦЕНТР ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ИНИЦИАТИВ «ПРЕСС-ТОРФ»

**Г.М. Тулянкин, И.Б. Арчегова, Ф.М. Хабибуллина,
О.М. Гридин, А.А. Шубаков, А.И. Таскаев,
В.А. Терехова, Ю.С. Жучихин, А.Н. Козьминых**

**ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
ОПТИМИЗИРОВАННОЙ ТЕХНОЛОГИИ
ВОССТАНОВЛЕНИЯ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ
ПРИРОДНЫХ ОБЪЕКТОВ НА СЕВЕРЕ**

Сыктывкар 2007

УДК 504.054:665.61:631.4:556(471.1/.2)

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОПТИМИЗИРОВАННОЙ ТЕХНОЛОГИИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПРИРОДНЫХ ОБЪЕКТОВ НА СЕВЕРЕ. – Сыктывкар, 2007. – 140 с. – (Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук).

Приведены результаты исследования экологически оптимизированной технологии очистки нефтезагрязненных природных объектов с учетом специфики климатических условий Крайнего Севера. Основу новой технологии составляет разработанный авторами прием получения сорбента из растительного сырья и обогащение его штаммами углеводородокисляющих микроорганизмов и их ассоциаций. Полученные биосорбенты испытаны в лабораторных и полевых условиях. Биосорбенты позволяют повысить эффективность биологических приемов процесса восстановления разрушенных, в том числе нефтезагрязненных, природных экосистем. Отмечено, что технология может быть использована в разных географических зонах с учетом конкретных климатических условий.

Издание представляет интерес для экологов, почвоведов, преподавателей вузов, средних специальных учебных заведений биологического профиля.

Ответственные редакторы
к.б.н. *А.И. Таскаев*, д.б.н. *И.Б. Арчегова*

Рецензенты
д.б.н. *В.В. Володин*, д.х.н. *А.П. Карманов*

ISBN 978-5-89606-350-6

© Институт биологии
Коми научного центра УрО РАН, 2007
© ЗАО «Центр экологических инициатив
«Пресс-Торф», 2007

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	
Часть I. Углевородоокисляющие микроорганизмы и изучение их активности на нефтезагрязненных природных объектах	
Глава 1. Методологический подход; краткое описание технических решений получения гидрофобного органо-минерального сорбента «Сорбонафт» (сорбент «К»)	
Глава 2. Подбор микроорганизмов, определение их углевородоокисляющей активности	
2.1. Выделение углевородоокисляющих микроорганизмов, испытание их активности	
2.2. Рост смешанной культуры нефтеокисляющих бактерий и дрожжей в условиях глубинного культивирования на питательной среде с глюкозой	
Глава 3. Определение эффективности штаммов некоторых микроорганизмов в очистке нефтезагрязненного сорбента. Методы контроля	
3.1. Эффективность микроорганизмов в процессе регенерации нефтезагрязненного сорбента	
3.2. Дыхательная и ферментативная активность как интегральные показатели оценки углевородоокисляющей способности микроорганизмов	
3.2.1. Определение дыхательной активности	
3.2.2. Определение ферментативной активности	
3.2.3. Оценка экологической токсичности нефтезагрязненного сорбента после воздействия препаратов – деструкторов нефти	
Глава 4. Утилизация сорбента «Сорбонафт» (сорбент «К») после сорбции нефти. Определение соотношения сорбента «К» и БИАК для стимулирования активности микробных препаратов	

4.1. Эффективность деструкции нефти	
4.2. Анализ динамики количества и состава микроорганизмов	
4.3. Активность выделения CO_2	
4.4. Изменение содержания элементов-биогенов	
Глава 5. Влияние промораживания на эффективность микробных препаратов	
5.1. Изменение содержания нефти в процессе утилизации нефтезагрязненного сорбента	
5.2. Динамика группового состава микроорганизмов в процессе деструкции нефти	
5.3. Характеристика ферментативной активности	
5.4. Активность выделения CO_2 углеводородоокисляющими микроорганизмами	
5.5. Оценка экологической токсичности нефтезагрязненного сорбента	
Часть II. Биосорбенты	
Глава 6. Иммобилизация клеток нефтеокисляющих бактерий и дрожжей	
6.1. Иммобилизация клеток микроорганизмов в форме водной суспензии	
6.2. Иммобилизация мицелиальных грибов и прочность их закрепления	
6.3. Отработка приемов нанесения микроорганизмов и их ассоциаций на поверхность сорбента	
6.4. Изучение роста и развития микроорганизмов, используемых для иммобилизации	
Глава 7. Утилизация нефти в почве с использованием биосорбентов и определение показателя очистки почвы	
Заключение	
Список литературы	
Приложение 1	
Приложение 2	
Приложение 3	

ВВЕДЕНИЕ

Загрязнение нефтью и нефтепродуктами природных объектов в районах нефтедобычи и транспорта нефти является серьезной экологической проблемой.

Нефть и нефтепродукты представляют собой опасные для живых организмов виды загрязнителей природной среды. Сложный состав и токсичность этих веществ обуславливают замедление процессов самоочищения в естественных условиях и создают значительные трудности при очистке природных компонентов – почвы, водоемов и водотоков.

Специфические природно-климатические условия Севера (длительный период с отрицательными температурами воздуха, наличие многолетнемерзлых пород), легко разрушаемые при техногенном воздействии и медленно самовосстанавливающиеся природные экосистемы – все это требует разработки особого методологического подхода к решению экологических проблем на Севере, где со второй половины XX в. ведется интенсивное освоение природных ресурсов – угля, нефти, газа и др.

Необходимо также иметь ввиду особый тип традиционного хозяйствования на Севере, опирающийся на природные экосистемы, а следовательно, прямо зависящий от их состояния.

Экологизация экономики представляет собой осознанную необходимость не только охраны, но и восстановления разрушенных природных экосистем. К настоящему времени природные экосистемы в промышленно развитых странах уничтожены на большей части их территорий, что чревато нарушением биосферного равновесия, поскольку перестает функционировать механизм самовосстановления биосферы (Лосев и др., 2005). Ускорение восстановления экосистем на посттехногенных территориях становится необходимой частью работ по промышленному освоению природных ресурсов.

На основе ранее проводившихся исследований на севере Республики Коми (Усинский, Воркутинский р-ны) в Институте биологии разработана концепция «природовосстановления» и комплекс практических приемов с учетом природно-климатической специфики Севера (Арчегова, 1998; Экологические основы..., 2006).

Очистка нефтезагрязненных природных объектов является частью сложной экологической проблемы восстановления природы.

При использовании биологических приемов для очистки нефтезагрязненных природных объектов имеются два подхода. Суть первого из них – в активизации с помощью органических и минеральных удобрений аборигенной углеводородокисляющей микрофлоры, к которой относятся представители нескольких родов бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов (Коронелли, 1996). Второй подход предполагает введение в среду, загрязненную нефтепродуктами, специально отобраных активных штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов или их комплексов в высоких концентрациях (Ratledge, 1978; Киреева, 1996; Арчегова и др., 1997; Киреева и др., 2000; Киреева и др., 2001). Эффективность данного подхода определяется правильностью подбора микробного комплекса, его соответствием конкретному объекту и природным условиям, в которых он может быть применен. При этом упор делается на создание комплексов микроорганизмов, которые более эффективно окисляют нефтепродукты по сравнению с отдельными штаммами микроорганизмов.

В Институте биологии Коми НЦ УрО РАН более 15 лет ведутся исследования по проблеме нефтеочистки почв и водоемов. Работы проводятся в основном в рамках второго подхода и сосредоточены в Усинском районе, расположенном на севере Республики Коми в северотаежной подзоне, где осуществляется основная промышленная добыча нефти и газа, развита сопутствующая инфраструктура.

В настоящей монографии обобщены результаты исследований, проведенных при финансовой поддержке Международного научно-технического центра (МНТЦ, проект № 2216) Институтом биологии Коми НЦ УрО РАН совместно с ЗАО Центр экологических инициатив «Пресс-Торф» (г. Киров).

В наших исследованиях для сбора нефти использовали сорбент, изготовленный из природного (растительного) материала по оригинальной технологии компанией «Пресс-Торф» (г. Кирово-Чепецк, Кировская обл.). Сорбент «Сорбойл» (торговое название «Сорбонафт») получил мировое признание на Международном экологическом симпозиуме в г. Лас-Вегас (США) «Экологические технологии для возрождения мира» в 1997 г., став победителем конкурса с аналогичным названием.

Принципиальным положением при проведении наших исследований являлся учет специфики природно-климатических условий Севера при подборе микроорганизмов, адаптированных к су-

ровым температурным условиям, в разработке технологии очистки нефтезагрязненных природных объектов.

В ходе проведения исследований на основе гидрофобного сорбента «Сорбонафт» был разработан способ получения биосорбентов путем иммобилизации штаммов активных углеводородокисляющих микроорганизмов, испытанных нами, что позволило предложить оптимизированную технологию очистки нефтезагрязненных компонентов природных экосистем. Был предложен способ регенерации нефтезагрязненного (после сбора нефти) гидрофобного сорбента «Сорбонафт» с целью вовлечения его в природные циклы биологического обмена веществ в восстанавливаемых природных экосистемах, а также возможного повторного использования этого сорбента.

Рассмотренные в монографии приемы, оптимизирующие технологию очистки природных объектов от нефтезагрязнения, могут быть основой для решения экологических проблем не только на Севере, но и в других регионах при адаптации к конкретным природным условиям территории.

Авторы выражают благодарность всем помогавшим в выполнении работ: В.А. Листаровой, О.А. Новожиловой, О.Н. Терехиной, И.Э. Шараповой, И.А. Романовой и Г.Г. Романову за организацию хроматографического анализа определения общей биологической активности в опытных образцах биосорбентов.

Часть I
УГЛЕВОДОДОКИСЛЯЮЩИЕ МИКРООРГАНИЗМЫ
И ИЗУЧЕНИЕ ИХ АКТИВНОСТИ
НА НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПРИРОДНЫХ ОБЪЕКТАХ

Глава 1. МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД;
КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ТЕХНИЧЕСКИХ РЕШЕНИЙ
ПОЛУЧЕНИЯ ГИДРОФОБНОГО
ОРГАНО-МИНЕРАЛЬНОГО СОРБЕНТА «СОРБОНАФТ»
(СОРБЕНТ «К»)

Методологически работа опирается на концепцию двух-этапного процесса природовосстановления. Первый этап – «интенсивный» – предусматривает ускоренное восстановление утраченного биогенно-аккумулятивного слоя с помощью комплекса агротехнических приемов, на что при самовосстановлении затрачивается значительное время. Второй этап – «ассимиляционный» – представляет собой восстановление природной экосистемы, разрушенной при техногенном воздействии, в том числе в результате нефтезагрязнений. Необходимость первого этапа связана с особенностями климатических условий – коротким вегетационным периодом и низким самовосстановительным потенциалом природных экосистем. Очистка нефтезагрязненных земель и водоемов является частью интенсивных приемов первого этапа природовосстановления. Он включает использование сорбентов, микробиологических препаратов, различного рода удобрений, применяемых для восстановления нарушенных экосистем.

Руководствуясь экосистемным подходом и рассматривая поставленные задачи как конкретные приемы решения проблемы восстановления нефтезагрязненных экосистем, в наших исследованиях были широко использованы методы ими-

тационных лабораторных моделей, математического моделирования.

Поскольку в наших исследованиях широко использовали сорбент «Сорбонафт», следует кратко охарактеризовать основные технические решения, связанные с разработкой технологии его изготовления (более детальные сведения содержатся в Приложении 1). Для успешного решения биологических аспектов создания сорбента-носителя для иммобилизованных углеводородокисляющих микроорганизмов необходимо оценить параметры его нефтеемкости и гидрофобности (плавучести). Методом математического моделирования было определено, что наиболее подходящим материалом для получения сорбента-носителя является верховой торф, структура которого отличается большой сложностью. Размеры пор чаще всего колеблются от 0.35 до 8.5 мкм, что позволяет относить верховой торф к мезо-пористым грубодисперсным системам. Эти параметры наиболее подходят для иммобилизации микроорганизмов.

Среди рассмотренных технических приемов максимальным нужным эффектом – увеличением пористости и гидрофобизацией – обладает термолиз. Процесс термической обработки происходит в два (три) этапа: потеря влаги, разрушение функциональных групп, определяющих гидрофильные свойства; на втором (третьем) этапе масса торфа выдерживается без доступа воздуха при температуре от 150 до 300 °С. Полученный методом термолиза сорбент характеризовался высокой нефтеемкостью (до 803% поглощенной нефти) и гидрофобностью (плавучесть сохранялась около 30 суток).

Таким образом, низкотемпературный термолиз растительного (верховой торф) сырья обеспечивает получение сорбента с высоким пористым пространством и гидрофобностью.

На основе этого сорбента были созданы биосорбенты, существенно расширяющие возможности процесса очистки нефтезагрязненных компонентов природных экосистем. Нами рассматриваются биологические аспекты создания и испытания эффективности «Сорбонафта» и полученных на его ос-

нове биосорбентов путем внедрения подобранных нами штаммов микроорганизмов и их ассоциаций, активных деструкторов нефти.

Итак, наиболее перспективным представляется низкотемпературный термолиз сырья, обеспечивающий как увеличение пористого пространства сорбента за счет удаления летучих веществ, так и гидрофобизацию поверхности за счет удаления гидрофильных групп COOH и OH .

Глава 2. ПОДБОР МИКРООРГАНИЗМОВ, ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ

2.1. Выделение углеводородокисляющих микроорганизмов, испытание их активности

Для создания коллекции углеводородокисляющих микроорганизмов (м/о) из нефтезагрязненных почв Усинского нефтяного месторождения отбирали образцы с высоким уровнем загрязнения (35-40%).

Из проб нефтезагрязненных почв были получены накопительные культуры нефтеокисляющих микроорганизмов на синтетической среде следующего состава (г/л): KNO_3 – 4.0; KH_2PO_4 – 0.6; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 1.4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.8; вода водопроводная, рН среды 7.0 (Практикум..., 1976). В колбы со 100 мл жидкой среды указанного состава вносили по 1 мл нефти и среды инокулировали небольшими количествами нефтезагрязненных почв. Накопительные культуры получали на качалке (220 об./мин.) при 24 °С в течение 7 суток. Из накопительных культур выделяли чистые культуры нефтеокисляющих микроорганизмов по методу Коха на агаризованной среде Чапека (Методы..., 1983). Идентификацию грибов проводили по определителям (Литвинов, 1969; Rarey, Thom, 1968; Пидопличко, 1972; Милько, 1974; Ramirez, 1982; Егорова, 1986), бактерий – по Берджи. Всего было выделено 17 культур нефтеокисляющих микроорганизмов, обозначенных нами НК-11, НК-12, НК-13, НК-15 (*Artrobacter sp.*), НК-16 (р. *Rhodococcus*), НК-21, НК-22 (р. *Bacillus*), НК-31, НК-32, НК-33 (р. *Bacterium*), НК-41, НК-51, НК-52, НК-53, НК-54 (р. *Pseudomonas*), НК-61, НК-62 (р. *Acinetobacter*). Культуры поддерживаются на скошенной агаризованной среде Чапека при +4 °С. В дальнейшем коллекция пополнялась микроорганизмами, выделенными из разных нефтезагрязненных объектов, а также штаммами, полученными из коллекции почвенного факультета МГУ (Приложение 2).

Количественное определение степени утилизации нефти в жидкой среде и почвах было проведено с использованием штаммов НК-15 и НК-16.

В жидкой среде после 10 суток культивирования бактерий сырая нефть потребляется на 23-38% (табл. 1). При этом штамм НК-16 утилизирует нефть более активно. Ассоциация культур НК-15 и НК-16 повысила степень биодеструкции нефти за тот же период времени до 41%. С увеличением продолжительности опыта с 10 до 30 суток количество утилизированной нефти на примере культуры НК-15 возросло более чем в два раза. Наблюдаемая после 20 суток приостановка потребления нефти связана, вероятно, с истощением питательной среды, поскольку опыт проводили в непроточных условиях.

В почве испытание активности культур НК-15 и НК-16 проводили в лабораторных условиях на чашках Петри и в колонках высотой 20 см, диаметром 10 см. Использовали для опыта образец из гор. В суглинистой подзолистой почвы, а также образец из хорошо освоенной (огородной) суглинистой почвы.

Образец подзолистой почвы загрязняли товарной нефтью (Усинского месторождения) до концентрации 15.0% и помещали в чашки Петри.

Огородную почву для опыта загрязняли нефтью до концентрации 20%, вносили комплексное минеральное удобрение (N:P:K – 16% каждого компонента) из расчета 0.3 г на 100 г воздушно-сухой почвенной массы. Колонки заполняли

Таблица 1

Биодеструкция нефти в жидких средах культурами НК-15 и НК-16

Культура	Время, сут.	Содержание остаточной нефти, %	Степень нефтепотребления, %
НК-15	10	77.0±2.2	23.0±1.0
НК-16	10	62.0±2.0	38.0±0.8
НК-15 + НК-16	10	59.0	41.0±1.0
НК-15	20	48.0±1.5	52.0±1.4
НК-15	30	48.0±1.6	52.0±1.2

незагрязненной массой почвы, увлажненной до 60% (от полной влагоемкости), а на поверхность наносили слоем 3 см нефтезагрязненную почву. В соответствии со схемой опыта добавляли по 2 г на колонку органическое удобрение.

Культуры нефтеокисляющих бактерий при концентрации $20 \cdot 10^8$ кл./мл вносили в количестве 5 мл, а затем с интервалом в 6 суток – дважды по 2 мл. Эксперимент проводили при температуре 18 °С. Влажность почв поддерживали периодическим поливом дистиллированной водой. Продолжительность опыта составляла 17 суток (чашки Петри) и 20 суток (почвенные колонки).

Результаты опыта в чашках Петри показали, что обе культуры – НК-15 и НК-16 – способствуют деструкции нефти (табл. 2).

За 17 суток в контроле (без добавления микроорганизмов) было утилизировано только 5% нефти. Оба испытанных штамма увеличили степень деструкции в 6-7 раз по сравнению с контролем.

В колонках с нефтезагрязненной окультуренной (огородной) почвой действие микробных препаратов на основе культур НК-15 и НК-16 оценивали на разном фоне (табл. 3).

Таблица 2

Изменение содержания нефти в почве в результате обработки нефтеокисляющими бактериями

Субстрат	Варианты опыта	Продолжительность опыта, сут.	Концентрация нефти в почве, % от всп*		Остаточная концентрация нефти, % от исходного загрязнения	Утилизировано нефти, %
			исходная	к концу опытов		
Подзолистая почва (чашки Петри)	НК-15	17	15.0	9.5	66.4	33.6
	НК-16		15.0	8.8	61.5	38.5
	Контроль (без микроорганизмов)		15.0	14.3	95.0	5.0

* всп – воздушно-сухая почва.

Таблица 3

Изменение содержания нефти в почве колонок в результате обработки нефтеоокисляющими бактериями (слой 0-3 см)

Варианты опыта	Концентрация нефти, % от всп		Остаточная концентрация нефти, % от исходного загрязнения	Утилизировано нефти, % от исходного загрязнения
	исходная	к концу опытов		
1. Контроль (минеральные удобрения)	20.0	7.8	39.0	61.0
2. Минеральные удобрения + НК-15	20.0	5.8	29.0	71.0
3. Минеральные удобрения + НК-16	20.0	6.7	33.5	66.5
4. Минеральные удобрения + органические удобрения + НК-15	20.0	3.9	19.5	80.5
5. Минеральные удобрения + органические удобрения (БИАК*) + НК-16	20.0	5.1	25.5	74.5

* Биологически активный компост (БИАК), изготовленный из гидролизного лигнина биотехнологическим методом (Патент № 2094414).

За 20 суток на фоне органических и минеральных удобрений утилизировано наибольшее количество нефти – 74.5-80.5%. На фоне только минеральных удобрений деструкция нефти теми же культурами составляла 66.5-71.0%. В контрольном варианте утилизация нефти составила 61.0% от исходного загрязнения. При сравнении результатов нельзя не обратить внимание на высокий показатель деструкции нефти в контрольном варианте. Можно полагать, что в исходно биологически активной, обогащенной органическим веществом почве дополнительное внесение минеральных удобрений активизирует аборигенные микроорганизмы, с чем и связан довольно высокий процент утилизации нефти в контроле. Однако и в этой почве обработка биопрепаратами на фоне дополнительного внесения органического вещества спо-

способствовала наибольшему положительному эффекту по сравнению с другими вариантами опыта.

Проведенные опыты показали эффективность обоих штаммов, перспективность дальнейших исследований с их применением. При этом особенно важную роль в активизации деятельности углеводородокисляющих микроорганизмов (не только вносимых с препаратами, но и аборигенных) играет содержание в почве органического вещества.

2.2. Рост смешанной культуры нефтеокисляющих бактерий и дрожжей в условиях глубинного культивирования на питательной среде с глюкозой

Известно, что использование сообщества организмов может оказывать более эффективное и необходимое в разных процессах действие (синергизм), чем отдельный организм. С целью подбора в дальнейших исследованиях эффективных сообществ микроорганизмов проведено изучение совместимости некоторых штаммов при глубинном культивировании на питательной среде с глюкозой.

Для исследования особенностей роста смешанной (совместной) культуры нефтеокисляющих микроорганизмов были использованы два вида бактерий: *Artrobacter sp.* (НК-15), *Rhodococcus erythropolis* (НК-16) и три вида дрожжей: *Pichia guilliermondii* КБП-3205 (НК-303), *Candida guilliermondii* КБП-3175 (НК-301), *C. lipolytica* КБП-3308 (НК-304).

Для получения посевного материала бактерий и дрожжей использовали среду следующего состава (г/л): глюкоза – 10.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1.0, KH_2PO_4 – 3.0, K_2HPO_4 – 7.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; раствор микроэлементов (0.1 мл/100 мл среды): $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.08, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.4, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.8, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.3, H_3BO_3 – 0.06, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.1. Культивирование проводили в колбах при перемешивании (200 об./мин.) с объемом питательной среды 200 мл при комнатной температуре. Исходное значение рН среды составляло 6.0 без дальнейшего регулирования в процессе культивирования.

Для смешанной культуры бактерий и грибов состав питательной среды и условия культивирования были аналогичны. В колбы со средой добавляли аликвоты культуральных бульонов бактерий и дрожжей из расчета, чтобы количество клеток всех пяти культур в начале выращивания было примерно одинаковое. Через 1, 2, 3, 4 и 8 суток были отобраны пробы совместных культур для определения в них веса сухой биомассы, общего числа клеток, а также числа клеток бактерий и дрожжей.

Общее число клеток микроорганизмов подсчитывали с помощью камеры Горяева-Тома. Общее число клеток бактерий и дрожжей также подсчитывали в камере Горяева-Тома, исходя из их разной морфологической формы. Вес сухой биомассы микроорганизмов определяли путем центрифугирования культуральных бульонов в пробирках Эппендорфа (5000 об./мин., в течение 20 мин.) и высушиванием их до постоянного веса при +60° С. Эксперимент был проведен в двух повторностях. Данные по общему количеству клеток и весу сухой биомассы бактерий и дрожжей приведены в табл. 4.

Как видно из данных табл. 4, хорошие ростовые характеристики, судя по весу сухой биомассы, имеют все три вида дрожжей и бактерия *Rhodococcus erythropolis*. Анализ общего количества клеток показывает, что из дрожжей наиболее

Таблица 4

Общее количество клеток и вес сухой биомассы культур нефтеокисляющих бактерий и дрожжей после 7 суток культивирования в жидкой питательной среде с 1% глюкозы

№ п/п	Культура	Общее количество клеток, кл./мл·10 ⁸	Вес сухой биомассы, г/л
1.	<i>Pichia guillemondii</i> КБП-3205 (НК-303)	2.5 ± 0.2	3.9 ± 0.3
2.	<i>Candida guillemondii</i> КБП-3175 (НК-301)	4.6 ± 0.3	4.4 ± 0.1
3.	<i>Candida lipolytica</i> КБП-3308 (НК-304)	7.3 ± 0.8	4.7 ± 0.1
4.	<i>Artrobacter sp.</i> (НК-15)	1.4 ± 0.4	2.7 ± 0.2
5.	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (НК-16)	5.1 ± 0.7	4.5 ± 0.2

активно росли и делились *Candida lipolytica* КБП-3308, из бактерий – *Rhodococcus erythropolis*.

Засев опытных колб для получения смешанной культуры нефтеокисляющих бактерий и дрожжей производили, исходя из общего количества клеток данных микроорганизмов и с расчетом, чтобы количество клеток бактерий и дрожжей в совместной культуре было примерно одного порядка (табл. 5).

Выращивание смешанной культуры нефтеокисляющих бактерий и дрожжей на жидкой питательной среде с 1% глюкозы проводили в течение 8 суток, при этом в исходных пробах, а также в пробах культуральных бульонов через 1, 2, 3, 4 и 8 суток выращивания определяли вес сухой биомассы, общее количество клеток, количество клеток бактерий и дрожжей. Динамика изменения указанных параметров роста в процессе культивирования смешанной культуры бактерий и дрожжей приведена в табл. 6.

Как видно из данных табл. 6, рост смешанной культуры нефтеокисляющих бактерий и дрожжей следует классической S-образной кривой роста микроорганизма в условиях глубинного периодического культивирования. В период активного потребления легкометаболизируемого источника углерода – глюкозы – наблюдается активный рост культуры, что сопровождается (через 2 суток выращивания) резким повышением биомассы и числа клеток соответственно до 3.9 г/л и

Таблица 5

**Исходное общее количество клеток
в смешанной культуре нефтеокисляющих бактерий и дрожжей**

№ п/п	Культуры	Общее количество клеток, кл./мл·10 ⁸
1.	Дрожжи: <i>Pichia guillemondii</i> КБП-3205 (НК-303) <i>Candida guillemondii</i> КБП-3175 (НК-301) <i>C. lipolytica</i> КБП-3308 (НК-304)	0.22 ± 0.1
2.	Бактерии: <i>Artrobacter sp.</i> (НК-15) <i>Rhodococcus erythropolis</i> (НК-16)	0.17 ± 0.1

Таблица 6

**Динамика роста смешанной культуры
нефтеоокисляющих бактерий и дрожжей
на жидкой питательной среде с 1% глюкозы**

Время, сутки	Вес сухой биомассы, г/л	Общее количество клеток, кл./мл·10 ⁸ см	Общее количество клеток, кл./мл·10 ⁸ см (%)	
			дрожжи	бактерии
0	2.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.23 ± 0.1 (56.7)	0.17 ± 0.1 (43.3)
1	3.0 ± 0.1	2.6 ± 0.2	1.0 ± 0.2 (38.6)	1.6 ± 0.2 (61.4)
2	3.9 ± 0.1	5.1 ± 0.6	0.7 ± 0.1 (14.4)	4.4 ± 0.2 (85.6)
3	2.7 ± 0.3	1.7 ± 0.4	0.5 ± 0.3 (27.3)	1.2 ± 0.2 (72.7)
4	2.1 ± 0.4	1.4 ± 0.2	0.4 ± 0.1 (29.9)	1.0 ± 0.1 (70.1)
8	1.6 ± 0.3	0.7 ± 0.1	0.2 ± 0.1 (31.5)	0.5 ± 0.1 (68.5)

5.1·10⁸ кл./мл. Далее, после истощения глюкозы из среды, указанные параметры роста постепенно снижаются и через 4-8 суток культивирования составляют соответственно 2.1-1.6 г/л и 1.4-0.7·10⁸ кл./мл.

Было определено по отдельности количество клеток бактерий и дрожжей в процессе глубинного культивирования на среде с глюкозой. В начале эксперимента количество клеток бактерий и дрожжей составляло соответственно 0.17·10⁸ кл./мл (43.3%) и 0.23·10⁸ кл./мл (56.7%). Через сутки совместного культивирования было обнаружено, что бактерии начинают доминировать над дрожжами и количество клеток бактерий примерно в 1.6 раза превысило количество клеток дрожжей. Указанная закономерность – преимущественное преобладание бактерий над дрожжами – наблюдалась на всем протяжении эксперимента. По-видимому, данный факт может быть объяснен с точки зрения разной скорости деления и почкования указанных микроорганизмов. Как известно, клетки бактерий обычно делятся с гораздо большей скоростью, чем происходит почкование дрожжей.

Таким образом, исследование особенностей роста смешанной культуры нефтеоокисляющих бактерий и дрожжей на жидкой питательной среде с глюкозой показывает, что количество клеток бактерий всегда преобладает над количе-

ством клеток дрожжей. Данная закономерность может сохраняться и при их твердофазном культивировании, например, на нефтезагрязненном сорбенте.

Дальнейшие исследования были направлены на выявление возможности использования штаммов бактерий, дрожжей, микромицетов и их ассоциаций для очистки от нефти сорбента, используемого для сбора нефти с поверхности водных объектов.

Глава 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ШТАММОВ НЕКОТОРЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ОЧИСТКЕ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОГО СОРБЕНТА. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ

3.1. Эффективность микроорганизмов в процессе регенерации нефтезагрязненного сорбента

В проведенном исследовании использовали сорбент, изготовленный из растительного сырья. Сорбент (торговое название «Сорбонафт») получен в процессе стадийной термообработки верхового торфа без доступа кислорода. Более подробные сведения о нем содержатся в главе 1 и Приложении 1.

При сборе нефтяной пленки с водной поверхности сорбентом его необходимо удалять и проводить его регенерацию. Возможны иные способы утилизации загрязненного сорбента.

Ниже рассматриваются результаты опыта по утилизации нефти, поглощенной сорбентом, который для краткости обозначен как сорбент «К». Для деструкции нефти на сорбенте его обрабатывали ранее испытанными микроорганизмами.

В опыте уровень загрязнения сорбента составлял около 25%. Поскольку хорошо известно, что для эффективной работы микроорганизмов необходимо введение веществ-стимуляторов, то к каждому образцу нефтезагрязненного сорбента в начале опыта один раз добавляли 50 г биологически активного компоста – БИАК (патент № 2094414) и 1 г комплексного минерального удобрения (N:P:K – 10:11:11%). Из подготовленной массы отбирали по 100 г для каждого варианта.

Варианты опыта:

1. Контроль (без обработки микробными препаратами).
2. Обработка м/о *Rhodococcus sp.* (НК-16).
3. Обработка м/о *Artrobacter sp.* (НК-15).
4. Обработка м/о *Pseudomonas sp.* (НК-41).
5. Обработка м/о *Gliocladium sp.* (НК-205).

6. Обработка м/о *Gliocladium sp.* (НК-206).

Повторность опыта – трехкратная.

Обработку нефтезагрязненного сорбента культурами микроорганизмов проводили через 5 суток, отбирая перед каждой обработкой пробу для определения остаточной нефти.

Микробиологический анализ проводили в начале опыта (через 10 дней) и в конце «активной» фазы – через 30 суток. Через 30 дней во все варианты опыта были высеяны тест-растения – овес по 7 проросших семян в смешанный (из трех повторностей) образец. Растения были убраны через 24 дня в фазе кущения. В пробах, взятых через 40 дней после уборки растений («пассивный» период), также был проведен микробиологический анализ.

При начальном уровне загрязнения около 25% в течение «активной» фазы опыта (30 суток) при регулярной обработке микробными препаратами все испытанные микроорганизмы были достаточно активны. Содержание нефти по сравнению с началом эксперимента снизилось на 32-48% (рис. 1).

Однако, в целом существенных отличий между вариантами опыта не наблюдается, и к концу «активной» фазы разница с контрольным вариантом заметно уменьшилась.

Рисунок 2 показывает, что во всех вариантах опыта от начала к концу «активной» фазы количество микроорганиз-

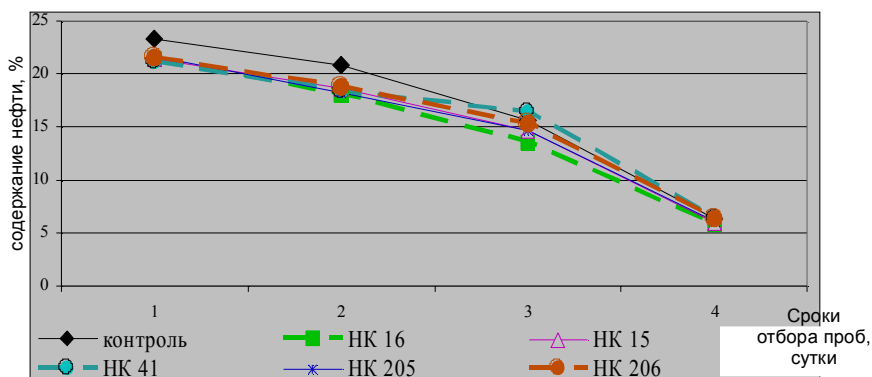
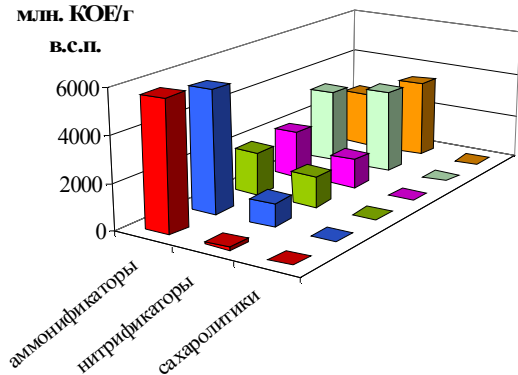


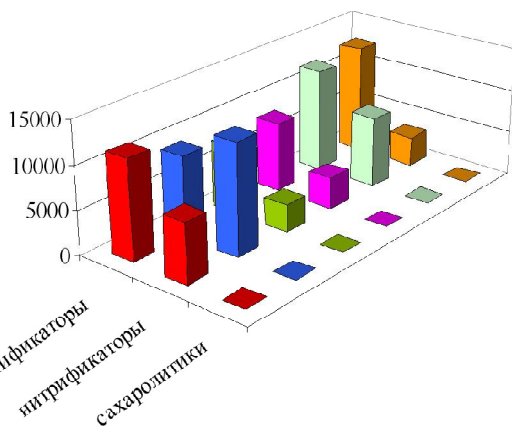
Рис. 1. Изменение содержания нефти в процессе обработки сорбента «К» микробиологическими препаратами.

млн. КОЕ/г

в.с.п.



А



Б

■ контроль

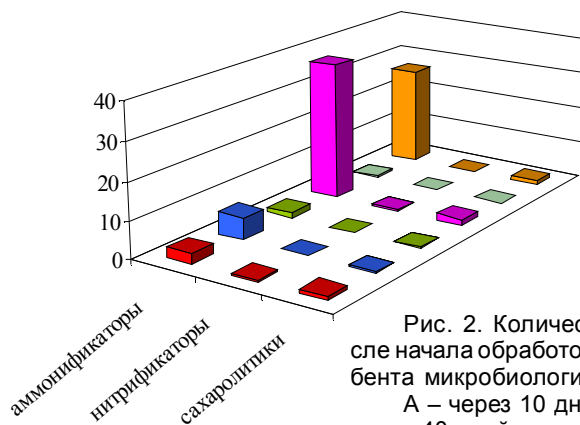
■ НК-16

■ НК-15

■ НК-41

■ НК-205

■ НК-206



В

Рис. 2. Количество микроорганизмов после начала обработок нефтезагрязненного сорбента микробиологическими препаратами.

А – через 10 дней, Б – через 30 дней, В – через 40 дней после уборки растений.

мов в большей части вариантов опыта заметно увеличивалось. Однако отмеченное относится только к микроорганизмам, усваивающим органические (аммонификаторы) и минеральные формы азотсодержащих веществ. Группа сахаролитиков, резко понизившись уже в начале опыта, оставалась незначительной и в конце опыта (рис. 2 В).

Следует отметить, что через 40 суток после уборки растений в почве всех вариантов опыта общее количество м/о резко уменьшалось, при этом все же сравнительной устойчивостью обладали аммонификаторы (варианты с внесением НК-41 и НК-206).

Однако, вместе с этим за период после окончания «активной» фазы и после роста растений содержание остаточной нефти заметно понизилось, что позволяет отнести это на счет воздействия микроорганизмов прикорневой зоны растений, а также, по-видимому, во всех вариантах за счет активизации микроорганизмов, содержавшихся в массе БИАК. Отметим, что БИАК характеризуется довольно высоким количеством м/о (табл. 7), причем преобладают микромицеты, комплекс которых используется в процессе его изготовления из гидролизного лигнина.

Так, весьма показательным изменением является изменение состава микромицетов. На начальном этапе среди микромицетов-доминантов выявлено лишь три вида (рис. 3). Резко выделились наиболее высоким содержанием *Penicillium sp.* варианты 4 и 5.

Таблица 7

Количество микроорганизмов в исходных и экспериментальных субстратах, в тыс. КОЕ*/г субстрата

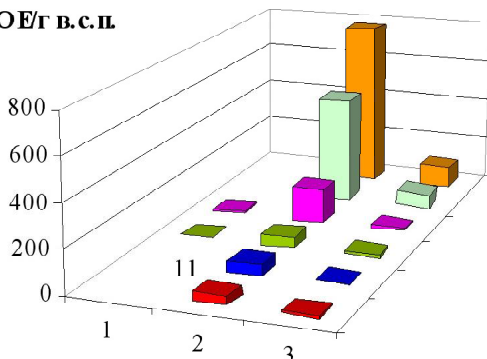
Варианты	МПА**	КАА***	Агар Чапека	Сусло-агар	Агар Гетченсона
Лигнин	300	700	200	192	50
БИАК	12200	30000	2500	1700	7540
Сорбент «К»	1	0	1	2	0

* КОЕ – колониобразующая единица,

** МПА – мясо-пептонный агар,

*** КАА – крахмально-аммиачный агар.

тыс. КОЕ/г в.с.п.



ВИДЫ м/о

- | | | |
|-----------------|------------------|------------------|
| ■ контроль | ■ вариант НК-16 | ■ вариант НК-15 |
| ■ вариант НК-41 | ■ вариант НК-205 | ■ вариант НК-206 |

Рис. 3. Виды микромицетов-доминантов через 10 дней после начала обработок микробиологическим препаратом.

Условные обозначения: 1 – *Mycelia sterilia*, 2 – *Penicillium sp.*, 3 – *Mucor racemosus*.

тыс. КОЕ/г
в.с.п.

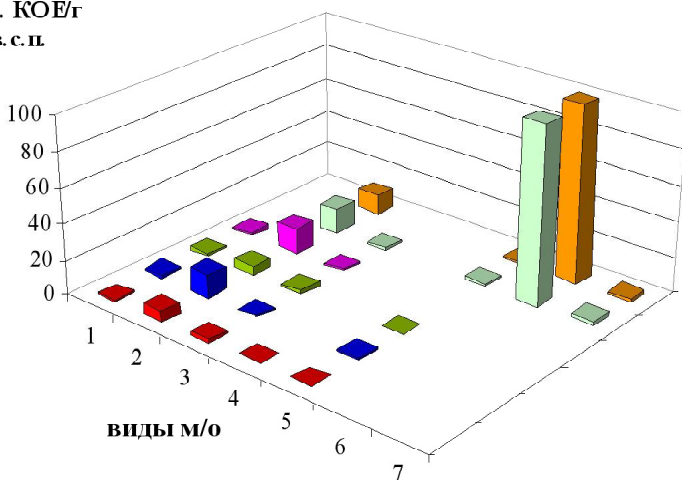


Рис. 4. Виды микромицетов-доминантов через 30 дней после начала обработок микробиологическим препаратом.

Условные обозначения: 1 – *Mycelia sterilia*, 2 – *Penicillium sp.*, 3 – *Mucor racemosus*, 4 – *Paecilomyces sp.*, 5 – *Cladosporium herbarum*, 6 – *Trichoderma sp.*, 7 – *Botrytis sp.* Обозначения вариантов опыта цветом те же, что и на рис. 3.

Разнообразие микромицетов возросло к концу «активной» фазы опыта (рис. 4) до семи видов, при этом пенициллы преобладали почти во всех вариантах, в четвертом и пятом вариантах относительно преобладала триходерма.

Высеянные тест-растения (овес) нормально развивались во всех вариантах, их высота варьировала от 9.5 до 15-16 см (рис. 6, 7). Убранные растения были в фазе начала кущения. Отметим, что корни растений густо пронизывали биомассу субстрата.

Обратимся еще к рис. 1, на котором можно видеть, что через 40 суток после уборки растений анализ показал дальнейшее заметное понижение содержания остаточной нефти практически до половины от того, которое было в загрязненном субстрате до посева растений. Иначе говоря, в течение

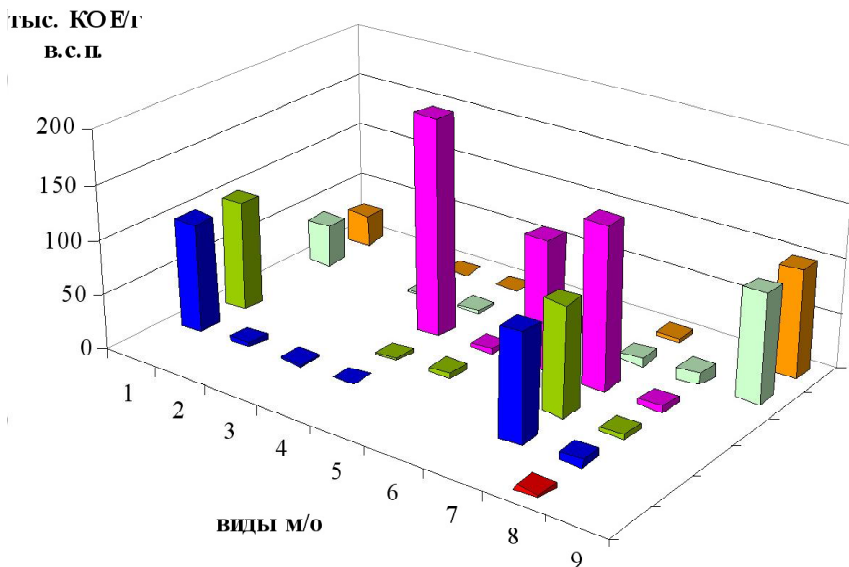


Рис. 5. Виды микромицетов-доминантов через 60 суток после начала обработок микробиологическим препаратом

Условные обозначения: 1 – *Mycelia sterilia*, 2 – *Mortierella humicola*, 3 – *Penicillium fellutanum*, 4 – *P. camemberti*, 5 – *P. albo-aurantium*, 6 – *P. implicatum*, 7 – *Rhinocladium sporotrichoides*, 8 – *Stachybotris lobulata*, 9 – *Trichoderma sp.* Обозначения вариантов опыта цветом те же, что и на рис. 3.



Рис. 6. Состояние растений овса через 24 дня после посева в опыте. Справа – контроль, слева – 4 вариант «НК-16», 7 – «НК-15», 10 – «НК-41».

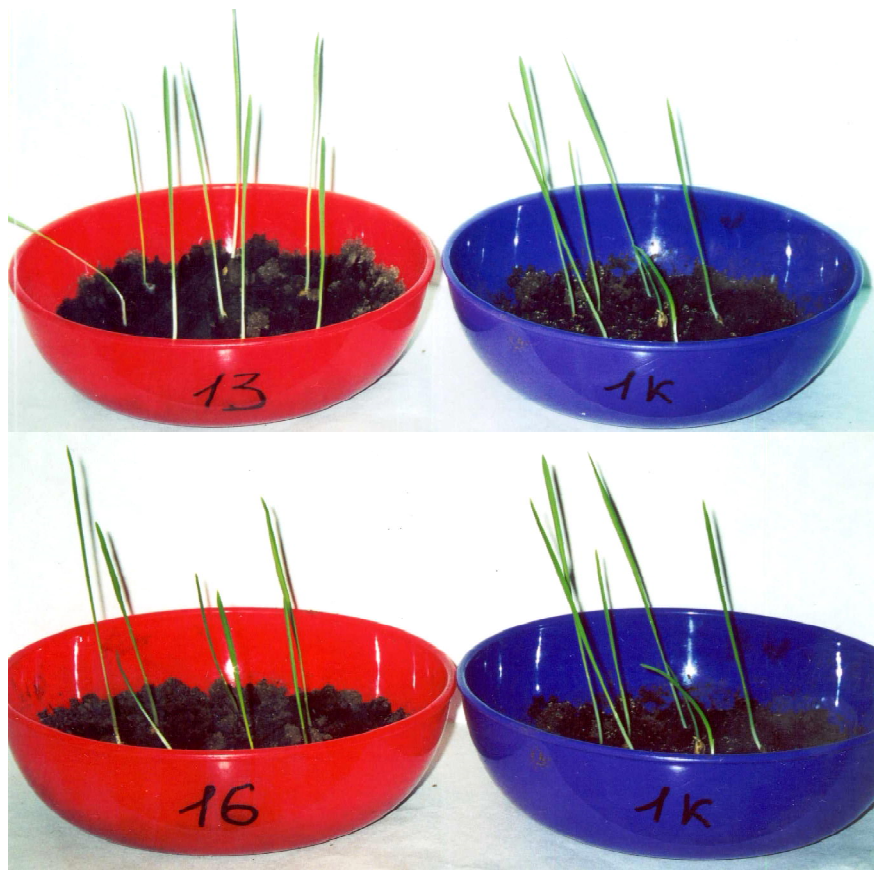


Рис. 7. Состояние растений через 24 дня после посева. Справа – контроль, слева – варианты 13 «НК-205» и 16 «НК-206».

ние роста растений деструкция нефти продолжалась. На рис. 2 видно, как и следовало ожидать, весьма резкое снижение количества микроорганизмов через 40 дней после уборки растений. Видовое же разнообразие (рис. 5) увеличивалось до 9 видов микромицетов-доминантов. При этом обращает на себя внимание *Mycelia sterilia* (белая) и ее относительно большое количество в субстратах, что является показателем уменьшения токсичности массы субстратов.

Таким образом, введение растений в комплекс биологических приемов активизирует разрушение нефти, снижение токсичности нефтезагрязненного субстрата.

Результаты опытов в целом позволяют заключить, что примененный комплекс биологических приемов может быть перспективным при утилизации органо-минерального сорбента после сбора нефти.

Использование штаммов микроорганизмов – активных деструкторов нефти – способствует совместно с насыщенным микрофлорой биологически активным органическим веществом (БИАК) формированию в процессе обработок своеобразного «микробоценоза».

При этом за три месяца опыта нефть была утилизирована на 75-80%.

3.2. Дыхательная и ферментативная активность как интегральные показатели оценки углеводородокисляющей способности микроорганизмов

3.2.1. Определение дыхательной активности

При изучении процесса очистки нефтезагрязненных объектов важно использовать показатели, интегрально характеризующие микробиологическую активность. Такими показателями являются скорость выделения CO_2 (дыхательная активность) и ферментативная активность (Макаров, 1988; Назаров и др., 1992).

Показатель скорости выделения CO_2 использован нами для сравнительной характеристики штаммов – деструкторов нефти НК-15, НК-16, НК-41, НК-205 и НК-206 в рассмотренном выше опыте.

Определяли интенсивность дыхания микроорганизмов в загрязненном нефтью сорбенте, вариантах опыта без растений, присутствии растений овса и через месяц после уборки растений. При этом было важно не только проверить фитотоксичность почвы, но и выявить влияние растений на активность деструкции нефти.

Интенсивность выделения CO_2 определяли на газовом хроматографе «Цвет-800» с использованием катарометра. Газы пропускали через стальную колонку длиной 2 м. Сорбент – «Porapak-N». Температура колонки – 70 °С, испарителя – 80 °С. Образцы субстратов весом по 1 г помещали в стеклянные флаконы объемом 10 мл, закрывали герметично резиновой пробкой на 2 часа при комнатной температуре, при которой определяли исходную концентрацию CO_2 в воздухе. По истечении указанного времени 1 мл газовой смеси вводился шприцем в хроматограф.

Результаты измерений скорости выделения CO_2 в опыте представлены в табл. 8. Как видно из данных табл. 8, испытанные штаммы микроорганизмов в опытных вариантах выделяли больше углекислого газа, чем в контроле. Большими показателями выделились варианты с НК-16 и НК-41.

Особенно существенные различия в активности выделения CO_2 наблюдались в субстратах без растений и с растениями овса. В последнем случае интенсивность «дыхания» увеличилась на один-два порядка. При этом разница по вариантам незначительна. Это можно объяснить деятельностью прикорневых микроорганизмов, а также поступлением корневых экссудатов растений овса в субстрат. Они содержат полисахариды, свободные сахара (глюкозу, фруктозу и др.) (Шумный и др., 1991), что положительно влияет на развитие и дыхательную активность микроорганизмов в субстрате.

Полученные результаты четко согласуются с существенным снижением уровня нефтезагрязнения после «активной» фазы.

Таблица 8
Скорость выделения CO_2
нефтеокисляющими
микроорганизмами
($\text{mg CO}_2/1 \text{ г субстрата/час}$)

Вариант опыта	Нефтезагрязненный сорбент	
	без растений*	с растениями овса**
Контроль	0.00055	0.007
НК 15	0.00066	0.028
НК 16	0.00193	0.035
НК 41	0.00138	0.033
НК-205	0.00064	0.040
НК-206	0.00061	0.032

* В конце «активной» фазы опыта.

** Перед уборкой растений овса после одного месяца выращивания.

Таким образом, скорость выделения CO_2 может быть использована для характеристики процесса микробиологической деструкции нефти в загрязненном субстрате.

Скорость выделения углекислого газа в значительной степени усиливается в присутствии живых растений овса.

3.2.2. Определение ферментативной активности

В том же опыте определяли ферментативную активность (Хазиев, 1976, 1990; Биотехнология..., 1987; Готтшалк, 1982) после обработки нефтезагрязненного сорбента «К» культурами нефтеокисляющих бактерий (*Rhodococcus erythropolis* (НК-16), *Artrobacter sp.* (НК-15), *Bacterium sp. 2* (НК-41) и грибов (*Gliocladium deliquescens* (НК-205), *Gliocladium sp.* (НК-206)).

Через 10 суток во всех вариантах с обработкой культурами микроорганизмов потенциальная активность дегидрогеназы ($\text{АД}_{\text{пот}}$) примерно в 4-8 раз выше, чем в контрольном варианте (без микробальной обработки) (табл. 9). При этом $\text{АД}_{\text{пот}}$ была несколько выше в вариантах с обработкой бактериями (0.50-0.82 мкл H_2 /г субстрата/ч), чем в вариантах с обработкой мицелиальными грибами (0.37-0.45 мкл H_2 /г субстрата/ч). Актуальная активность дегидрогеназы ($\text{АД}_{\text{акт}}$) в вариантах с обработкой бактериями составляла 0.20-0.32 мкл H_2 /г субстрата/ч, в вариантах с обработкой грибами – 0.15-0.27 мкл H_2 /г субстрата/ч.

Таблица 9

Активность дегидрогеназы (АД) в субстратах опыта, мкл H_2 /г субстрата/ч

Вариант	$\text{АД}_{\text{пот}}$	$\text{АД}_{\text{акт}}$
Контроль	0.11	0.23
<i>Rhodococcus erythropolis</i> (НК-16)	0.58	0.20
<i>Artrobacter sp.</i> (НК-15)	0.50	0.25
<i>Bacterium sp. 2</i> (НК-41)	0.82	0.32
<i>Gliocladium deliquescens</i> (НК-205)	0.37	0.27
<i>Gliocladium sp.</i> (НК-206)	0.45	0.15

В целом, по уровню дегидрогеназной активности варианты с обработками нефтезагрязненного сорбента культурами бактерий и мицелиальных грибов между собой существенно не отличались. Одновременно обнаружено, что и по степени нефтепотребления существенных отличий между вариантами не наблюдается, что свидетельствует об углеводородокисляющей активности испытанных штаммов микроорганизмов.

Таким образом, для оценки эффективности воздействия микроорганизмов – деструкторов нефти предпочтительно использовать комплекс показателей.

3.2.3. Оценка экологической токсичности нефтезагрязненного сорбента

после воздействия препаратов – деструкторов нефти

Пока еще на всей территории России действует система контроля природной среды, основанная на нормативах предельно допустимых концентраций (ПДК) загрязняющих веществ (Руссо, 1986). Однако, существующая система химического (аналитического) контроля загрязнения окружающей среды, несмотря на трудоемкость (объем контроля составляет 220 млн. определений в год), не в состоянии гарантировать экологическую надежность природоохранных мероприятий. Постепенно все очевиднее становится ограниченность концепции ПДК, некорректность расширения сферы применения санитарно-гигиенических нормативов на природные экосистемы. Одновременно все более устойчивые позиции в прикладной экологии, в том числе и при разработке природоохранных нормативных документов, занимает биотический подход (Терехова, 1994, 2001, 2003 и др.; Воробейчик, Садыков, Фарафонов, 1994; Yakovlew, 2001), предполагающий широкое использование методов биоиндикации и биотестирования (табл. 10).

Некоторые принципы и область применения биотестирования

Согласно данным Агентства окружающей среды США (EPA), биотестирование осуществляется с использованием 145

**Методы биотестирования,
рекомендованные для государственного экологического контроля в РФ**

Метод биотестирования	Тест-организмы	Критерии токсичности
Определение токсичности воды по жизнедеятельности дафний	<i>Daphnia magna</i>	Смертность 50% за 96 ч (острая токсичность). Достоверное снижение плодотворности за 30 сут. в сравнении с контролем (хроническая токсичность)
Определение токсичности воды по жизнедеятельности церийдафний	<i>Ceriodaphnia affinis</i>	Смертность 50% за 48 ч (острая токсичность). Достоверное снижение плодотворности за 7 сут. в сравнении с контролем (хроническая токсичность)
Определение токсичности воды, почв и донных отложений по ферментативной активности бактерий	Лиофилизированные мутантные бактерии <i>Escherichia coli</i>	Изменение интенсивности окрашивания исследуемой среды
Определение токсичности воды по ингибированию темпов роста водорослей	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i>	Смертность 50% за 96 ч (острая токсичность). Достоверное снижение плодотворности за 30 сут. в сравнении с контролем (хроническая токсичность)
Определение токсичности воды по жизнедеятельности рыб	<i>Rosicilia reticulata</i> или <i>Brachydanio rerio</i>	Изменение численности клеток водорослей за 96 ч экспозиции (острая токсичность). Изменение численности водорослей за 14 сут. (хроническая токсичность)
Определение токсичности воды по хемотаксической реакции инфузورий	Инфузории <i>Paramecium caudatum</i>	Хемотаксическая реакция. Смертность 50% за 1-24 ч (острая токсичность)

тест-объектов по 4650 тестам (Руссо, 1986). Однако далеко не все тесты могут быть применены на практике при оценке экотоксичности нефтяного загрязнения.

В связи с этим актуальной задачей в настоящее время является подбор и апробация методов контроля не только качества территорий, но и отдельных субстратов, сорбентов, подвергшихся загрязнению нефтью и нефтепродуктами, которые дали бы адекватную экологическую оценку загрязненным почвам, очищаемым сорбентам и которыми могли бы, что немаловажно, в дальнейшем воспользоваться соответствующие органы на местах.

Общим правилом для всех методик является оценка надежности тест-культур.

Известно, что живые организмы по разным причинам со временем могут менять свою чувствительность, поэтому обязательной процедурой в лаборатории является контроль тест-объекта с помощью модельного токсиканта (например, бихромата калия). Пригодными для анализа признаются тест-системы лишь в том случае, если концентрация модельного токсиканта, вызывающая 50%-ный эффект за определенное время, не выходит за пределы фиксированного в описании методики диапазона (Методы биотестирования..., 1989). Контроль таких параметров должен проводиться регулярно не реже одного раза в три месяца.

Нами проведена серия экспериментов по выявлению экологической токсичности сорбента «К», обработанного разными микробиологическими препаратами, а также продуктов его трансформации микроорганизмами.

Образцы отобраны на разных этапах модельного эксперимента и переданы в аккредитованную в системе СААЛ лабораторию экотоксикологического анализа почв факультета почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова (ЛЭТАП, зав. лаб. В.А. Терехова). Схема опыта включала обработку нефтезагрязненного сорбента «К» культурами микроорганизмов НК-16, НК-15, НК-41, НК-205, НК-206. Определение токсичности нефтезагрязненного сорбента было проведено после работок его микробными препаратами.

Процедура пробоподготовки высушенных образцов к биотестированию проведена в соответствии с нормативными документами. Экстракция осуществлялась культивационной водой в соотношении 1:10, т.е. как принято при биотестировании химических отходов.

Исследования токсичности препаратов проводились в одной или двух тест-системах в зависимости от результатов предварительного скрининга экстрактов выщелачивания образцов.

Итоговые результаты испытаний представлены в табл. 11.

Экспериментальная оценка экологической опасности представленных образцов (агентов и промежуточных продуктов биовосстановления сорбента нефтепродуктов) проведена по аттестованным методикам биотестирования в аккредитованной лаборатории экотоксикологического анализа почв факультета почвоведения Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова и Экспертно-аналитического Центра по проблемам окружающей среды «ЭКОТЕРРА» (Аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.513050). Испытания проводились в соответствии с «Критериями отнесения опасных отходов к классу опасности для окружающей природной среды» (утвержденными Приказом МПР России от 15 июня 2001 г., № 511).

Обработка смеси токсичного сорбента «К» при среднем (около 25%) уровне начального загрязнения нефтью нетоксичным БИАК и использованными штаммами микроорганизмов за первые 30 суток показала, что токсичность субстрата устраняется не всеми использованными культурами микроорганизмов.

Добавление к токсичному сорбенту «К» нетоксичного БИАК к концу «активной» фазы опыта (контроль) устраняет токсичность полученной смеси. При этом отметим, что исходно в массе БИАК содержатся м/о, которые использовались при его изготовлении, что, несомненно, создает определенный очищающий эффект.

Обработка смеси сорбента при загрязнении нефтью (около 25%) и БИАК монокультурами НК-16, НК-205 и НК-206

за 30 суток инкубации приводит к образованию нетоксичных субстратов, на которых могут активно вегетировать растения овса.

В вариантах опыта с обработкой культурами НК-15 и НК-41 за этот же период полностью токсичность субстратов не устраняется.

Таблица 11

Результаты испытаний экологической токсичности экспериментальных образцов

Образец	Тест-объект	Оценка тестируемой пробы	
		острое токсическое действие, или ЛКР ₅₀	безвредная кратность разведения, БКР ₁₀₋₉₆
Нефтезагрязненный сорбент «К» (без обработки)	<i>Daphnia magna</i> Straus	Токсична	–
	<i>Paramecium caudatum</i> Ehrenberg	Токсична	–
БИАК	<i>Daphnia magna</i> Straus	Не токсична	–
	Опыт		
Контроль	<i>Daphnia magna</i> Straus	Не токсична	–
	<i>Paramecium caudatum</i> Ehrenberg	Не токсична	–
НК-16*	<i>Daphnia magna</i> Straus	Не токсична	–
	<i>Paramecium caudatum</i> Ehrenberg	Не токсична	–
НК-15*	<i>Daphnia magna</i> Straus	Токсична	–
	<i>Paramecium caudatum</i> Ehrenberg	Токсична	–
НК-41*	<i>Daphnia magna</i> Straus	Не токсична	–
	<i>Paramecium caudatum</i> Ehrenberg	Токсична	–
НК-205*	<i>Daphnia magna</i> Straus	Не токсична	–
	<i>Paramecium caudatum</i> Ehrenberg	Не токсична	–
НК-206*	<i>Daphnia magna</i> Straus	Не токсична	–
	<i>Paramecium caudatum</i> Ehrenberg	Не токсична	–

* После «активной» фазы опыта.

**Глава 4. УТИЛИЗАЦИЯ СОРБЕНТА «СОРБОНАФТ»
(СОРБЕНТ «К») ПОСЛЕ СОРБЦИИ НЕФТИ.
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ СОРБЕНТА «К» И БИАК
ДЛЯ СТИМУЛИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ
МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

**4.1. Эффективность деструкции нефти
при разных соотношениях сорбента и БИАК**

Схема опыта

Поскольку сорбент «К» биологически инертен (табл. 12) и гидрофобен, то его регенерация после поглощения нефти требует введения дополнительных приемов, стимулирующих жизнедеятельность микроорганизмов – деструкторов нефти.

Таблица 12

Количество жизнеспособных клеток микроорганизмов

Варианты	Количество м/о, тыс. КОЕ/1 г в.с. массы				
	МПА	КАА	Агар Чапека	Сусло-агар	Агар Гетченсона
БИАК	12200	30000	2500	1700	7540
Сорбент "К"	1	0	1	2	0
Смесь сорбент "К" и БИАК (1:1)	1180	3900	870	1000	не определяли
Смесь сорбент "К" и БИАК (1:0.5)	980	2700	740	600	не определяли

Как показано в гл. 3, обработка сорбента «К» биологически активным материалом (БИАК) обеспечивала довольно активный процесс очистки за счет поступления энергетического материала и питательных веществ, а также дополнительного воздействия его микробного пула, в который входят углеводородокисляющие микроорганизмы. Важно в связи с отмеченным уточнить соотношение сорбента «К» и БИАК в процессе микробной дегградации нефти, поглощенной сорбентом.

Для снижения гидрофобности и повышения уровня биологической активности к загрязненному сорбенту добавляли

биологически активный органический материал БИАК в двух соотношениях – сорбент : БИАК, равных 1 : 1 и 1 : 0.5. Внесение БИАК обеспечивало начальную «биологизацию» сорбента «К». В опыте сорбент «К» был загрязнен до 37% (по результатам анализа). Смесь сорбента с биологически активным органическим материалом (БИАК) характеризовалась снижением начального уровня загрязнения до 23% при соотношении 1 : 1 и до 29% – при соотношении 1 : 0.5 (по данным анализа). В смесь вносили комплексное минеральное удобрение (N : P : K по 10, 10 и 11% соответственно) из расчета по 2.0 г на 100 г смеси.

В эксперименте использовали пять штаммов дрожжей, четыре из которых получены из коллекции кафедры почвенной микробиологии почвенного факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, пятый выделен нами из нефтезагрязненной почвы.

Варианты опыта, соотношение сорбента «К» к БИАК:

Варианты при соотношении сорбент : БИАК 1 : 1	Варианты при соотношении сорбент : БИАК 1 : 0.5
1. Контроль (без внесения дрожжей)	1. Контроль (без внесения дрожжей)
2. <i>Rhodotorula</i> sp. (НК-106)	2. <i>Rhodotorula</i> sp. (НК-106)
3. <i>Yarrowia lipolytica</i> КБП-2873 (НК-305)	3. <i>Yarrowia lipolytica</i> КБП-2873 (НК-305)
4. <i>Pichia guillemondii</i> КБП-3205 (НК-303)	4. <i>Pichia guillemondii</i> КБП-3205 (НК-303)
5. <i>Candida guillemondii</i> КБП-3175 (НК-301)	5. <i>Candida guillemondii</i> КБП-3175 (НК-301)
6. <i>Candida lipolytica</i> КБП-3308 (НК-304)	6. <i>Candida lipolytica</i> КБП-3308 (НК-304)
7. Ассоциация 5 видов дрожжей	7. Ассоциация 5 видов дрожжей

Для опыта культуры дрожжей выращивали на среде состава (г/л): глюкоза – 10.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1.0, KH_2PO_4 – 3.0, K_2HPO_4 – 7.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; раствор микроэлементов (0.1 мл/100 мл среды): $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.08, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.4, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.8, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.3, H_3BO_3 – 0.06, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.1. Куль-

тивирование проводили в колбах с объемом питательной среды 200 мл при комнатной температуре на качалке при 160 об./мин. Исходное значение рН среды составляло 6.0 без дальнейшего регулирования в процессе культивирования. Обработку культурами микроорганизмов проводили через 10 дней, перед обработками отбирали образцы на определение остаточной нефти (весовым способом после экстракции гексаном), на микробиологический анализ, на определение биологической активности с помощью учета выделения CO_2 , на химический анализ. Опыт продолжали в течение 83 суток.

Эффективность деструкции нефти

Как видно из данных табл. 13, через 83 дня обработки культурами дрожжевых грибов степень загрязнения снизилась более чем на 40% от начальной. Так, при загрязнении 23% (соотношение 1 : 1) уменьшение содержания нефти по вариантам в исследуемом объекте составило 42-47%, в контроле – 40%.

В вариантах опыта при меньшем соотношении сорбента к БИАК и большем начальном уровне загрязнения (29%) содержание нефти в утилизируемой смеси колебалось от 34 до 43%, в контроле составило 34%. Сравнение показывает, что больший положительный эффект получен при большей же в смеси доле БИАК. При этом можно отметить, что более эффективными при обоих соотношениях оказались *Pichia guillermondii* (НК-303), *Candida guillermondii* (НК-301). Однако в целом разница между вариантами невелика. Иначе говоря, все испытанные штаммы дрожжевых грибов характеризуются близкой способностью к деструкции нефти.

Достаточно эффективен БИАК без дополнительного внесения микробных препаратов, очевидно, за счет микроорганизмов, вносимых при его изготовлении. Иначе говоря, БИАК сам является «биопрепаратом», точнее субстратом-носителем, обогащенным комплексом микроорганизмов.

Обращаясь к динамике процесса деструкции нефти в загрязненной смеси, можно отметить разную интенсивность процесса за период опыта. На графике (рис. 8) выделяются

две (возможно, три) фазы развития процесса деструкции нефти.

Как следует из данных табл. 13, все испытываемые микроорганизмы характеризуются сходством по способности деградации нефти, их суммарное воздействие немного превышает по активности каждую из культур. В соответствии с

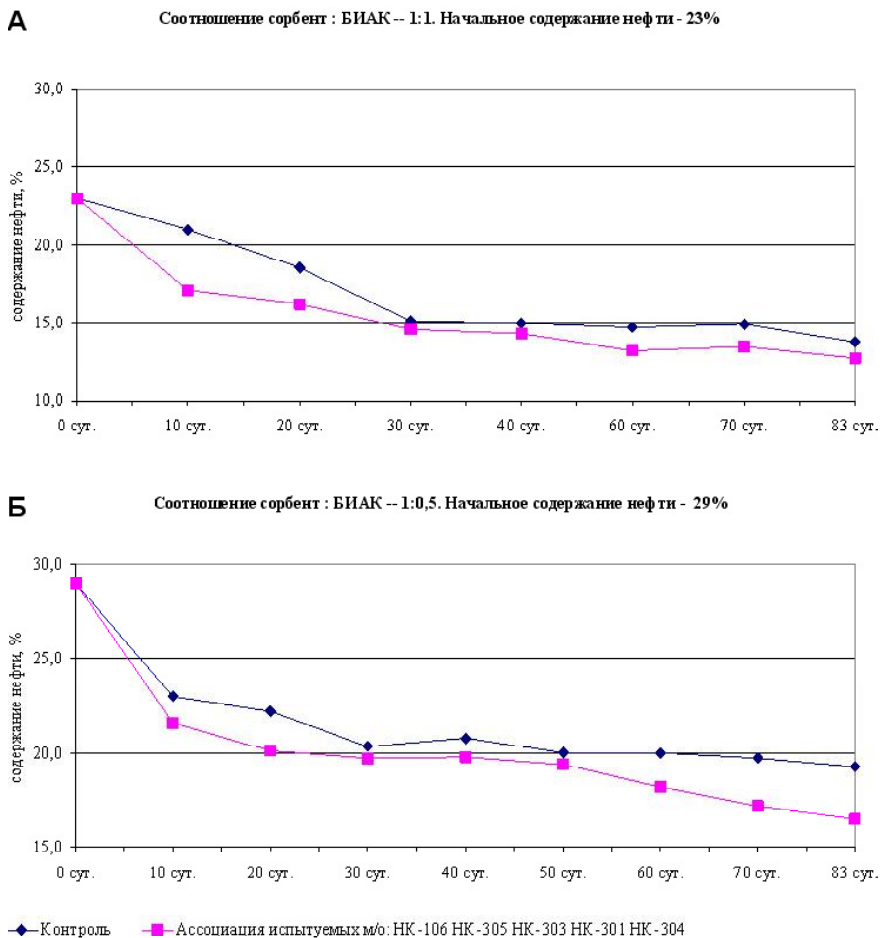


Рис. 8. Изменение содержания нефти в процессе утилизации сорбента дрожжевыми грибами. А – сорбент «К» : БИАК = 1 : 1; Б – сорбент «К» : БИАК = 1 : 0,5.

Изменение содержания нефти в утилизируемом сорбенте «К»

Вариант опыта	10 сут.	20 сут.	30 сут.	40 сут.	50 сут.	60 сут.	70 сут.	83 сут.
Сорбент: БИАК – 1 : 1 начальное содержание нефти – 23%								
Контроль	21.0	18.5	15.1	15.0	15	14.7	14.9	13.75
НК-106	17.0	17.5	15.5	15.0	15.0	14.7	15.0	13.25
НК-305	16.2	16.6	15.0	15.2	15.0	14.2	14.2	13.25
НК-303	16.3	16.0	14.8	14.5	14.0	13.2	13.2	12.25
НК-301	16.6	15.5	15.0	14.5	14.0	13.7	13.7	12.5
НК-304	16.1	16.1	15.3	15.0	15.0	14.7	14.5	12.75
Ассоциация м/о: НК-106, НК-305, НК-303, НК-301, НК-304	17.1	16.2	13.8	14.3		13.2	13.5	12.75
Сорбент: БИАК – 1 : 0.5 начальное содержание нефти – 29%								
Контроль	23.0	22.2	20.0	20.8	20.0	20	19.7	19.25
НК-106	22.0	22.8	21.0	21.5	21.3	20.5	19.7	19.25
НК-305	21.5	22.0	20.0	20.7	20.0	18.5	18.5	16.5
НК-303	21.0	20.1	19.0	20.5	19.0	18.0	17.7	16.75
НК-301	21.0	20.5	20	19.7	19.0	17.7	17.7	16.5
НК-304	21.3	21.2	20.2	20.7	21.0	17.7	18.0	17.5
Ассоциация м/о: НК-106, НК-305, НК-303, НК-301, НК-304	21.6	20.1	19.7	19.8	20	18.2	17.2	16.5

этим, для большей наглядности на графике представлены результаты по контрольному варианту и только варианту «ассоциация м/о». При этом отмечено различие в связи с разным уровнем начального загрязнения.

Наиболее быстрое снижение степени загрязнения происходит в течение начального периода – 20-30 дней. За этот «интенсивный» период доля от общей за весь опыт потери нефти в контроле составила 31-35%, в вариантах с использованием ассоциации дрожжей – 32-39%, при этом меньшая цифра соответствует начальному загрязнению в 29%.

Вторая фаза (от 30 до 60 суток) выделяется большей длительностью и отличается слабой интенсивностью разложения нефтезагрязнения, которое в определяемом количестве обнаруживается после 70 суток опыта. Доля потери нефти, приходящаяся на эту фазу, составляет только 5-11% от всей потери за весь период опыта. В контроле изменения выражены менее заметно.

Известно, что нефть – многокомпонентное вещество. Принимая это во внимание, можно заключить, что первая фаза утилизации нефтезагрязнения связана с деструкцией легкодоступных для микроорганизмов компонентов, нельзя исключить и чисто физические явления, например, улетучивание отдельных соединений. Вторая же фаза связана, видимо, с изменением состава загрязнения, в котором преобладают более устойчивые к разрушению соединения. Изменение состава нефти обуславливает перестройку микробиоценоза, складывавшегося в субстрате (вторая фаза), после чего отмечено вновь некоторое усиление процесса деструкции нефти (к третьей фазе). Отмеченное в значительной мере согласуется с результатами микробиологического анализа.

4.2. Анализ динамики количества и состава микроорганизмов

Пробы отбирали по стандартной методике. Для установления количества различных групп микроорганизмов использовали метод разведения субстрата с последующим высевом

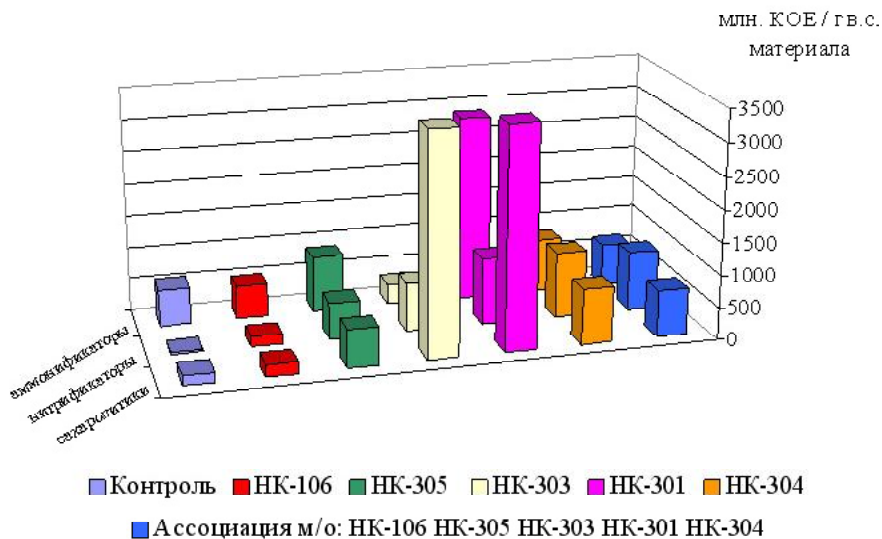
суспензии на питательные среды в трех повторностях (Исмаилов, 1985; Квасников и др., 1973). Микроорганизмы, использующие органический азот (аммонификаторы), учитывали на мясо-пептонном агаре (МПА), минеральный азот (нитрификаторы) – на крахмало-аммиачном агаре (КАА), азотфиксирующие микроорганизмы – на среде Эшби. Дрожжевые и мицелиальные грибы учитывали на средах Чапека и сусла, которые подкисляли до рН 5.0.

На рис. 9-12 видно весьма заметное изменение состава и количества микроорганизмов в ходе опыта. Начальный период опыта характеризуется заметным разнообразием состава, существенным увеличением количества микроорганизмов на 30-е сутки, при этом контроль, 2-й и 3-й варианты по сравнению с другими характеризуются меньшими показателями (рис. 9, 10).

Картина заметно меняется на 40-е сутки – среди групп м/о количественно резко преобладают аммонификаторы (использующие органические азотсодержащие соединения) (рис. 11). В конце опыта можно отметить (рис. 12) возросшее разнообразие при существенно понизившемся количестве микроорганизмов всех физиологических групп. Контроль, как и ранее, отличался меньшими показателями, а большими – варианты с внесением *Yarrowia lipolytica*, *Candida guilliermondii*, *Candida lipolytica* и вариант с ассоциацией всех испытывавшихся дрожжей. При более высоком начальном загрязнении (29%) большими показателями выделились варианты с внесением *Yarrowia lipolytica* и *Candida guilliermondii*, а также ассоциации дрожжей.

Определение общей биологической активности по выделению CO_2 согласуется, в целом, с динамикой микробного состава и количеством микроорганизмов, отмеченными выше.

Начальное загрязнение 23%



Начальное загрязнение 29%

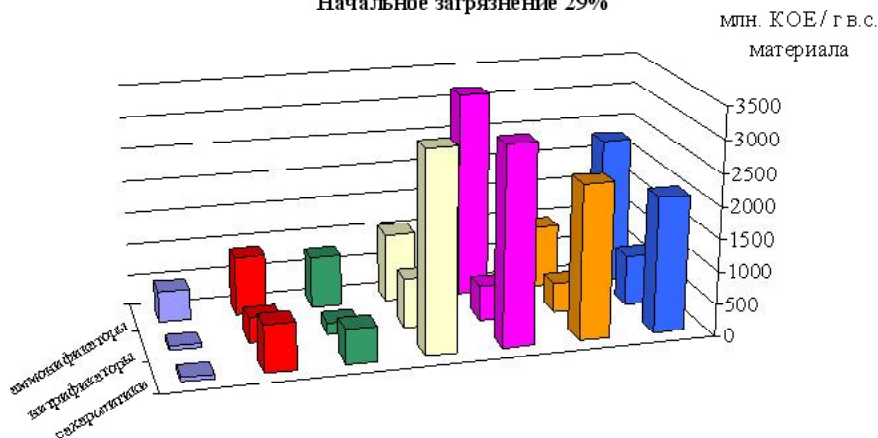
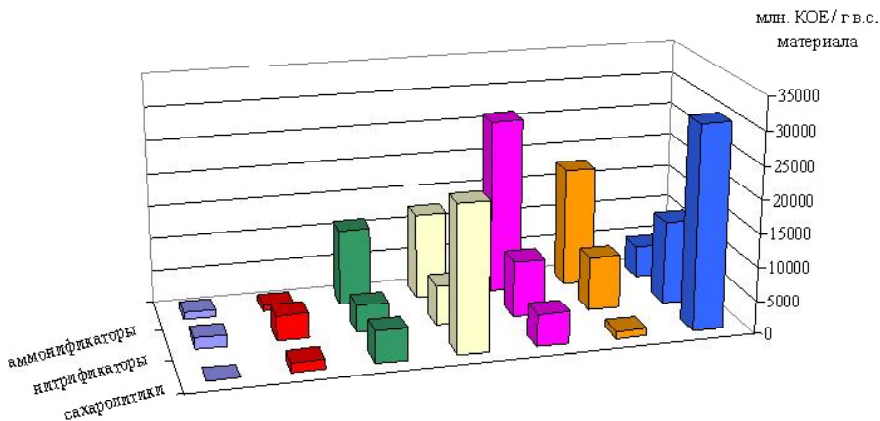


Рис. 9. Количество и состав микроорганизмов по вариантам опыта через 10 дней после начала обработок микробиологическими препаратами.

Начальное загрязнение 23%



Начальное загрязнение 29%

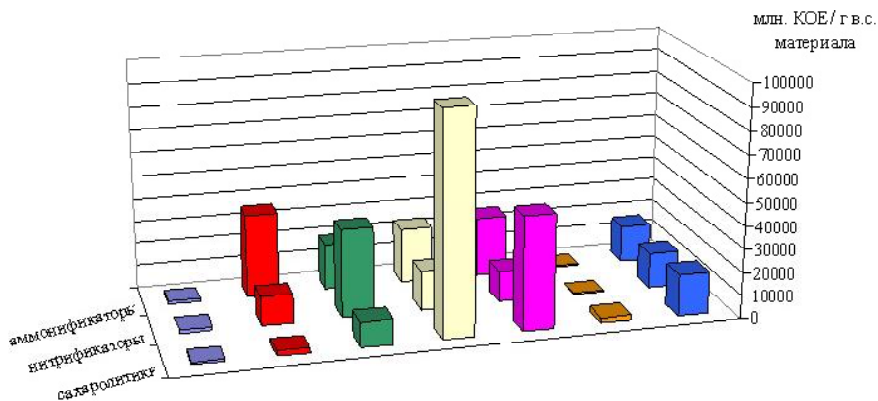
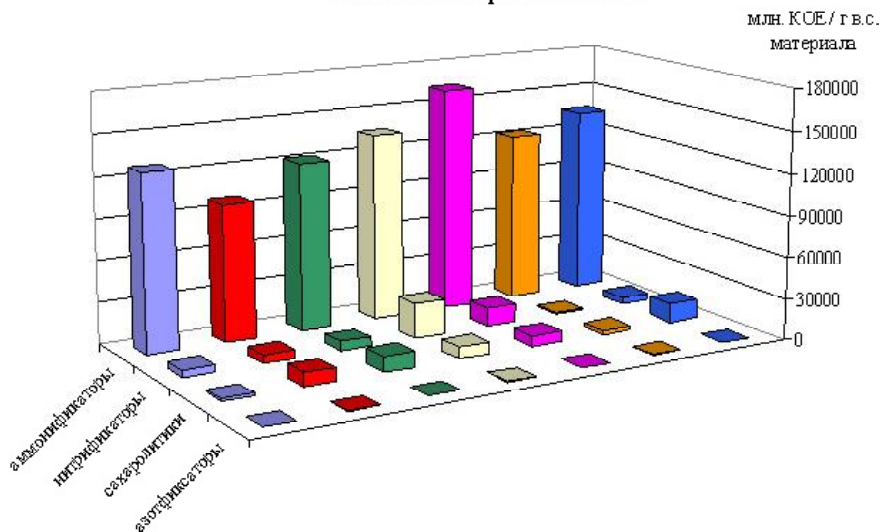


Рис. 10. Количество и состав микроорганизмов по вариантам опыта через 30 дней после начала обработок микробиологическими препаратами. Обозначения вариантов опыта цветом те же, что и на рис. 9.

Начальное загрязнение 23%



Начальное загрязнение 29%

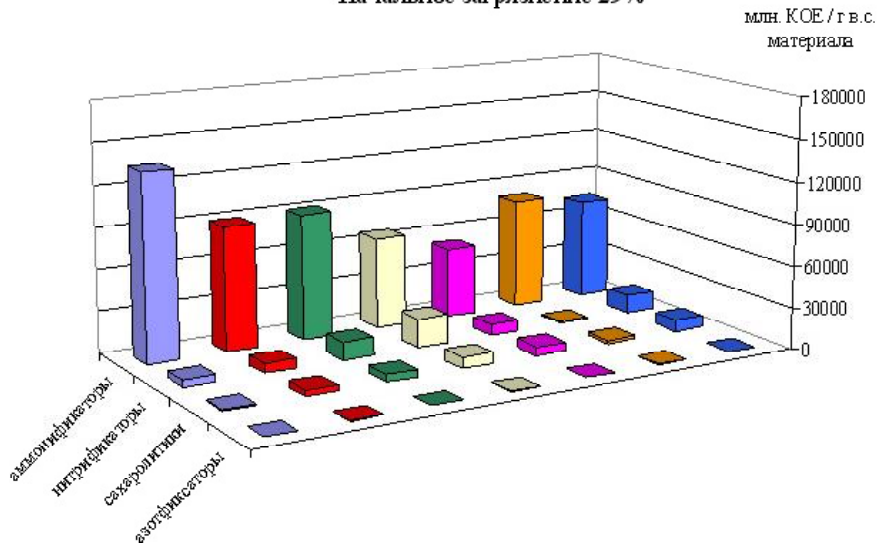
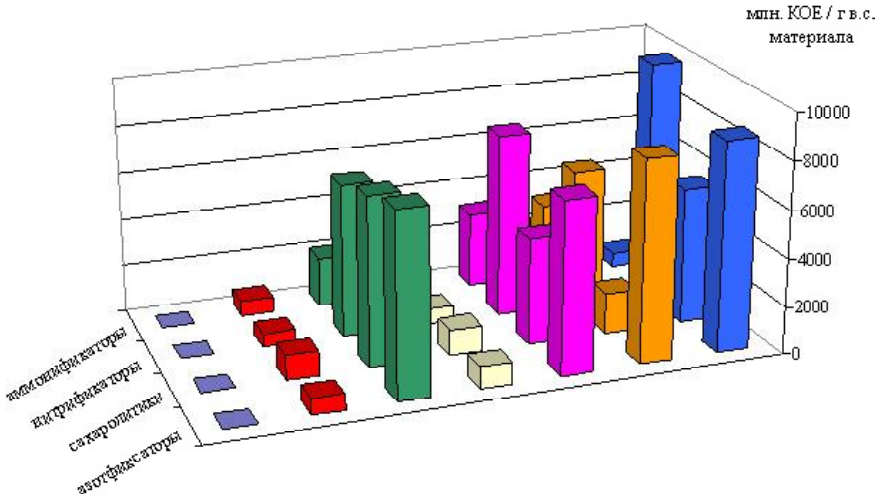


Рис. 11. Количество и состав микроорганизмов по вариантам опыта через 40 дней после начала обработок микробиологическими препаратами. Обозначения вариантов опыта цветом те же, что и на рис. 9.

Начальное загрязнение 23%



Начальное загрязнение 29%

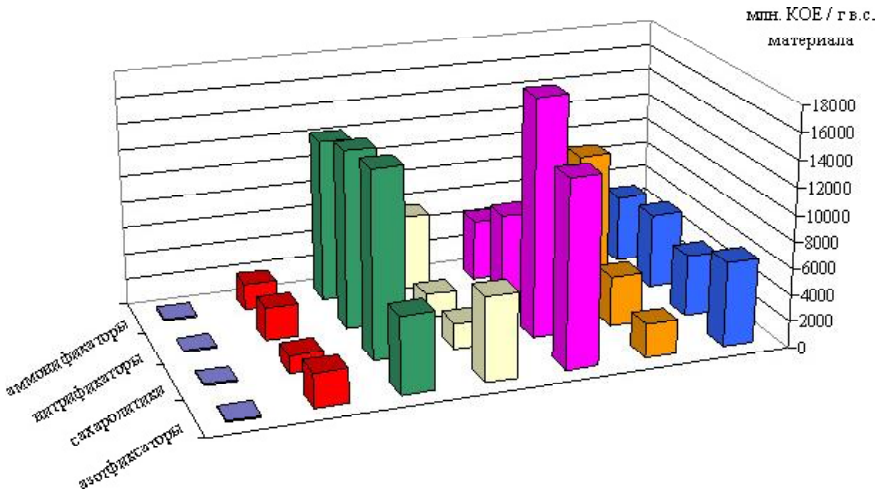


Рис. 12. Количество и состав микроорганизмов по вариантам опыта через 83 дня после начала обработок микробиологическими препаратами. Обозначения вариантов опыта цветом те же, что и на рис. 9.

*4.3. Активность выделения CO₂

Сравнивали активность выделения углекислого газа в динамике у пяти видов дрожжевых грибов и их ассоциации при концентрации нефти 23 и 29%. Анализируя данные, представленные на рис. 13, можно видеть, что активность выделения CO₂ при обеих концентрациях носила сходный характер, и у всех испытуемых микроорганизмов имела два четко выраженных пика – первый, более высокий, – через 20-30 дней после начала опыта и второй – в конце его (на 83-й день) (третья фаза).

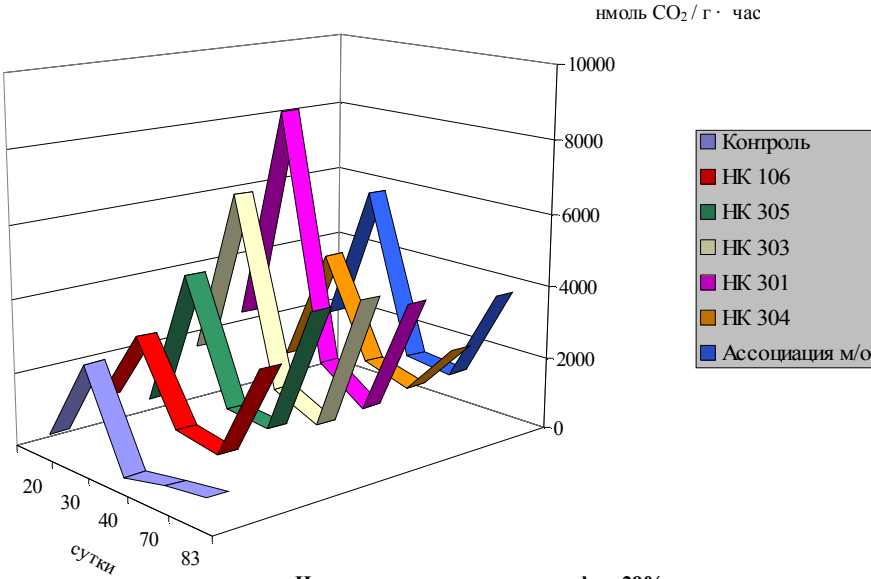
Сравнивая активность «дыхания» исследуемых дрожжей с контрольным вариантом, куда не вносили культуры микроорганизмов, можно отметить, что как при загрязнении 23%, так и 29%, практически все испытуемые штаммы по интенсивности выделения CO₂ превышали контроль (рис. 13).

При этом надо отметить, что при начальном загрязнении 23% среди дрожжей большей активностью выделился штамм НК-301 (*Candida guilliermondii*), близкими к нему были НК-303 (*Candida guilliermondii*) и ассоциация дрожжевых грибов. При загрязнении 29% отличия между дрожжами проявились более заметно. Большой активностью выделилась ассоциация испытанных штаммов, за нею – НК-303. Эти варианты в количественном отношении превышали активность тех же дрожжей при меньшем уровне загрязнения. Контрольный вариант в обоих случаях не различался.

В целом можно отметить, что на начальной фазе деградации нефтезагрязнения штаммы НК-303, НК-301, НК-304 (*Candida lipolytica*) и ассоциация дрожжей характеризовались сравнительно с другими большей активностью. В третьей фазе повышенная активность испытанных дрожжей была присуща их ассоциации, а также НК-303, НК-301 и НК-305 (*Yarrowia lipolytica*) при обоих уровнях загрязнения. Эти результаты согласуются с ранее отмеченным для перестройки микробоценоза.

* При участии Г.Г. Романова.

Начальная концентрация нефти 23%



Начальная концентрация нефти 29%

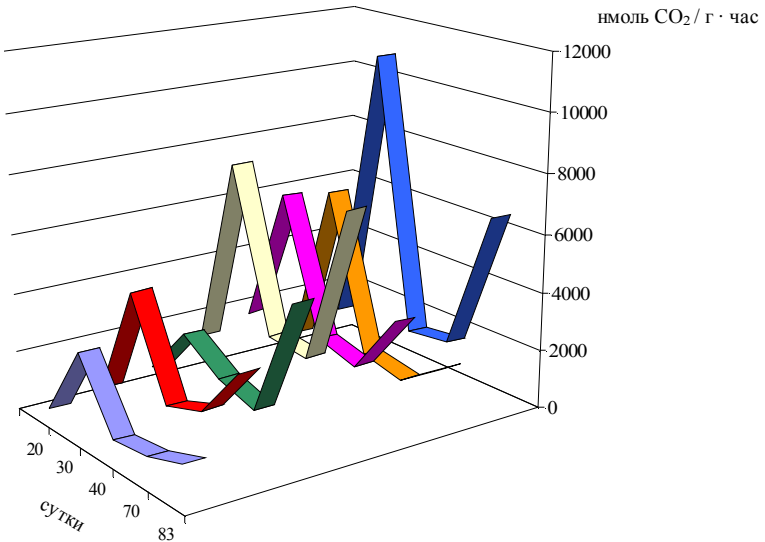


Рис. 13. Активность выделения CO_2 микроорганизмами (нмоль CO_2 /г час) в процессе утилизации нефтезагрязненного субстрата.

Сравнивая штаммы дрожжевых грибов между собой по активности «дыхания», можно отметить, что при загрязнении 23% по данному критерию микроорганизмы располагаются (по степени возрастания выделения углекислого газа) в следующий ряд: НК-106, НК-304, НК-305, НК-303, НК-301. В варианте с ассоциацией микроорганизмов активность выделения CO_2 была близка по значениям к активности «дыхания» НК-303.

При загрязнении 29% по увеличению активности выделения CO_2 испытанные дрожжевые грибы располагаются в следующем порядке – НК-305, НК-106, НК-301, НК-304, НК-303 и ассоциация микроорганизмов из всех перечисленных пяти штаммов дрожжей.

Более высокая концентрация нефти избирательно оказала заметное ингибирующее влияние на активность выделения CO_2 . У *Yarrowia lipolytica* (НК-305) активность не превышала контроля, а у *Candida guilliermondii* (НК-301) – снизилась, по сравнению с загрязнением 23%, более чем в полтора раза.

Можно отметить, что в целом при уровне загрязнения до 29% активны штаммы НК-303 и ассоциация испытанных дрожжевых грибов. В последнем случае, возможно, воздействие определялось синергическим эффектом внутри ассоциации.

Сопоставляя кривые изменения концентрации нефти, численности микроорганизмов и активности «дыхания» последних, можно отметить их определенную взаимосвязь. Численность микроорганизмов изменялась во времени по мере изменения в составе нефти содержания ее компонентов, соответственно изменялась и активность выделения CO_2 . К сожалению, мы не имеем данных о качественном изменении состава нефти в процессе ее деструкции, чтобы увязать с ними динамику численности и состава микроорганизмов.

4.4. Изменение содержания элементов-биогенов

Азот, входя в состав белков живых организмов, является основным элементом, лимитирующим их рост и развитие (Умаров, 1986). Изменения содержания этого элемента в процессе опыта приводится в табл. 14.

Как видно из данных табл. 14, содержание легкогидролизуемого азота во всех вариантах опыта изменялось в значительных пределах. При этом в общем более низкое содержание отмечается при большем уровне загрязнения, т.е. при меньшей доле БИАК в смеси. Можно также отметить, что динамика характеризуется уменьшением содержания азота в конце опыта (83 дня), т.е. в период возобновления активной жизнедеятельности м/о.

Сопоставление этих данных с данными по динамике изменения CO_2 показали, что сильная положительная коррелятивная связь между ними отмечена только в варианте с ассоциацией микроорганизмов (коэффициент корреляции «r» близок к 1), в остальных случаях она выражена слабо.

Если рассматривать данные табл. 14 в целом, то можно отметить увеличение содержания азота после начальной фазы активной жизнедеятельности микроорганизмов, особенно в период 40-70 дней. Иначе говоря, увеличение содержания азота связано со снижением активности его потребления, т.е. со снижением количества м/о. По активности выделения дрожжами CO_2 отмечены два пика – в начале опыта и в конце его, что может свидетельствовать об активном потреблении в качестве энергетического источника легких фракций нефти в начале опыта, а по мере исчерпания их в субстрате, активность всех культур микроорганизмов снижалась. По-видимому, в этот промежуток времени происходила перестройка комплекса микроорганизмов в связи с необходимостью приспособления к изменениям состава нефти. О завершении процесса перестройки микробиоценоза свидетельствует, видимо, второй подъем активности «дыхания» микроорганизмов, отмеченный в конце опыта. Второй пик выделения CO_2 согласуется с увеличением (хотя и слабым) актив-

Содержание легкогидролизуемого азота в нефтезагрязненном субстрате, мг/100 г субстрата

№ обр.	Вариант опыта	Сроки определения				
		30 дней	40 дней	50 дней	70 дней	83 дня
Начальный уровень загрязнения нефтью 23%						
1	Контроль	89.6	93.8	119.5	81.2	42.8
2	НК-106 <i>Rhodotorula sp.</i>	67.2	61.0	59.3	46.2	40.0
3	НК-305 <i>Yarrowia lipolytica</i>	49.6	59.6	64.2	64.4	35.8
4	НК-303 <i>Pichia guillemondii</i>	77.6	43.4	96.0	106.4	40.0
5	НК-301 <i>Candida guillemondii</i>	52.3	109.2	89.2	91.0	44.2
6	НК-304 <i>Candida lipolytica</i>	39.6	45.4	68.7	55.2	42.8
7	Ассоциация м/о	49.6	100.8	110.9	96.6	49.8
Начальный уровень загрязнения нефтью 29%						
8	Контроль	32.8	81.2	66.1	63.0	25.2
9	НК-106 <i>Rhodotorula sp.</i>	69.4	52.1	40.0	36.4	28.8
10	НК-305 <i>Yarrowia lipolytica</i>	48.5	54.6	57.5	32.2	28.8
11	НК-303 <i>Pichia guillemondii</i>	41.1	37.0	73.5	72.8	34.4
12	НК-301 <i>Candida guillemondii</i>	42.9	36.4	73.5	88.7	33.0
13	НК-304 <i>Candida lipolytica</i>	54.5	71.4	57.1	44.2	25.2
14	Ассоциация м/о	62.7	55.2	55.6	72.8	31.3

ной жизнедеятельности микроорганизмов, возрастающим потреблением дрожжевыми грибами азота (варианты с НК-303, НК-301). Особенно ясно динамика содержания азота выражена при загрязнении 23% в варианте «ассоциация м/о». Более высокий уровень загрязнения ингибирует деятельность микроорганизмов, затушевывая отмеченную выше динамику при меньшем начальном загрязнении.

Динамика такого элемента-биогена, как азот, согласуется с активностью микробиологической деятельности, а именно снижение ее характеризуется увеличением содержания азота, а при активизации м/о в конце второй фазы процесса утилизации нефти происходит снижение количества легкогидролизуемого азота.

Полученные данные позволяют сделать еще одно общее заключение – складывающийся под влиянием вносимых микроорганизмов (в том числе с БИАК) микробоценоз наиболее активен на начальном этапе деструкции нефтезагрязнения, и хотя он, перестроившись, приводит к дополнительному снижению содержания нефти, интенсивность процесса становится слабой. Следовательно, для активизации процесса утилизации нефтезагрязненного объекта необходимо внесение после первой фазы других микроорганизмов, эффективных деструкторов более сложных по составу компонентов нефти. Иначе говоря, процесс биологической деструкции нефтезагрязнения – сложный процесс, развивающийся по принципу сукцессии, что характерно для всех групп живых организмов при освоении естественнозарастающих территорий, а также посттехногенных, в том числе нефтезагрязненных объектов.

В связи с выявленным становится ясно, что эффективность процесса биологической очистки нефтезагрязнений связана с созданием ассоциаций микроорганизмов, а также, возможно, с поэтапным внесением компонентов биокомплексов.

Отметим, что содержание легко доступного микроорганизмам фосфора и калия (табл. 15, 16) характеризуется увеличением их к концу опыта, что также может быть связано с периодом низкой эффективности их потребления во вторую фазу опыта.

Содержание калия в нефтезагрязненном субстрате, мг/100 г в.с.п

№ обр.	Вариант опыта	Сроки определения				
		30 дней	40 дней	50 дней	70 дней	83 дня
Начальный уровень загрязнения нефтью 23%						
1	Контроль	301.2	278.6	479.0	219.9	274.13
2	НК-106 <i>Rhodotorula</i> sp.	257.9	272.6	572.3	248.5	387.1
3	НК-305 <i>Yarrowia lipolytica</i>	260.7	301.2	620.0	207.8	533.2
4	НК-303 <i>Pichia guilliermondii</i>	271.1	295.2	266.5	237.9	480.5
5	НК-301 <i>Candida guilliermondii</i>	332.2	272.6	557.2	254.5	366.0
6	НК-304 <i>Candida lipolytica</i>	278.6	307.0	632.0	277.1	290.7
7	Ассоциация м/о	305.3	289.0	632.0	254.5	426.2
Начальный уровень загрязнения нефтью 29%						
8	Контроль	167.5	173.2	323.8	132.5	147.6
9	НК-106 <i>Rhodotorula</i> sp.	179.7	161.1	397.6	162.6	298.2
10	НК-305 <i>Yarrowia lipolytica</i>	244.7	222.9	516.0	179.2	584.4
11	НК-303 <i>Pichia guilliermondii</i>	241.9	216.8	487.9	185.2	593.4
12	НК-301 <i>Candida guilliermondii</i>	238.1	222.9	477.4	207.8	417.2
13	НК-304 <i>Candida lipolytica</i>	208.9	216.8	483.4	213.8	263.6
14	Ассоциация м/о	212.4	222.9	442.7	231.9	429.3

Содержание фосфора в нефтезагрязненном субстрате, мг/100 г в.с.п

№ обр.	Вариант опыта	Сроки определения					
		30 дней	40 дней	50 дней	70 дней	83 дня	
Начальный уровень загрязнения нефтью 23%							
1	Контроль	179.2	199.4	186.6	217.33	203.32	
2	НК-106 <i>Rhodotorula sp.</i>	160.2	187.3	208.4	233.7	313.94	
3	НК-305 <i>Yarrowia lipolytica</i>	208.9	243.8	232.1	255.5	533.62	
4	НК-303 <i>Pichia guillemondii</i>	176.2	216.2	210.3	220.4	504.0	
5	НК-301 <i>Candida guillemondii</i>	172.3	169.8	172.5	232.0	337.3	
6	НК-304 <i>Candida lipolytica</i>	184.5	225.1	217.7	237.6	241.5	
7	Ассоциация м/о	177.8	206.8	204.5	266.4	412.1	
Начальный уровень загрязнения нефтью 29%							
8	Контроль	125.1	125.1	146.4	150.3	112.2	
9	НК-106 <i>Rhodotorula sp.</i>	116.0	116.0	135.5	134.8	183.06	
10	НК-305 <i>Yarrowia lipolytica</i>	122.2	122.2	159.3	175.3	523.5	
11	НК-303 <i>Pichia guillemondii</i>	135.8	135.8	139.4	162.0	570.23	
12	НК-301 <i>Candida guillemondii</i>	129.5	129.5	146.8	179.2	359.9	
13	НК-304 <i>Candida lipolytica</i>	126.1	126.1	167.8	173.7	204.9	
14	Ассоциация м/о	136.3	136.3	135.1	148.4	413.65	

Таким образом, процесс утилизации нефтезагрязненного объекта является сложным, что определяется многокомпонентным составом нефти.

В длительном опыте продолжительностью 83 дня испытывали пять культур дрожжевых грибов при двух уровнях начального загрязнения – 23 и 29%.

Выявлены две фазы по интенсивности снижения степени загрязнения нефтью сорбента «К». При общем снижении содержания нефти на 43-45% от исходного загрязнения более 70% приходится на первую, непродолжительную фазу – 20-30 дней.

Так, первая фаза характеризовалась понижением степени загрязнения на 31-35% в контрольных вариантах и на 32-39% – в вариантах с использованием ассоциации испытанных дрожжей (меньшие цифры относятся к исходному загрязнению 29%).

Вторая фаза, более длительная, отличается слабой интенсивностью деструкции нефти. В контроле и варианте с использованием обработок ассоциацией микроорганизмов, загрязнение дополнительно снизилось на 5-6% при начальном загрязнении 23% в контрольных и опытных вариантах соответственно; при загрязнении 29% снижение в тех же вариантах было на 13 и 11%. По комплексу показателей можно полагать, что более эффективным является соотношение сорбент «К» : БИАК = 1 : 1.

Определение биологической активности (состав и количество микроорганизмов, интенсивность выделения CO_2) выявило нарастание всех показателей в первой фазе и снижение к концу опыта, т.е. во второй фазе.

Сложность процесса деградации нефтезагрязнения обусловлена многокомпонентным составом нефти, отдельные компоненты которой различаются по степени устойчивости к воздействию микроорганизмов.

Для ускорения процесса утилизации исследуемого сорбента, как и других нефтезагрязненных объектов, целесообразно использовать принцип сукцессии, последовательно вводя в загрязненный объект микроорганизмы или их ассо-

циации, способные к активному разрушению разных по устойчивости компонентов нефти. Поиск препарата или ассоциации микроорганизмов универсального типа не является продуктивным.

Принятая продолжительность проведенного опыта близка к периоду повышенной биологической активности на Севере. Результаты исследования позволяют заключить, что в условиях Севера даже при интенсификации процесса деструкции нефти в течение одного теплого сезона возможно снижение уровня загрязнения (даже при средней его степени) примерно на треть от начальной величины загрязнения. Большая продолжительность периода восстановления нефтезагрязненных территорий должна учитываться при экологических расчетах проектируемых объектов по добыче и транспорту топливно-энергетических ресурсов.

Глава 5. ВЛИЯНИЕ ПРОМОРАЖИВАНИЯ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Поскольку регион исследования расположен на Севере, представлялось важным исследовать влияние промораживания на последующие численность и активность углеводород-окисляющих микроорганизмов, используемых в качестве био-препаратов.

Схема и условия проведения эксперимента

Сорбент «К», загрязненный нефтью (19% по весу) смешивали с биологически активным материалом БИАК в соотношении 1:1. Опыт включал варианты:

1. Контроль – смесь сорбента «К» и БИАК без внесения микроорганизмов.

2. Сорбент «К»+БИАК, внесение ассоциации микромицетов (м/м) НК-204 (*Fusarium oxysporum*), НК-205 (*Gliocladium deliquescens*), НК-206 (*Gliocladium deliquescens*).

3. Сорбент «К»+БИАК, внесение ассоциации НК-15 (*Artrobacter sp.*), НК-16 (*Rhodococcus erythropolis*), НК-301 (*Candida guilliermondii* КБП-3175), НК-303 (*Pichia guilliermondii* КБП-3205), НК-304 (*Candida lipolytica* КБП-3308).

Опытные варианты включали три повторности, контроль – две повторности, рассматриваются средние результаты.

Для получения посевного материала культур углеводородокисляющих микроорганизмов (бактерии, дрожжи, микелиальные грибы) использовали среду следующего состава (г/л): глюкоза – 10.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1.0, KH_2PO_4 – 3.0, K_2HPO_4 – 7.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; раствор микроэлементов (0.1 мл/100 мл среды): $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.08, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.4, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.8, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.3, H_3BO_3 – 0.06, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.1. Для стимулирования биосинтеза оксидоредуктаз и для адаптации культур к нефтесодержащим субстратам в колбы добавляли по две капли нефти. Культивирование проводили в колбах при перемешивании с объемом питательной среды 200 мл при комнат-

ной температуре. Исходное значение рН среды для культивирования бактерий составляло 7.0 без дальнейшего регулирования в процессе культивирования, для дрожжей и мицелиальных грибов – 5.0. Продолжительность культивирования составляла 4-7 суток. Для каждой микробиологической обработки субстратов готовился новый, свежий посевной материал.

Обработку микробными препаратами проводили через 20 дней. Данные по объемам посевного материала и соответствующим количествам биомассы (по сухому весу) культур углеводородокисляющих микроорганизмов, вносимых в субстраты вариантов 2-3, приведены в табл. 17. Количество сухой биомассы микроорганизмов определяли весовым методом.

В вариант 2 вносили по 60 мл посевного материала трех видов мицелиальных грибов в равных объемах. В вариант 3 – посевной материал двух видов бактерий и трех видов дрожжей в равных объемах по 10 мл каждого.

Через 90 суток обработки при комнатной температуре все варианты в течение 10 дней были заморожены при температуре минус 10-12 °С. Через 10 суток размораживания (100 суток от начала эксперимента) субстраты были разморожены и сразу после оттаивания в субстратах выполнены соответствующие анализы.

Таблица 17

**Объемы посевного материала
и соответствующие количества биомассы (по сухому весу)
культур углеводородокисляющих микроорганизмов,
вносимых в субстраты**

№ варианта	Даты обработки субстратов									
	15.03		5.04		26.04		17.05		7.06	
	V, мл	Б, мг	V, мл	Б, мг	V, мл	Б, мг	V, мл	Б, мг	V, мл	Б, мг
2	60	140.0±4.0	60	186.0±5.0	60	190.0±5.0	60	34.0±1.6	60	182.0±3.0
3	100	254.0±3.6	100	132.0±2.8	75	112.5±2.4	75	135.0±2.1	50	334.0±2.6

Примечание: V – объем посевного материала, мл. Б – количество биомассы (по сухому весу) во вносимом объеме посевного материала, мг.

Пробы субстратов для определения содержания нефти, химического и микробиологического анализа, определения ферментативной активности отбирали в начале эксперимента и перед каждой обработкой.

Для определения интенсивности микробиологических процессов в опытных вариантах 16 и 26 марта, 5 и 26 апреля, 6 и 27 мая, 17 и 28 июня были проведены микробиологические анализы проб опытных субстратов. Микроорганизмы, использующие органический азот (аммонификаторы), учитывались на мясо-пептонном агаре (МПА), минеральный азот (нитрификаторы) – на крахмало-аммиачном агаре (КАА), азотфиксирующие микроорганизмы и олигонитрофилы – на среде Эшби. Дрожжевые, мицелиальные грибы учитывались на средах Чапека и сусла, которые подкисляли до рН 5.0.

Содержание остаточной нефти в субстратах определяли весовым методом путем экстракции нефтепродуктов гексаном из определенных навесок.

5.1. Изменение содержание нефти в процессе утилизации нефтезагрязненного сорбента

Как видно на рис. 14, деструкция нефти ассоциацией микроорганизмов имеет ясно выраженную динамику. Начальный период (две-три недели) характеризовался понижением загрязнения от начального на 24-29%. В последующие три недели деструкция замедлилась и вновь постепенно возросла к концу опыта до 37% (в контроле) и 43-47% от начального уровня загрязнения в вариантах 2 и 3, причем большей степенью снижения загрязнения выделился 3-й вариант (ассоциация бактерий и дрожжевых грибов). Однако следует заметить, что разница между вариантами 2 и 3 не была существенной, и что добавление БИАК к загрязненному сорбенту «К» способствовало довольно активному процессу очистки за счет микроорганизмов, используемых для трансформации гидролизного лигнина, как это уже отмечено было в гл. 3.4. Введение ассоциации микроорганизмов способствует

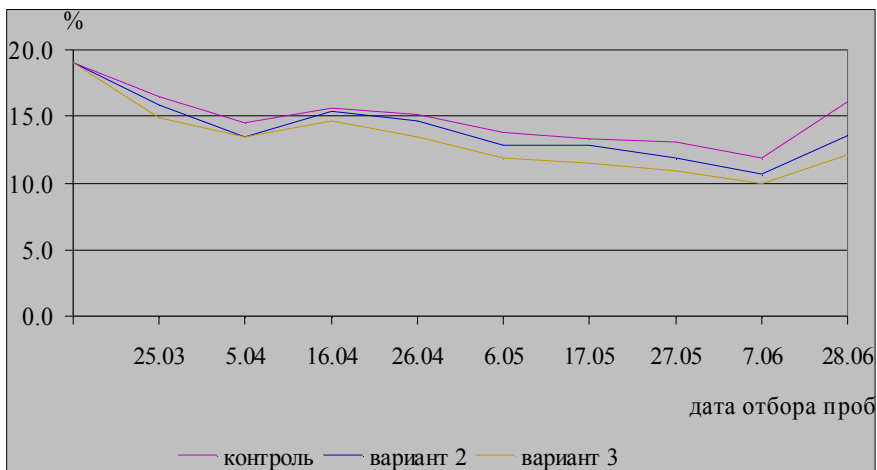


Рис. 14. Динамика содержания нефти в загрязненном сорбенте «К» в процессе микробиологической деструкции нефти до и после промораживания.

усилению разрушения нефтезагрязнения. Итак, результаты длительного опыта показывают, что процесс микробиологической очистки нефтезагрязнения имеет тип сукцессии, связанной с изменением состава такого сложного по составу загрязнителя, как нефть. На начальном этапе разрушаются легкодоступные компоненты, частично уменьшение связано с улетучиванием легких фракций. Некоторое замедление процесса и следующее затем постепенное увеличение его интенсивности связано, видимо, с перестройкой микробиоценоза. На рис. 14 видно, что после промораживания возрастает содержание нефти, экстрагируемой гексаном. По-видимому, часть компонентов нефти, ранее прочно сорбированных, под воздействием промораживания после оттаивания переходит в подвижное состояние, становясь более доступной воздействию микроорганизмов. Об этом позволяет судить микробиологический анализ.

5.2. Динамика группового состава микроорганизмов в процессе деструкции нефти

Результаты микробиологического анализа показали, что общая активность микроорганизмов наиболее резко возрастала именно на начальном этапе процесса очистки загрязненного субстрата (рис. 15), особенно в варианте 3 (бактериально-дрожжевая ассоциация). На втором этапе (26.04) наблюдается резкое снижение во всех вариантах опыта, после чего вновь общая численность микроорганизмов возрастает, особенно в третьем варианте. Сравнивая рис. 14 и 15, можно заметить сходный тип кривых.

Таким образом, снижение содержания остаточной нефти следует за активной жизнедеятельностью м/о. Волнообразный тип динамики общей биологической активности связан с перестройкой микробиоценоза на этапах деструкционной сукцессии (Семенов, 2001). Об этом позволяет судить изменение состава м/о в ходе эксперимента.

В составе основных групп микроорганизмов на этапах сукцессии отмечены изменения. Обращает на себя внимание

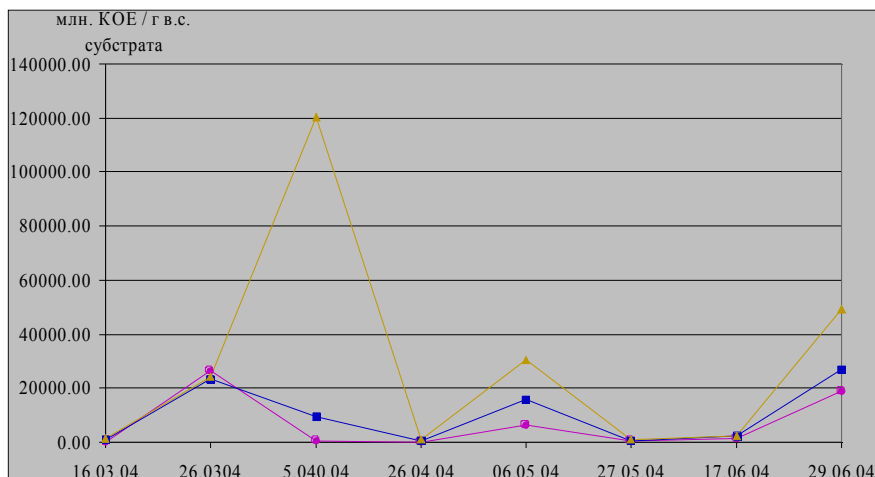


Рис. 15. Изменение общей микробиологической активности в процессе очистки нефтезагрязненного сорбента «К».

Обозначения вариантов опыта цветом те же, что и на рис. 14.

наибольшая активность практически всех определяемых групп микроорганизмов в начале опыта (первый этап).

Сахаролитики (м/о, использующие в качестве источника питания углеводы, легкие фракции нефти) активно развивались только на начальном этапе деструкции нефти (рис. 16), их максимальная активность во всех вариантах опыта, включая контроль, наблюдалась 25 марта и составляла 3-5 млрд. клеток на 1 г субстрата. В последующем микробиологические анализы до промораживания показали резкое снижение их количества, а следовательно, уменьшение их роли в деструкционных процессах. Однако после промораживания наблюдался весьма резкий «всплеск» активности этой группы м/о, причем особенно в варианте с внесением ассоциации микромицетов (вариант 2). Можно полагать, что под влиянием промораживания ранее прочно сорбированные компоненты нефти перешли в более легкоусвояемую форму.

Олигонитрофилы, учтенные на среде Эшби, имели максимальное развитие в те же сроки, что и другие группы микроорганизмов, т.е. в начале опыта. Максимальное их количество в контроле и в варианте с грибами было отмечено 25 марта (7-15 млрд. клеток/1 г субстрата), а в случае применения бактериально-дрожжевой ассоциации – 5 апреля, когда

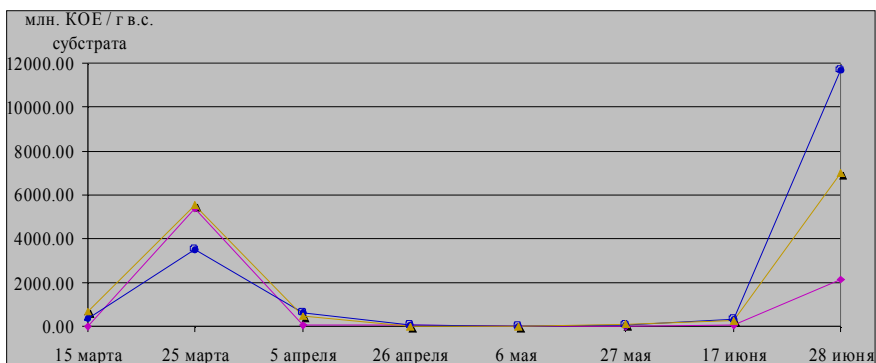


Рис. 16. Изменение активности группы сахаролитиков в процессе микробиологической деструкции нефти в загрязненном сорбенте «К», до и после промораживания

Обозначения вариантов опыта цветом те же, что и на рис. 14.

их количество в 1 г субстрата составляло более 104 млрд. клеток (рис. 17). Резко понизившись после первого этапа очистки загрязненного нефтью сорбента «К», эта группа микроорганизмов оставалась малочисленной и после промораживания.

Иная динамика характеризует содержание двух других групп микроорганизмов. Аммонификаторы (микроорганизмы, использующие органический азот) на начальном этапе опыта представлены значительной численностью, причем наибольшее количество характеризует вариант 3 – 11 млрд. клеток/г субстрата, в контроле количество аммонификаторов составило 5 млрд. КОЕ/г воздушно-сухого субстрата. При сравнении с другими группами микроорганизмов надо отметить существенное преобладание олигонитрофилов как в варианте 3, так и в других именно на начальном этапе опыта.

На втором этапе наблюдается явное преобладание аммонификаторов, тогда как первые две рассмотренные группы имеют небольшую численность. Наибольшее количество аммонификаторов характеризует вариант 2 – с внесением ассоциации микромицетов. Далее (третий этап) количество аммонификаторов во всех вариантах резко снижается, но столь же резко возрастает после промораживания субстрата, осо-

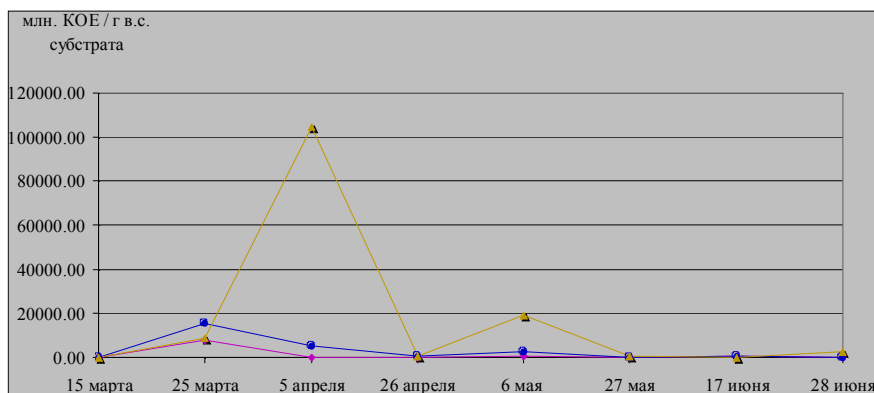


Рис. 17. Динамика содержания олигонитрофилов. Обозначения вариантов опыта цветом те же, что и на рис. 14.

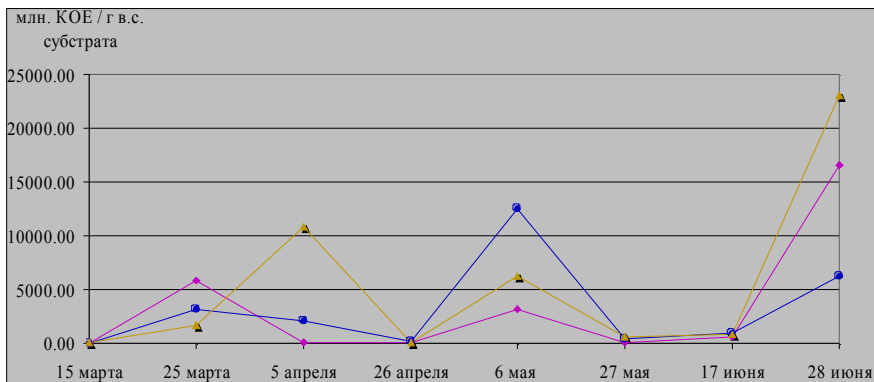


Рис. 18. Динамика содержания группы аммонификаторов до и после промораживания.

Обозначения вариантов опыта цветом те же, что и на рис. 14.

бенно в варианте 3 (ассоциация бактерий и дрожжевых грибов) (рис. 18).

Практически такую же динамику имеет содержание нитрификаторов (м/о, использующих минеральный азот), рис. 19.

Соотношение численности микроорганизмов, учтенных на средах КАА и МПА (нитрификаторы), показывает, что 2-й и 3-й варианты характеризуются активным процессом минерализации в сравнении с контролем. После проморажива-

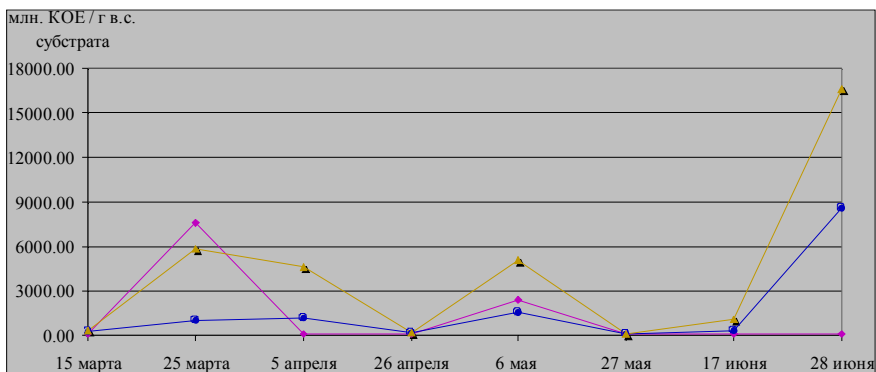


Рис. 19. Изменение содержания нитрификаторов.

Обозначения вариантов опыта цветом те же, что и на рис. 14.

ния увеличение численности микроорганизмов этой группы даже превышает количество их в начале опыта, особенно в третьем варианте, т.е. бактериально-дрожжевой ассоциации.

Таким образом, промораживание сопровождается воздействием на свойства нефти, с чем связано изменение состава м/о, причем, как показывают результаты, возрастает количество тех групп м/о, которые усваивают более доступные соединения (сахаролитики и др.).

5.3. Характеристика ферментативной активности

В опыте была определена актуальная активность дегидрогеназ ($AD_{\text{акт}}$) в субстратах в процессе деструкции нефтезагрязненного сорбента углеводородокисляющими бактериями, дрожжами и мицелиальными грибами (табл. 18, рис. 20). Как следует из полученных данных, активность дегидрогеназы обнаруживается уже в исходных субстратах, смесях нефтезагрязненного сорбента с БИАКом, и составляет 2.0-2.1 мкл H_2 /г субстрата/ч. Определенный уровень ферментативной активности в субстратах объясняется, очевидно, наличием в них биологически активного, богатого микрофлорой компоста. Исходные субстраты в вариантах 2 и 3 были обработаны культурами углеводородокисляющих микроорганизмов и уже через 20 суток инкубации активность дегидрогеназы в варианте с обработкой культурами мицелиальных грибов повысилась до 3.3 ± 0.7 мкл H_2 /г субстрата/ч. С пролонгацией инкубирования до 40 суток наблюдается резкий скачок в уровне дегидрогеназой активности во всех вариантах опыта, но особенно существенный – в вариантах с обработками углеводородокисляющими микроорганизмами. После обработок субстратов смесью трех видов мицелиальных грибов активность фермента через 40 суток достигла 8.2 ± 2.5 мкл H_2 /г субстрата/ч, а после обработок субстратов смесью двух видов бактерий и трех видов дрожжей – 9.5 ± 2.5 мкл H_2 /г субстрата/ч.

**Динамика актуальной активности дегидрогеназы ($AD_{\text{акт}}$)
в процессе регенерации нефтезагрязненного сорбента углеводородокисляющими бактериями,
дрожжами и мицелиальными грибами, мкл H_2/g субстрата/ч**

Вариант	Продолжительность инкубации, сутки									
	0	20	40	60	80	90	100	117	130	
1 – без обработки микроорганизмами (контроль)	2.0±0.6	2.0±0.6	4.8±0.2	3.3 ±0.2	2.0±0.1	2.6±1.0	2.9±0.7	11.3±1.2	11.6±0.8	
2 – обработка смесью трех видов мицелиальных грибов	2.1±0.5	3.3 ±0.7	8.2±2.5	5.6±1.3	3.1±1.2	3.1±0.8	3.2±1.5	15.9±1.6	16.6±1.0	
3 – обработка смесью двух видов бактерий и трех видов дрожжей	2.0±0.8	2.3±0.3	9.5±2.0	6.2±2.0	2.6±0.3	3.5±1.1	3.8±0.5	13.4±1.5	14.6±0.3	

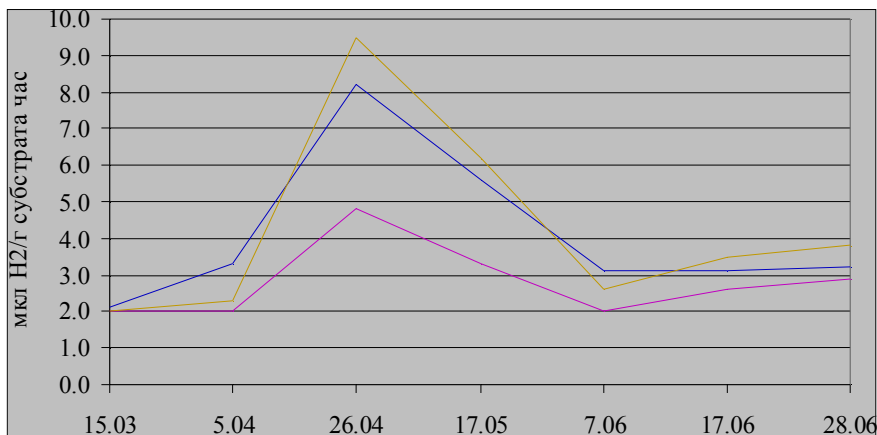


Рис. 20. Дегидрогеназная активность в процессе очистки нефтезагрязненного сорбента.

Обозначения вариантов опыта цветом те же, что и на рис. 14.

Указанный резкий рост дегидрогеназной активности через 40 суток инкубации сопровождается активным потреблением нефти.

Далее, после 40 и до 80 суток наблюдается довольно значительное падение уровня дегидрогеназной активности во всех трех вариантах опыта. После 90 суток инкубации активность фермента находится примерно на одном и том же уровне во всех трех вариантах опыта. Через 90 суток субстраты были поставлены на промораживание на 10 суток и после размораживания (100 суток) уровень дегидрогеназной активности в них во всех вариантах опыта существенно не повысился и остался практически на одном и том же уровне. Однако, с увеличением продолжительности инкубации субстратов до 117 суток наблюдался резкий скачок, сохранившийся через 130 суток в уровне активности фермента во всех трех вариантах опыта, еще более значительный, чем это наблюдали после 40 суток инкубации, хотя в контроле показатель был несколько ниже (табл. 18).

Рассмотренные данные, согласуясь с изменением содержания остаточной нефти, показывают в процессе регенера-

ции нефтезагрязненного сорбента своеобразный волнообразный, синусоидальный характер изменения активности дегидрогеназы. Это связано, по-видимому, с развитием процесса утилизации нефти микроорганизмами по типу сукцессии.

Данные табл. 18 представляют собой суммарную актуальную активность дегидрогеназы, которая продуцируется всей жизнеспособной углеводородокисляющей микробиотой в каждом варианте опыта, включая микрофлору, присутствующую в биологически активном компосте (БИАК), чем объясняются довольно высокие показатели в контрольном варианте.

Был оценен вклад в общую дегидрогеназную активность вносимых в субстраты в вариантах опыта 2 и 3 углеводородокисляющих мицелиальных грибов, дрожжей и бактерий. Для этого из величин активности фермента в вариантах 2 и 3 вычитали соответствующую активность дегидрогеназы в контроле, где нефть утилизировала только микрофлора, присутствующая в БИАКе. В табл. 19 показана динамика актуальной дегидрогеназной активности, продуцируемой вносимыми углеводородокисляющими мицелиальными грибами, дрожжами и бактериями.

Как видно из данных табл. 18, 19, динамика дегидрогеназной активности вносимой в субстраты углеводородокисляющей микрофлоры имеет также волнообразный, синусои-

Таблица 19

Актуальная активность дегидрогеназы ($A_{\text{акт}}$) углеводородокисляющих бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов в процессе очистки нефтезагрязненного сорбента, мкл H_2 /г субстрата/ч

Вариант	Продолжительность инкубации, сутки									
	0	20	40	60	80	90	100	117	130	
2 – обработка смесью трех видов мицелиальных грибов	0.1	1.3	3.4	2.3	1.1	0.5	0.3	4.6	5.0	
3 – обработка смесью двух видов бактерий и трех видов дрожжей	0.0	0.3	4.7	2.9	0.6	0.9	0.9	2.1	3.0	

дальний характер, как и динамика активности фермента, продуцируемого в субстратах всей углеводородокисляющей микробиотой.

Так, через 20 суток деструкции нефти большой вклад в ее утилизацию вносят углеводородокисляющие мицелиальные грибы (39.4%), чем бактерии и дрожжи (13.0%). Далее, через 40-60 суток регенерации, по активности фермента начинают преобладать бактерии и дрожжи – 49.5-46.8% против 41.5-41.1% у мицелиальных грибов. С увеличением срока инкубации доля активности дегидрогеназы мицелиальных грибов резко падает и к 100 суткам составляет 9.4%. В меньшей степени падает доля активности фермента смеси бактерий и дрожжей – к 100 суткам она составляет 23.7%. Тенденция к некоторому падению величины дегидрогеназной активности, продуцируемой смесью бактерий и дрожжей, сохраняется и к 117 суткам, при этом доля активности фермента в варианте «ассоциация бактерий и дрожжей» составляет 15.7%. Через 130 суток доля активности фермента бактерий и дрожжей повышается до 20.5%. Но в целом, во второй период сукцессии (80-130 суток) доля активности дегидрогеназы, продуцируемой смесью бактерий и дрожжей, варьирует в диапазоне 15-25%.

В отличие от ассоциации бактерий и дрожжей, после 100 суток инкубации вклад вносимых мицелиальных грибов в общую дегидрогеназную активность увеличивается к 117-130 суткам более существенно, составляя 29-30%.

Таблица 20

Актуальная активность дегидрогеназы (%) углеводородокисляющих бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов в процессе регенерации нефтезагрязненного сорбента

Вариант	Продолжительность инкубации, сутки									
	0	20	40	60	80	90	100	117	130	
2 – обработка смесью трех видов мицелиальных грибов	4.8	39.4	41.5	41.1	35.5	16.1	9.4	28.9	30.1	
3 – обработка смесью двух видов бактерий и трех видов дрожжей	0.0	13.0	49.5	46.8	23.1	25.7	23.7	15.7	20.5	

Таким образом, анализ динамики дегидрогеназной активности в процессе очистки нефтезагрязненного сорбента показывает, что, во-первых, добавление к нефтезагрязненному сорбенту биологически активного компоста (БИАК) вносит свой вклад в повышение уровня ферментативной активности. Во-вторых, обработка нефтезагрязненного сорбента культурами углеводородокисляющих микроорганизмов существенно увеличивает уровень дегидрогеназной активности в субстратах, что приводит к более активной деструкции нефти. Динамика изменения дегидрогеназной активности в процессе микробиологической утилизации нефтезагрязненного сорбента имеет волнообразный, синусоидальный характер, что определяется, по-видимому, процессами перестройки микробиоты при утилизации нефти, связанными со сложным ее составом.

В первые периоды регенерации сорбента дегидрогеназу более активно синтезируют мицелиальные грибы (через 20 суток инкубации), затем – смесь бактерий и дрожжей (через 40-60 суток). После 60 суток инкубации вносимые в субстраты углеводородокисляющие бактерии и дрожжи синтезируют фермент все в меньшем количестве, как и мицелиальные грибы. После промораживания через 100 суток инкубации мицелиальные грибы снова начинают довольно активно синтезировать дегидрогеназу для утилизации нефти и промежуточных продуктов ее микробиологической трансформации. В целом, следует отметить сложный процесс микробиологической деструкции нефти, определяемый ее компонентным составом, требующим подбора микроорганизмов в каждом конкретном случае.

5.4 Активность выделения CO_2 углеводородокисляющими микроорганизмами

Для суждения об углеводородокисляющей активности ассоциаций м/о изучена активность выделения CO_2 по вариантам опыта в динамике (табл. 21).

**Динамика активности выделения CO₂ углеводородокисляющими микроорганизмами
(нмоль CO₂/ч на образец)**

Варианты опыта	Даты измерений											
	25.03	5.04	16.04	26.04	6.05	17.05	27.05	7.06	17.06	28.06		
1. Контроль (сорбент "К" + БИАК без м/о)	2006	1708	1566	1398	1298	1290	1225	609	446	925		
2. Сорбент "К" + БИАК + 3 вида грибов	2220 111	2469 143	3671 234	2706 194	1636 126	2504 194	2660 217	1208 198	1169 262	2081 225		
3. Сорбент "К" + БИАК + НК-15 + НК-16 + 3 вида дрожжей	4715 235	3811 223	5127 327	4622 331	3007 232	4149 322	3959 323	1322 217	663 149	3712 401		

Примечание: над чертой – значение CO₂, под чертой – процент превышения контрольного варианта.

Как видно из данных табл. 21, в контрольном варианте вследствие того, что использовались не стерильные в микробиологическом отношении сорбент и БИАК, отмечена активность выделения CO_2 . При этом абсолютные значения выделившегося углекислого газа изменялись от 2006 нмоль CO_2 /ч в начале опыта до 446-925 нмоль – в его конце. Иначе говоря, активность выделения углекислого газа в контроле в течение опыта постепенно снижалась.

Иная картина наблюдалась в динамике выделения CO_2 во втором и третьем вариантах опыта. Так, культуры грибов во втором варианте опыта по абсолютным значениям выделения углекислого газа во все даты измерений превышали контрольный вариант на 111-262%. При этом отмечена активность выделения CO_2 в начале опыта до 3671 нмоль CO_2 /ч/образец, затем она после весьма резкого снижения вновь возросла. Еще один пик подъема активности «дыхания» наблюдался после промораживания.

В третьем варианте опыта так же, как и во втором, абсолютные значения активности выделения CO_2 были выше контрольного варианта на 217-401%. При этом отмечено практически в те же сроки и изменение активности выделения углекислого газа.

Сравнение второго варианта с третьим показывает, что ассоциация культур бактерий и дрожжей в целом превосходила по активности выделения углекислого газа ассоциацию микромицетов на 109-203%. Общее количество выделившегося углекислого газа в третьем варианте было в 2.6 раза выше, чем во втором (грибы) варианте опыта.

Полученные закономерности в динамике активности выделения углекислого газа в целом схожи с данными нашего предыдущего опыта с дрожжевыми грибами. Более высокие пики и, соответственно, более резкие спады активности в целом объясняются изменением численности и состава испытуемых культур микроорганизмов и характером трофических взаимоотношений между группами микроорганизмов на изменяющемся по составу нефти субстрате.

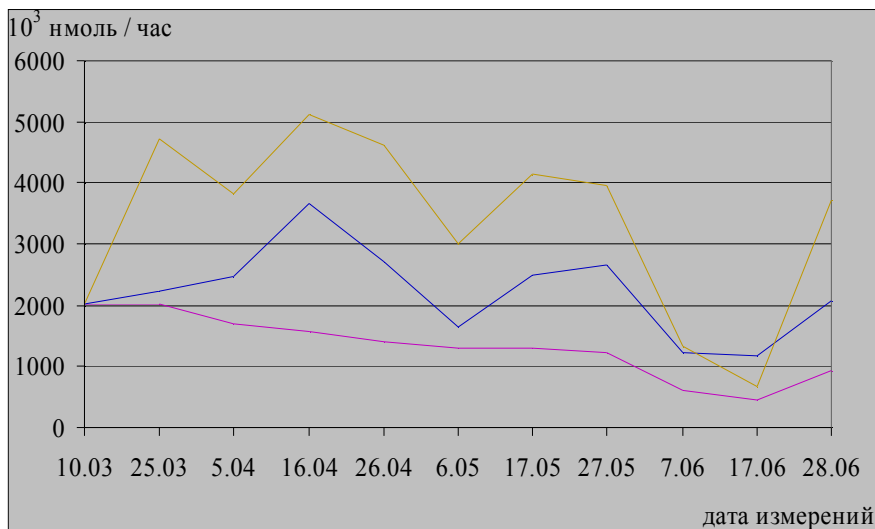


Рис. 21. Активность выделения CO₂ углеводородокисляющими микроорганизмами.

Обозначения вариантов опыта цветом те же, что и на рис. 14.

Таким образом, смесь культур дрожжей и бактерий по активности выделения углекислого газа превышает ассоциацию исследованных микромицетов и, как видно на рис. 21, более активно осуществляет деградацию нефтепродуктов на сорбенте «К» с БИАК.

Проведение длительного эксперимента показало, что микробиологическая очистка твердого субстрата (нефтезагрязненного сорбента «К») представляет собой сложный процесс, развивающийся «волнообразно», по типу сукцессии. Такой тип процесса связан с многокомпонентным составом нефти, изменение его под воздействием вносимых микроорганизмов обуславливает перестройку складывающегося микробоценоза, что подтверждается изменением количественно-качественного состава основных групп микроорганизмов. Подтверждает отмеченное комплекс изученных показателей – общая биологическая активность по интенсивности выделения CO₂, азотфиксирующая способность, ферментативная активность.

5.5. Оценка экологической токсичности нефтезагрязненного сорбента

Выполнена оценка экологической токсичности нефтезагрязненного сорбента после его очистки ассоциацией микроорганизмов.

Исследование проведено в аккредитованной лаборатории экотоксикологического анализа почв (ЛЭТАП) факультета почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова (аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.513050). Для выявления токсичности применялась аттестованная методика «Определение токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков, сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний» ФР 1.1.39.2001-00-283. Она основана на регистрации смертности (летальности) особей мальков низших ракообразных (*Daphnia magna* Straus, Cladocera, Crustacea) за определенный период экспозиции. Критерием острой токсичности служит гибель 50% и более дафний за 96 ч в водной вытяжке при условии, что в контроле гибель не превышает 10%.

Процедура пробоподготовки высушенных образцов к биотестированию проведена в соответствии с нормативными документами. Водная вытяжка готовилась из высушенных образцов культивационной водой в соотношении жидкость: твердая фаза – 1:10 (как принято при биотестировании химических отходов). В качестве жидкости применялась культивационная вода, которая используется для поддержания исходной культуры тест-организмов. Приготовление вытяжки проводили при комнатной температуре на магнитной мешалке в течение 7 ч с последующим отстаиванием 12-14 ч в холодильнике и фильтрованием через бумажный фильтр «белая лента». В полученных экстрактах измеряли рН (соблюдая интервал рН 7.0-8.2 и при необходимости доводили 10% HCl или 10% КОН) и содержание кислорода (исходное содержание O_2 не менее 6 мг/дм³).

Биотестирование проводили в химических стаканах объемом 150 см³, которые заполняли 100 см³ исследуемой вытяжки, в них помещали по десять дафний не более 24-часо-

вого возраста (разница между возрастом рачков не более 8 ч, что определяли по размеру рачков и обеспечивали синхронизированным культивированием).

Определение токсичности каждой пробы проводили в трех параллельных сериях. В качестве контроля использовали три параллельные серии с культивационной водой. Биотестирование проводилось с соблюдением требований к температуре, продолжительности фотопериода и качеству культивационной воды в соответствии с требованиями методики.

Учет смертности дафний в опыте и контроле проводили через каждый час до конца первого дня опыта, а затем два раза в сутки ежедневно до истечения 96 ч.

Неподвижные особи считали погибшими, если они не начинали двигаться в течение 15 секунд после легкого покачивания стакана. Если гибель дафний в контроле превышала 10%, результаты опыта не учитывались, и он повторялся.

После учета результатов эксперимента все дафнии из стаканчиков выбрасывали и в каждом стакане проводили измерения рН, температуры, содержания растворенного кислорода с помощью оксиметра. На основании этих данных контролировали условия проведения экспериментального определения токсичности.

Итоговые результаты испытаний представлены в табл. 22. Контрольные образцы (1, 2) и образцы варианта 2 (обработка ассоциацией микромицетов, см. схему опыта) оказались не токсичны для объектов окружающей среды, тогда как образцы варианта 3 (деструкция нефтезагрязненного сорбента ассоциацией бактерий и дрожжей) проявили токсичность.

**Результаты биотестирования образцов сорбента нефти
и продуктов его биологического восстановления в ходе завершённой серии экспериментов**

Рег. № пробы	Разведывание	№ повторностей	Количество живых особей (численность – N, %)												% к контролю	Условия биотестирования						Результат	
			t 0ч		t 1ч		t 24 ч		t 48 ч		t 96 ч		pH	pH		O ₂	O ₂	t °С	t °С				
			N	%	N	%	N	%	N	%	N	%								до	после		до
кон- троль		1	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.2	7.2	7.2	6.0	6.0	6.0	6.0	нетоксичность	
		2	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.2	7.2	7.2	6.0	6.0	6.0	6.0	нетоксичность	
		3	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.2	7.2	7.2	6.0	6.0	6.0	6.0	нетоксичность	
		ср.	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.2	7.2	7.2	6.0	6.0	6.0	6.0	нетоксичность	
1		1	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.72	7.72	7.72	6.0	6.0	6.0	21	21	нетоксичность
		2	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.72	7.72	7.72	6.0	6.0	6.0	21	21	нетоксичность
		3	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.72	7.72	7.72	6.0	6.0	6.0	21	21	нетоксичность
		ср.	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.72	7.72	7.72	6.0	6.0	6.0	21	21	нетоксичность
2		1	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.82	7.82	7.82	6.1	6.1	6.1	21	21	нетоксичность
		2	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.82	7.82	7.82	6.1	6.1	6.1	21	21	нетоксичность
		3	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.82	7.82	7.82	6.1	6.1	6.1	21	21	нетоксичность
		ср.	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.82	7.82	7.82	6.1	6.1	6.1	21	21	нетоксичность
3		1	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.53	7.53	7.53	6.0	6.0	6.0	21	21	нетоксичность
		2	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.53	7.53	7.53	6.0	6.0	6.0	21	21	нетоксичность
		3	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.53	7.53	7.53	6.0	6.0	6.0	21	21	нетоксичность
		ср.	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.53	7.53	7.53	6.0	6.0	6.0	21	21	нетоксичность

Окончание табл. 22

Рег. № пробы	Разведнение	№ повторностей	Количество живых особей (численность – N, %)										% к конт-ролю	Условия биотестирования						Результат
			t 0ч		t 1ч		t 24 ч		t 48 ч		t 96 ч			pH	pH	O ₂	O ₂	t °С	t °С	
			N	%	N	%	N	%	N	%	N	%								
4	1	1	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.43	7.43	6.0	6.0	21	21	ТОКСИЧНОСТЬ	
	1	2	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.43	7.43	6.0	6.0	21	21		
	1	3	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.43	7.43	6.0	6.0	21	21		
	1	ср.	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.43	7.43	6.0	6.0	21	21		
5	1	1	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.53	7.53	6.0	6.0	21	21	НЕТОКСИЧНА	
	1	2	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.53	7.53	6.0	6.0	21	21		
	1	3	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.53	7.53	6.0	6.0	21	21		
	1	ср.	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7.53	7.53	6.0	6.0	21	21		
6	1	1	10	50	–	–	0	0	0	0	0	0	7.35	7.35	6.0	6.0	21	21	НЕТОКСИЧНА	
	1	2	10	50	–	–	0	0	0	0	0	0	7.35	7.35	6.0	6.0	21	21		
	1	3	10	50	–	–	0	0	0	0	0	0	7.35	7.35	6.0	6.0	21	21		
	1	ср.	10	50	–	–	0	0	0	0	0	0	7.35	7.35	6.0	6.0	21	21		
7	1	1	10	50	–	–	5	50	5	50	5	50	7.63	7.63	6.0	6.0	21	21	ТОКСИЧНА	
	1	2	10	100	–	–	8	80	2	20	2	20	7.63	7.63	6.0	6.0	21	21		
	1	3	10	90	–	–	5	50	3	30	3	30	7.63	7.63	6.0	6.0	21	21		
	1	ср.	8	80	–	–	6	60	2	33	33.3	33.3	7.63	7.63	6.0	6.0	21	21		

Часть II. БИОСОРБЕНТЫ

Глава 6. ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ И ДРОЖЖЕЙ

Материалы исследований, изложенные в главах 1-5, послужили основанием для разработки биосорбента, сочетающего возможность сбора нефти (нефтепродуктов) и разрушения загрязняющего вещества с помощью ранее подобранных ассоциаций м/о, внедренных в сорбент.

Иммобилизация ферментов и клеток путем адсорбции на нерастворимых носителях достигается при контакте водного раствора фермента или клеток с носителем. На практике для получения адсорбционно-иммобилизованных ферментов и клеток применяется статический способ или способ с перемешиванием. Статический способ наиболее прост и состоит в том, что носитель вносят в водный раствор фермента или клеток и полученную смесь оставляют на некоторое время без перемешивания. Иммобилизация достигается за счет самопроизвольной диффузии биологического агента к поверхности носителя с последующей адсорбцией. В случае способа с перемешиванием носитель суспендируется в растворе биологического агента и полученная смесь непрерывно перемешивается с помощью магнитной или механической мешалки или на лабораторной качалке. Этот способ гораздо эффективнее статического и обеспечивает более равномерное заполнение поверхности носителя адсорбированным биологическим агентом (Егорова, 1986).

Определяли сорбционную способность органо-минерального сорбента «К» по отношению к клеткам нефтеоокисляющих бактерий *Rhodococcus erythropolis* (НК-16) и дрожжевого гриба *Candida lipolytica* (КБП-3308) обоими способами.

6.1. Иммобилизация клеток микроорганизмов в форме водной суспензии

Более детальные исследования были проведены с водной суспензией. Этот способ был принят при изготовлении биосорбентов, предложена технология.

Для иммобилизации клеток нефтеокисляющих микроорганизмов на органоминеральном сорбенте «К» использовали 5-суточные культуры бактерии *Rhodococcus erythropolis* (НК-16) и дрожжевого гриба *Candida lipolytica* КБП-3308 (НК-304). Посевную культуру получали в жидкой питательной среде состава (г/л): глюкоза – 10.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1.0, KH_2PO_4 – 3.0, K_2HPO_4 – 7.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; раствор микроэлементов (0.1 мл/100 мл среды): $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.08, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.4, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.8, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.3, H_3BO_3 – 0.06, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.1. Для стимулирования биосинтеза оксидоредуктаз и адаптации культур к нефтесодержащим субстратам в колбы добавляли по две капли нефти. Культивирование проводили в колбах при перемешивании с объемом питательной среды 200 мл при комнатной температуре. Исходное значение pH среды для культивирования бактерий составляло 7.0 без дальнейшего регулирования, для дрожжей – 5.0.

В опытные колбы с 50 мл водопроводной воды добавляли по 1 мл посевной культуры *Rh. erythropolis* или *C. lipolytica*. В полученные суспензии клеток вносили по 1 г органоминерального сорбента «К». Процесс иммобилизации проводили в статических условиях, без перемешивания смеси сорбента с культурой соответствующего микроорганизма и при периодическом перемешивании содержимого колб на лабораторной качалке. Эксперимент по изучению сорбционной способности органоминерального сорбента продолжался в течение суток.

Общее число клеток бактерий и дрожжей подсчитывали с помощью счетной камеры Горяева-Тома. Степень иммобилизации клеток на сорбенте рассчитывали как отношение числа сорбированных клеток к общему числу клеток и выражали в процентах.

Общее количество клеток бактерий и дрожжей в исходных суспензиях, до добавления сорбента, составляло $1.8-2.8 \cdot 10^8$ кл./мл у *Rh. erythropolis* и $2.7-8.1 \cdot 10^7$ кл./мл – у *C. lipolytica* (табл. 23).

После одних суток взаимодействия с сорбентом во всех четырех вариантах опыта было подсчитано общее число несорбированных клеток. Наибольшая степень иммобилизации клеток (80.0%) наблюдалась в варианте с бактериями *Rh. erythropolis* в условиях перемешивания с органоминеральным сорбентом (табл. 23). Примерно одинаковая степень иммобилизации отмечена для бактерий (69.6%) и дрожжей (69.1%) в статических условиях. Отметим, что сорбент «К» по мере поглощения дрожжей опускался на дно сосуда, т.е. терял свою гидрофобность. По-видимому, для дрожжей *C. lipolytica* условия иммобилизации при перемешивании не являются подходящими, степень иммобилизации клеток в этом случае является низкой – 14.8%.

Таким образом, для максимальной иммобилизации на органоминеральном сорбенте «К» следует использовать условия перемешивания для бактерий (*Rh. erythropolis*) и статические условия – для дрожжей (*C. lipolytica*).

Таблица 23

Иммобилизация клеток нефтеокисляющих бактерий и дрожжей на органоминеральном сорбенте «К»

Культура	Условия иммобилизации	Исходное число клеток, кл./мл	Число несорбированных клеток, кл./мл	Число иммобилизованных клеток, кл./мл	Степень иммобилизации, %
<i>Rhodococcus erythropolis</i> (НК-16)	статические	$2.80 \cdot 10^8$	$0.85 \cdot 10^8$	$1.95 \cdot 10^8$	69.6
<i>Rhodococcus erythropolis</i> (НК-16)	перемешивание	$1.80 \cdot 10^8$	$0.36 \cdot 10^8$	$1.44 \cdot 10^8$	80.0
<i>Candida lipolytica</i> КБП-3308 (НК-304)	статические	$8.1 \cdot 10^7$	$2.5 \cdot 10^7$	$5.6 \cdot 10^7$	69.1
<i>Candida lipolytica</i> КБП-3308 (НК-304)	перемешивание	$2.7 \cdot 10^7$	$2.3 \cdot 10^7$	$0.4 \cdot 10^7$	14.8

Необходимо было исследовать возможность закрепления дрожжей на сорбенте «К» и оценить эффективность утилизации сорбированной нефти иммобилизованными дрожжами. Для этого в прозрачный пластиковый стакан было налито 0.5 л водопроводной воды и на ее поверхность разлито 5 мл нефти. Далее порциями добавляли органоминеральный сорбент «К» до полного «поглощения» им нефти, всего его добавлено 3.5 г. Затем, чтобы сохранить гидрофобность сорбента, 5 мл инокулята (*C. lipolytica*) наносили каплями на поверхность, при этом из-за гидрофобности сорбента часть инокулята «ушла» в воду.

В течение месяца сорбент с адсорбированной нефтью и м/о оставался на поверхности воды, под сорбентом вода помутнела и приобрела желтоватый оттенок. Через месяц был проведен микробиологический анализ сорбента «К» и воды под слоем сорбента. Посев был сделан на питательную среду Чапека в разведении $1:10^3$.

Из данных табл. 24 видно, что количество дрожжей, содержащихся в сорбенте и в воде под сорбентом, близко между собой. Можно предположить, что в течение месяца количество клеток дрожжей в воде увеличилось за счет части не иммобилизованного микроорганизма. В то же время функционирование дрожжей на сорбенте обусловило снижение содержания сорбированной нефти на 15% к начальному ее количеству. Обращаясь к ранее проведенному опыту, заметим, что «чистый» (без нефти) сорбент, помещенный на поверхность суспензии с *C. lipolytica*, в течение нескольких часов

Таблица 24

**Распределение микроорганизмов в сорбенте и воде
через месяц после начала опыта**

Образец	Количество м/о в тыс. КОЕ на 1 г сорбента или на 1 мл H ₂ O. Среднее из двух повторностей	Количество утилизированной дрожжами нефти на сорбенте за 1 месяц, %
Сорбент	6 220	15
H ₂ O (под сорбентом)	5 000	

без перемешивания опускался на дно, т.е. становился смачиваемым. Степень иммобилизации дрожжей в этих условиях составляла около 70%, при активном перемешивании сорбента с суспензией *C. lipolytica* закрепление дрожжей на сорбенте было существенно меньшим (табл. 24). Таким образом, нанесенная на поверхность сорбента *Candida lipolytica*, закрепляясь на сорбенте, способствует деструкции нефти, хотя и в небольшом количестве.

6.2. Иммобилизация мицелиальных грибов и прочность их закрепления

Среди испытанных нефтеокисляющих м/о представляли интерес микроскопические грибы *Fusarium lateritium* и *Gliocladium deliquescens*.

Грибы – гетеротрофы, осуществляющие в экосистемах функции редуцентов органического вещества. У них мощный ферментативный аппарат, участвующий в разложении труднорастворимых компонентов органического вещества. Грибы обладают высокой радиальной скоростью роста, позволяющей осуществлять пространственное заселение органических субстратов, способны утилизировать трудноминерализуемые вещества при низких температурах, вплоть до отрицательных.

Для получения посевного материала культур микроскопических грибов использовали среду следующего состава (г/л): 850 мл H₂O, сусло – 150 мл, рН среды 7.0 без дальнейшего регулирования величины рН. Культивирование проводили в колбах при перемешивании (180 об./мин.) с объемом питательной среды 100 мл при 24 °С.

Для обрастания сорбента «К» мицелием грибов (*Fusarium lateritium* и *Gliocladium deliquescens*) в чашки Петри на стерильную фильтровальную бумагу, пропитанную 2 мл питательной среды на сусле, равномерно распределили 2 г сорбента, после чего культуры микроорганизмов в количестве

1 мл наносили на слой сорбента. Через 12 суток сорбент полностью покрылся мицелием грибов.

Затем определили прочность закрепления грибов и деградацию ими адсорбированной сорбентом нефти. В два прозрачных полиэтиленовых цилиндрических сосуда было взято по 100 мл воды и на поверхность разлито по 2 мл нефти, после чего на поверхность воды нанесен сорбент с иммобилизованными мицелиальными грибами. Сорбент полностью адсорбировал нефть и в течение 8 суток находился на поверхности воды. На 8-е сутки были взяты пробы воды и сорбента на микробиологический анализ. Проба воды в количестве 0.1 мл и сорбент на кончике бактериальной иголки были нанесены на питательную среду Чапека в чашках Петри и равномерно распределены бактериальным шпателем по поверхности среды. Через 4 дня в чашках Петри с посевом воды появились только бактериальные колонии, в чашках с посевом сорбента наблюдался сплошной рост взятых для исследования грибов (рис. 22, 23, 24, 25). Такое различие показывает устойчивое закрепление грибов на сорбенте, продолжающих развиваться на его поверхности. При микроскопическом исследовании было хорошо видно, что мицелий грибов пронизывает массу сорбента с нефтью. Имело место образование хламидоспор и спороношение грибов.

Еще через 7 дней сорбент был собран, выполнен микробиологический анализ сорбента и воды под слоем сорбента. Посев был сделан на питательные среды МПА (мясо-пептонный агар) и Чапека в разведениях $1:10^2$ и $1:10^3$. На среде Чапека, на поверхность которой для подавления роста бактерий добавляли 0.1 мл 0.1н раствора соляной кислоты, учитывали колонии исследуемых микромицетов. На МПА, который представляет собой универсальную твердую среду, где может развиваться большинство гетеротрофных микроорганизмов, главным образом растут микроорганизмы, использующие органические азотсодержащие вещества, т.е. аммонификаторы. Полученные данные приведены в табл. 25 (средние из двух повторностей).



Рис. 22. Опыт с иммобилизацией микромицетов на сорбенте «К». Рост микроорганизмов из водной среды под слоем сорбента «К» (*Gliocladium deliquescens*).



Рис. 23. Опыт с иммобилизацией микромицетов на сорбенте «К». Рост микроорганизмов из водной среды под слоем сорбента «К» (*Fusarium lateritium*).

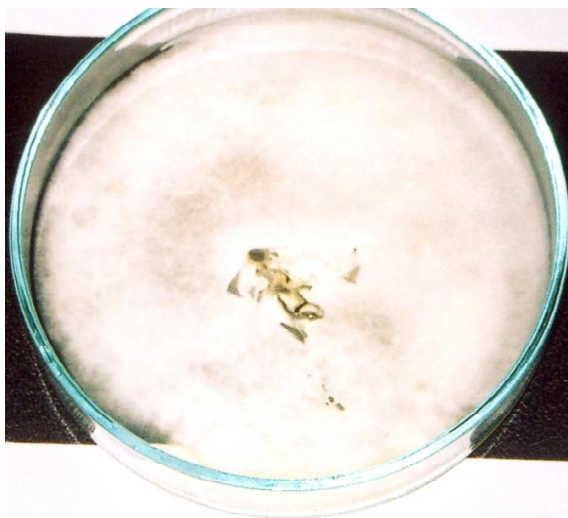


Рис. 24. Опыт с иммобилизацией микромицетов на сорбенте «К». Рост микроорганизмов, снятых с поверхности сорбента «К» (*Fusarium lateritium*).



Рис. 25. Опыт с иммобилизацией микромицетов на сорбенте «К». Рост микроорганизмов, снятых с поверхности сорбента «К» (*Gliocladium deliquescens*).

Из данных табл. 25 видно, что количество клеток микромицетов *Fusarium lateritium* и *Gliocladium deliquescens* в сорбенте достигает 400-1000 тыс. КОЕ на г сорбента, а в водной среде их количество незначительно, что позволяет судить о прочном закреплении микромицетов на сорбенте, загрязненном нефтью и, следовательно, о возможности их применения для деструкции нефти, собранной сорбентом с водной поверхности.

Учеты, проведенные на питательной среде МПА, показывают, что из водной среды микроорганизмов выделено больше, чем из сорбента. Высокое содержание микроорганизмов в водной среде на 15-е сутки объясняется тем, что грибы, разлагая нефть, выделяют водорастворимые органические биологически активные вещества, стимулирующие развитие бактерий. Определение остаточной нефти в сорбенте показало, что через две недели опыта грибы, точнее, формирующийся микробный комплекс, способствовал деструкции нефти, снижение загрязнения произошло на 9% (использование *G. deliquescens*) и на 13% в опыте с *F. lateritium*.

Выполненное исследование дало основание для работ по созданию сорбентов, обогащенных комплексами микроорганизмов – деструкторов нефти, разработке приемов иммобилизации комплекса м/о в сорбенте «К».

Таблица 25

**Распределение микроорганизмов в сорбенте и воде
через две недели после начала опыта**

Варианты	Количество микроорганизмов в тыс. КОЕ на г сорбента с нефтью или на мл H ₂ O	
	среда Чапека (исследуемые грибы)	среда МПА
Сорбент + нефть + <i>Fusarium lateritium</i>	403	768
H ₂ O (под сорбентом с нефтью и <i>F. lateritium</i>)	6	970
Сорбент + нефть + <i>Gliocladium deliquescens</i>	1000	1150
H ₂ O (под сорбентом с нефтью и <i>G. deliquescens</i>)	0	1800

6.3. Обработка приемов нанесения микроорганизмов и их ассоциаций на поверхность сорбента

Проведенные исследования дали основание для разработки приемов создания оптимизированного сорбента «К», насыщенного микроорганизмами – биосорбента. С этой целью в лабораторных условиях испытали прием обогащения сорбента «К» микроорганизмами для оптимизации процесса деградации нефти на загрязненных водных поверхностях. В соответствии с этим в первой части эксперимента обогащали сорбент микроорганизмами, во второй – обогащенный сорбент «К» испытали на эффективность деструкции нефти, поглощенной биосорбентом.

I. В небольшие емкости (лотки) на дно наливали по 20 мл питательной среды (15% -ное неохмеленное пивное сусло). 20 г сорбента «К» помещали в лоток, перемешивали, затем сверху распределяли по 20 мл культуры микроорганизмов (м/о) или их ассоциации. Лотки помещали в небольшие полиэтиленовые мешочки для уменьшения испарения влаги. Рост микроорганизмов продолжался в течение 5 суток.

Использовали следующие м/о:

1. *Candida lipolytica*;
2. *C. lipolytica* + *C. guillermondii*;
3. *C. lipolytica* + *C. guillermondii* + *Pichia guillermondii* + НК-15 + НК-16;
4. НК-16;
5. *Fusarium lateritium* + *Gliocladium deliquescens* (НК-205) + *Gliocladium sp.* (Н-206);
6. *F. moniliforme*;
7. *F. solani*;
8. *Cladosporium resinae*;
9. *Trichoderma harzianum*;
11. *C. lipolytica* + *C. guillermondii* + *P. guillermondii* + НК-15 + НК-16;
12. *F. lateritium* + *G. deliquescens* (НК-205) + *Gliocladium sp.* (НК-206).

В последних двух вариантах (11, 12) сорбент «К» смешивали с биологически активным материалом (БИАК) в соотношении 1:0.25.

В течение 3 дней сорбент «К» и смесь сорбента «К» с БИАК активно обрастали грибами, мицелий был хорошо заметен. В вариантах с бактериально-дрожжевой ассоциацией внешних признаков изменения массы сорбента не наблюдалось, хотя можно было заметить некоторое уплотнение массы сорбента. Через 9 дней была выполнена вторая часть опыта.

II. В чашки диаметром 19 см была налита вода. На поверхность воды налита нефть (10 мл) и рассыпаны образцы сорбента с микроорганизмами. Нефть сорбирровалась около 1 ч. Опыт продолжали 27 суток. За это время запах нефти несколько уменьшился, часть биосорбента оказалась на дне. После 27 суток с поверхности воды оставшийся сорбент был собран и помещен в лотки (на чистую пленку) для высушивания и дальнейшего анализа.

Из данных табл. 26 видно, что во всех чашках на дне был осадок, количество которого по отношению к нанесенному на поверхность воды сорбенту «К» (20 г) составляло от 2 до 15%. При этом надо отметить, что большее количество осадка характеризует варианты с иммобилизацией смеси дрожжевых грибов и бактерий (2 и 3 варианты), а также с иммобилизацией микроскопических грибов (7 и 9 варианты). Наибольший процент осадка оказался в вариантах 11 и 12 со смесью сорбента «К» с БИАК – количество осадка составило 21.5-40% от количества нанесенного на поверхность сорбента (20 г). Столь существенная величина осадка связана, очевидно, с гидрофильностью БИАК. Однако расчет показывает, что по количеству осадок вдвое больше вносимого в смесь БИАК. Это позволяет заключить, что частично и сорбент «К» теряет гидрофобность при иммобилизации м/о.

За время опыта (27 суток) заметно снизился уровень загрязнения в сорбенте «К» и его смеси с БИАК – на 12-16%. При этом сравнительно больший эффект (16%) характеризовал вариант со смесью мицелиальных грибов (5). В целом

Таблица 26

**Химические свойства биосорбентов после окончания опыта
микробиологической трансформации нефтезагрязнения**

№ п/п	Вариант	Убыль нефти, %	Химические показатели биосорбентов после окончания опыта				Осадок на дне, % к колич. сорбента
			рН	МГ на 100 г в.с.в.			
				азот гидролиз.	фосфор	калий	
1.	<i>Candida lipolytica</i>	12.5	4.59	8.4	7.6	14.8	2.3
2.	<i>C.l. + C. guillemondii</i>	12.0	6.74	6.4	6.1	12.3	15.3
3.	<i>C.l. + C.g. + Pichia guillemondii +</i> HK-15 + HK-16	12.5	6.36	7.0	2.6	10.6	11.2
4.	HK-16	14.0	6.10	7.0	7.2	17.9	4.5
5.	<i>Fusarium lateritium + Gliocladium</i> <i>deliquescens</i> (HK-205) + <i>C.d.</i> (HK-206)	16.0	6.56	6.4	6.1	9.9	4.1
6.	<i>Fusarium moniforme</i>	12.8	6.51	9.8	3.4	26.8	6.9
7.	<i>Fusarium solani</i>	9.0	7.13	7.0	2.3	14.6	9.4
8.	<i>Cladosporium resinae</i>	14.5	6.58	4.2	0.8	10.9	3.5
9.	<i>Trichoderma harzianum</i>	14.2	6.66	7.0	9.5	16.2	10.3
11.	<i>C. lipolytica + C. guillemondii +</i> <i>P. guillemondii +</i> HK-15, HK-16	12.8	7.32	28.0	22.7	28.5	40.0
12.	<i>F.l. + G.d.</i> (HK-205) + <i>G.d. sp.</i> (HK-206)	14.2	7.03	35.0	31.0	35.9	21.5

эффективность исследованных культур м/о и их ассоциаций была сходной между собой. В основном в течение месяца биосорбенты сохраняют плавучесть, кроме вариантов 11 и 12.

Отметим также, что содержание элементов-биогенов в биосорбентах через месяц было высоким в вариантах 11 и 12, однако это отличие не отразилось на эффективности деструкции нефти.

Как отмечено выше, опыт продолжался около месяца. По его завершению на определение количества микроорганизмов были взяты пробы воды под сорбентом и самого сорбента, остававшегося на водной поверхности.

Из данных табл. 27 видно, что в водной среде количество грибов незначительно, что позволяет судить о сравнительно прочном закреплении микромицетов на сорбенте, загрязненном нефтью и, следовательно, о возможности их применения для деструкции нефти, собранной сорбентом на водной поверхности.

Что касается бактериально-дрожжевой ассоциации (табл. 27), то можно отметить ее меньшую степень иммобилизации на сорбенте. Об этом позволяет судить довольно высокое количество м/о в воде. При этом при посеве биосорбентов отмечена достаточно высокая степень роста м/о.

Полученные результаты, как и ранее рассмотренные в рекогносцировочных опытах, позволяют заключить о возможности закрепления обеих испытанных ассоциаций микроорганизмов в массе сорбента «К» при использовании его для сорбции нефти с водной поверхности. Насыщение сорбирующей массы биопрепаратами обеспечивает довольно активную деградацию нефти на сорбенте – за месяц более 30% от внесенного количества, при этом загрязнение было значительным – 40%.

Таким образом, в целом, проведенный опыт подтвердил возможность разрушения сорбированной с водной поверхности нефти в массе сорбента без его удаления в течение месяца под воздействием биопрепаратов, внесенных предварительно в массу сорбента.

Результаты определения м/о в водной среде

Варианты сорбента с нефтеструктурами	Количество микроорганизмов в КОЕ в 1 мл воды из-под сорбента с микроорганизмами	
	МПА	Чапека
<i>Candida lipolytica</i>	128	274
<i>Candida lipolytica</i> + <i>Candida guillemondii</i> + <i>Pichia guillemondii</i>	480	494
<i>Candida lipolytica</i> + <i>Candida guillemondii</i> + <i>Pichia guillemondii</i> + НК-15 + НК-16	240	138
НК-16	670	240
2 штамма <i>Gliocladium deliquescens</i> и <i>Fusarium lateritium</i>	54 (бактерии)	3/0
<i>Fusarium moniliforme</i>	4 (бактерии)	4/10
<i>F. solani</i>	1 (бактерии)	1/2
<i>Cladosporium resinae</i>	2 (бактерии)	1/1
<i>Trichoderma harzianum</i>	2 (бактерии)	2/1
<i>Candida lipolytica</i> + <i>Candida guillemondii</i> + <i>Pichia guillemondii</i> + НК-15 + НК-16 Сорбент «К» + БИАК (1:0.25)	270	1/270
2 штамма <i>Gliocladium deliquescens</i> и <i>Fusarium lateritium</i> Сорбент «К» + БИАК (1:0.25)	116	5/60

Примечание: в числителе – количество колоний грибов, в знаменателе – бактерии и дрожжи.

Проведенный опыт показал перспективность закрепления некоторых видов микромицетов и их ассоциаций, а также бактериально-дрожжевой ассоциации в массе сорбента «К» и его смеси с БИАК.

Вместе с тем, длительное (более месяца) нахождение биосорбента на водной поверхности будет сопровождаться осаждением его на дно, что изменит процесс очистки водоема.

Таким образом, эффективный период действия биосорбента на водной поверхности составляет около месяца. После этого периода биосорбент следует собрать и доочистку

его производить на специальных площадках с добавлением стимулирующих жизнедеятельность м/о веществ (БИАК, минеральные элементы питания).

6.4. Изучение роста и развития микроорганизмов, используемых для иммобилизации

Для иммобилизации микроорганизмов в сорбент необходимо применять их культуры в стадиях активного роста – в логарифмической фазе, фазе отрицательного ускорения размножения или же в максимальной стационарной фазе, которые для испытываемых микроорганизмов наступают в разные отрезки времени. Поэтому было проведено определение времени наступления этих фаз для бактерий, дрожжей и микромицетов путем микробиологического посева и просмотра под микроскопом через каждые два часа в процессе накопления их в ферментере.

К числу важнейших проявлений жизнедеятельности организмов относятся рост и размножение. По отношению к м/о рост определяется как увеличение массы цитоплазмы, размножение – как деление микробной клетки и увеличение численности особей.

При размножении бактериальные популяции проходят восемь фаз:

1. Начальная стационарная фаза начинается после внесения микроорганизмов в питательную среду и продолжается от 1 до 2 ч. Во время этой фазы количество бактерий не увеличивается и клетки не растут (рис. 26).

2. Лаг-фаза, или фаза задержанного размножения (рис. 27). В это время бактерии, внесенные в свежую питательную среду, начинают интенсивно расти, но скорость их деления остается невысокой. Две первые фазы развития бактериальной популяции называют периодом приспособления к новой среде. К концу лаг-фазы клетки часто увеличивают свой объем. Длительность лаг-фазы зависит как от внешних условий, так и их видовой специфичности.

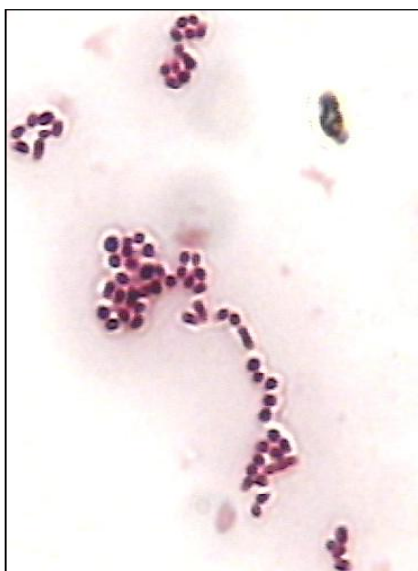


Рис. 26. Исходная посевная культура *Rhodococcus erythropolis* (увеличение 12×90).



Рис. 27. *Rhodococcus erythropolis* через 4 часа культивирования. Лог-фаза (увеличение 12×90).



Рис. 28. *Rhodococcus erythropolis* через 9 часов культивирования. Логарифмическая фаза (увеличение 12×90).

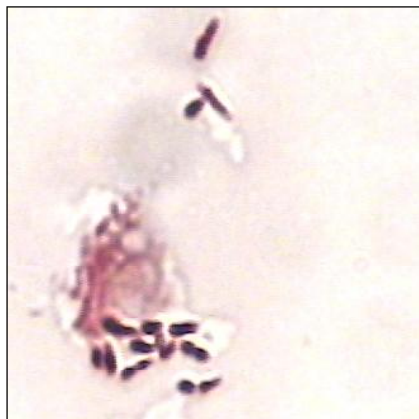


Рис. 29. *Rhodococcus erythropolis* через 12 часов культивирования. Фаза отрицательного ускорения размножения (увеличение 12×90).

3. **Логарифмическая фаза** (рис. 28). В этот период размножение бактерий идет с наибольшей скоростью и число клеток увеличивается в геометрической прогрессии.

4. **Фаза отрицательного ускорения размножения** (рис. 29). Период генерации начинает удлиняться. Одна из причин, замедляющих размножение бактерий – истощение питательной среды и накопление в ней ядовитых продуктов обмена. Это замедляет ритм размножения. Некоторые клетки перестают размножаться и погибают.

5. **Максимальная стационарная фаза** (рис. 30) – период, когда число вновь возникающих клеток примерно равно числу отмирающих. Поэтому количество живых клеток некоторое время остается практически неизменным. Однако при этом общая численность живых и мертвых бактерий несколько увеличивается, хотя и не так быстро. Эта фаза называется максимальной потому, что при ней численность клеток в среде достигает максимума.

6-8. **Фазы отмирания** (рис. 31, 32).

6. **Фаза ускоренной гибели** – происходит увеличение количества отмерших клеток. На смену этой фазе **приходит (7) – фаза логарифмической гибели** клеток, когда они отмирают с постоянной скоро-



Рис. 30. *Rhodococcus erythropolis* через 16 часов культивирования. Максимальная стационарная фаза (увеличение 12×90).

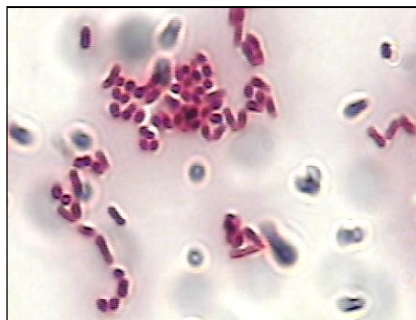


Рис. 31. *Rhodococcus erythropolis* через 24 часа культивирования. Фазы отмирания (увеличение 12×90).

стью. Наконец наступает **фаза замедления скорости отмирания**, поскольку происходит полное отмирание клеток. Такое происходит в непроточных условиях. Если добавлять в среду питательные вещества и одновременно удалять продукты обмена, то микроорганизмы могли бы пребывать в течение неопределенного времени в фазе роста. Такой способ положен в основу проточного культивирования м/о.

При дальнейшем культивировании наблюдается усиленное деление клеток и увеличение их количества, но клетки по сравнению с фазами роста меньше по размеру.

Следовательно, для инокуляции сорбента необходимо использовать культуру данного микроорганизма в фазе роста – в логарифмической или максимальной стационарной фазах,

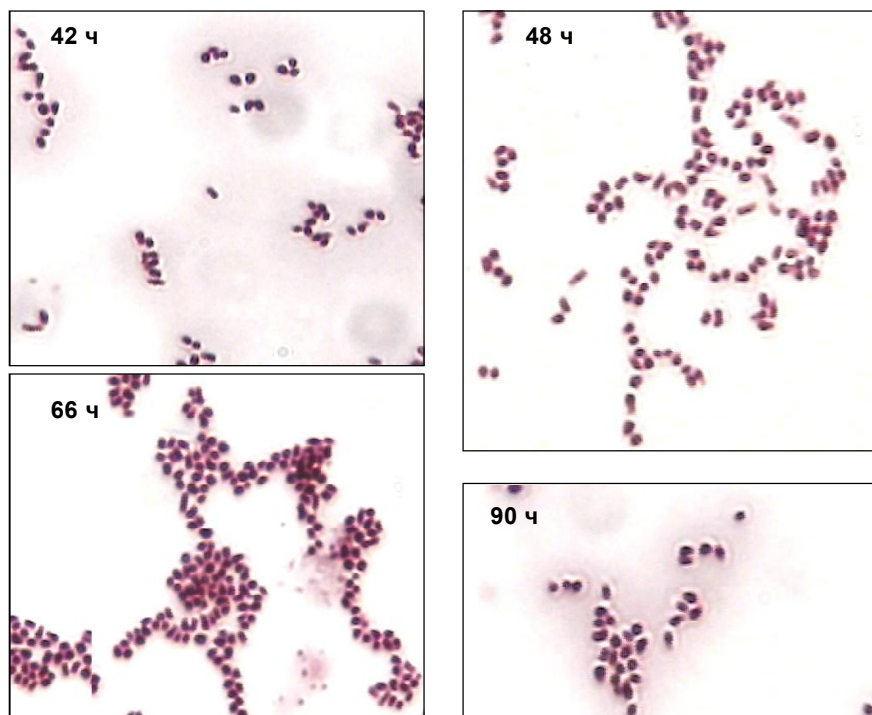


Рис. 32. *Rhodococcus erythropolis* через 42-90 часов культивирования. Фазы отмирания (увеличение 12×90).

когда клетки обладают высокой энергией роста – с 9 до 16 часов с начала культивирования.

Дрожжевые популяции, как и бактериальные, проходят 8 фаз (рис. 33-36).

Микроскопические изображения разных фаз развития дрожжевой культуры в ходе ферментации

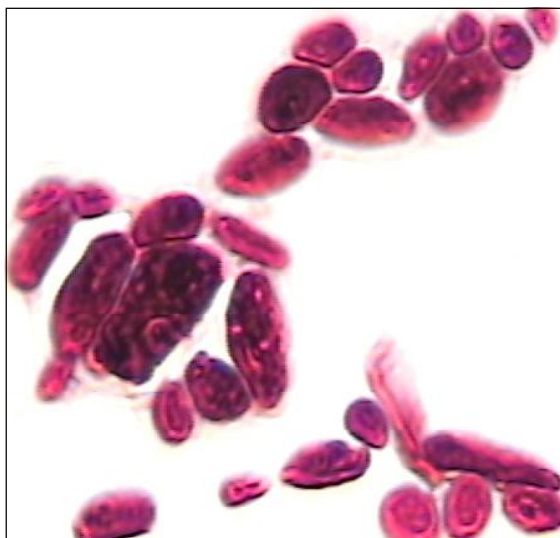


Рис. 33. Исходная посевная культура *Candida lipolytica* (увеличение 12×90).

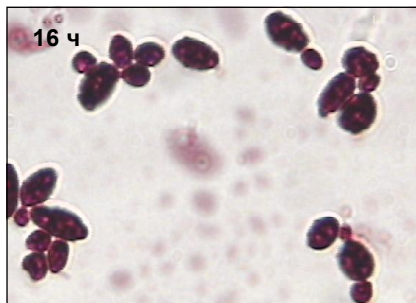


Рис. 34. *Candida lipolytica* через 4-16 часов культивирования. Лаг- и логарифмические фазы (увеличение 12×90).



Рис. 35. *Candida lipolytica* через 18-20 часов культивирования. Фаза задержанного роста и максимальная стационарная фаза (увеличение 12×90).

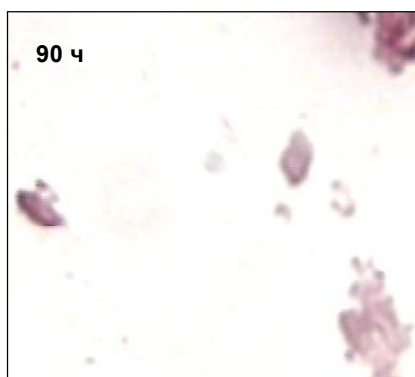
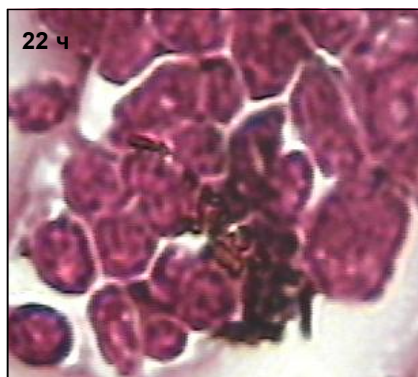


Рис. 36. *Candida lipolytica* через 22-90 часов культивирования. Фазы отмирания (увеличение 12×90).

Культуры данной дрожжевой популяции для инокуляции сорбента необходимо применять в фазах максимального роста, задержанного роста или в максимальной стационарной фазе, т.е. через 16-20 часов после начала культивирования. При дальнейшем культивировании данная дрожжевая культура не обладает высокой энергией роста.

Кроме метода просмотра окрашенных препаратов микроорганизмов из ферментера под микроскопом, для определения чистоты культуры и фаз роста индивидуальных культур для микромицетов (НК-204) пользовались определением биомассы весовым методом, для определения количества клеток дрожжей *Candida lipolytica* (НК-304) и бактерий *Rhodococcus erythropolis* НК-16 – счетной камерой и высевом на твердые среды.

Фазы роста при культивировании на сусле в биореакторе дрожжей *Candida lipolytica* (НК-304) и бактерий *Rhodococcus*

Таблица 28

Динамика роста культур нефтеокисляющих бактерий и дрожжей в процессе накопления в биореакторе (КОЕ/мл культуральной суспензии)

Время отбора проб, час.	<i>Rhodococcus erythropolis</i> – НК-16	<i>Candida lipolytica</i> – НК-304
Исх. 0	$8 \cdot 10^3$	$6.2 \cdot 10^3$
4	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$
9	$1.8 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$
12	$8.2 \cdot 10^5$	$4.1 \cdot 10^7$
16	$5.2 \cdot 10^9$	$2.85 \cdot 10^{12}$
18	$1 \cdot 10^{10}$	$4.2 \cdot 10^{11}$
20	$8.5 \cdot 10^{12}$	$1.1 \cdot 10^{12}$
22	$1 \cdot 10^{11}$	$7.56 \cdot 10^{11}$
24 (1 сутки)	$1.8 \cdot 10^{11}$	$8.8 \cdot 10^{11}$
30	$1.1 \cdot 10^{11}$	$7.8 \cdot 10^{11}$
42	$1.5 \cdot 10^{12}$	$1 \cdot 10^{12}$
48 (2 суток)	$1 \cdot 10^{13}$	$7 \cdot 10^{11}$
66 (3 суток)	$1 \cdot 10^{12}$	$1.3 \cdot 10^{12}$
90 (4 суток)	$1 \cdot 10^{11}$	$1 \cdot 10^{10}$

Примечание: *Fusarium* sp. (НК-204) не определяется.

erythropolis (НК-16) установлены на основе метода определения количества клеток микроорганизмов высевом на твердые среды (в данном случае использовалась среда сусло-агар) по результатам, представленным в табл. 28.

Фазы роста при культивировании гриба *Fusarium sp.* (НК-204), дрожжей *C. lipolytica* (НК-304) и бактерий *Rh. erythropolis* (НК-16) также установлены на основе определения их биомассы весовым методом (табл. 29).

На основе данных табл. 28, 29 определены фазы роста культур микроорганизмов, представленные в табл. 30. Клик видно из данных табл. 30, для микромицетов, дрожжей и бактерий периоды (фазы) наиболее активного размножения и роста различны, что исключает накопление этих микроорганизмов совместно и подразумевает выращивание их в ферментере автономно.

Таким образом, данные, полученные методами микроскопирования мазков, определения биомассы, подсчета клеток с помощью камеры Горяева, дали возможность определить время ферментации в ферментере для различных групп микроорга-

Таблица 29
Динамика веса сухой биомассы (г/л)
в процессе роста культур
нефтеокисляющих бактерий,
дрожжей и мицелиальных грибов
в биореакторе

Время, час.	<i>Rhodococcus erythropolis</i> – НК-16	<i>Candida lipolytica</i> – НК-304	<i>Fusarium sp.</i> – НК-204
0	0.8	0.8	0.6
4	0.9	0.8	0.6
9	1.4	1.2	1.1
12	1.6	1.4	1.3
14	1.8	1.6	1.6
16	2.0	1.7	1.8
18	2.2	1.8	2.0
20	2.4	1.9	2.6
22	2.5	2.0	3.1
24	2.6	2.1	3.4
26	2.7	2.1	3.4
30	2.8	2.0	3.3
42	2.9	2.1	3.4
48	3.0	2.1	3.2
66	2.9	2.0	3.1
90	2.8	2.0	3.1
96	2.7	2.1	3.1
120	2.6	2.0	3.1
137	2.7	2.0	2.9
144	2.6	1.9	2.8
161	2.5	1.6	2.7

Фазы роста периодической культуры

Фазы	Период (час)		
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> НК 16	<i>Candida lipolytica</i> НК 304	<i>Fusarium sp.</i> НК 204
1. Лаг-фаза	0-4	0-4	0-4
2. Фаза ускоренного роста	4-12	4-9	4-9
3. Фаза логарифмического роста	12-20	9-16	9-22
4. Фаза замедленного роста	20-30(24)	16-24	22-30
5. Стационарная фаза	30-48	24-66	30-120
6. Фаза отмирания клеток	48 -90	66-90	120-161

* Основные фазы роста культур НК-16 и НК-304 (бактерий и дрожжей) построены на основе данных количественного учета при высеве на твердой питательной среде, фазы кривой роста культуры НК-204 построены на основе данных по биомассе.

низмов, также показали невозможность их совместного культивирования в биореакторе, поскольку для микромицетов, дрожжей и бактерий периоды наиболее активного размножения и роста различны, что предполагает их автономное выращивание в ферментере.

Полевые испытания

В полевых условиях были испытаны технические средства для нанесения биосорбентов на поверхность водных объектов. Опыт был проведен на территории Усинского нефтяного месторождения на малых водотоках. К ним относятся как естественные (ручьи), так и техногенные (канавы, колеиные образования) образования. Опытный участок располагался вдоль автодороги и представлял собой систему неглубоких канав – 50-100 см, местами сообщающихся (видимо, результат транспортных нарушений), близ опытного участка проходит нефтепровод. На рис. 1, 2 (Приложение 3) показана работа механизмов, распыляющих биосорбенты.

После нанесения биосорбентов определили изменение содержания нефти в воде. Определение показало, что приме-

нение бактериально-дрожжевого биосорбента способствовало снижению начальной концентрации нефти (0.610 мг/дм^3) на 49% (определение через 4 дня после нанесения биосорбента). Под влиянием нанесенного микосорбента произошло снижение концентрации нефти в воде соседнего водотока, менее загрязненного, сорбция нефти обеспечила в тот же срок снижение нефти в воде на 19% к начальному.

Надо отметить, что при работе на водотоках с высоким уровнем загрязнения загрязненные участки следует локализовать, биосорбент с сорбированной нефтью удалять на специальные площадки – полигоны для очистки. Нефтяную пленку следует собирать новой порцией биосорбента, который можно не удалять, остаточное загрязнение будет разрушаться иммобилизованными микроорганизмами, опускающийся постепенно на дно биосорбент не вызовет загрязнения донного ила.

Таким образом, использование биосорбентов позволяет оптимизировать технологический процесс в зависимости от типа водного объекта (мелкий, крупный, глубоководный) и уровня загрязнения.

Глава 7. УТИЛИЗАЦИЯ НЕФТИ В ПОЧВЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОСОРБЕНТОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЯ ОЧИСТКИ ПОЧВЫ

Наряду с водными поверхностями в натуральных опытах испытание разработанных нами биосорбентов было проведено на нефтезагрязненной почве.

Опыт был проведен на освоенной (пахотной) дерново-подзолистой почве в течение вегетационного периода на экспериментальном участке Института биологии Коми НЦ УрО РАН. В опыте использовали две ассоциации микроорганизмов (м/о) – бактериально-дрожжевую и грибную, которые были иммобилизованы на сорбент Кировского производства «Сорбонафт» по технологии твердофазного культивирования. Кроме названных биосорбентов был использован биологически активный органический материал – БИАК, полученный нами биотехнологическим методом из гидролизного лигнина. БИАК является органическим удобрением, а также характеризуется сорбционными свойствами.

Схема опыта включала варианты:

- Контроль (без биосорбентов);
- «Сорбонафт» (без м/о);
- БИАК;
- Бактериально-дрожжевой биосорбент;
- Грибной биосорбент.

Состав грибной ассоциации: *Fusarium sp.* (НК-204), *Gliocladium deliquescens* (НК-205), *Gliocladium sp.* (НК-206). Состав бактериально-дрожжевой ассоциации: два вида бактерий: *Artrobacter sp.* (НК-15), *Rhodococcus erythropolis* (НК-16) и три вида дрожжей: *Pichia guillermondii* КБП-3205 (НК-303), *Candida guillermondii* КБП-3175 (НК-301), *Candida lipolytica* КБП-3308 (НК-304).

Повторность в опыте – трехкратная. Каждая площадка 625 см². С каждой повторности отобрали образец почвы (фон) для получения химической и микробиологической характеристики исходного состояния почвы.

Пробы для анализов (с каждой площадки смешанный образец из трех индивидуальных) регулярно отбирали в течение всего эксперимента (3 месяца) из слоя на глубину пропитки почвы нефтью (0-2 см). Определяли содержание нефти, выполняли химический, микробиологический* и ферментативный анализы.

Получение биомассы углеводородокисляющих микроорганизмов (бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы), а также прием иммобилизации на органоминеральном сорбенте описаны в главе 6.1.

Содержание нефти в пробах определяли весовым методом экстракцией нефтепродуктов гексаном из определенных навесок.

Определение энзиматической активности проводили по методике определения дегидрогеназной активности.

Количественное определение CO_2 проводили на хроматографе ЦВЕТ-800 с соответствующим программным обеспечением для проведения анализа и обработки полученных данных*.

В соответствии с целью данного опыта – утилизация нефти в почве с использованием разных биосорбентов – важным является определение критериев (критерия) оценки воздействия способа очистки, особенно при использовании биологических (микробиологических) методов деградации нефтепродуктов. В рассматриваемом опыте использовали комплексное изучение контролируемых показателей.

Одним из важных показателей биодеструкции углеводов является уровень активности дегидрогеназы. Анализ дегидрогеназы применяется в почвах и водах, загрязненных как органическими, так и неорганическими веществами, и признается в качестве полезного индикатора интенсивности метаболизма микроорганизмов. Измерение дегидрогеназной активности используется при оценке экотоксикологического влияния субстратов на окружающую среду.

* В проведении анализа участвовала И.Э. Шарапова.

Дегидрогеназа считается индикатором общей микробной активности, потому что встречается внутриклеточно во всех живых клетках микроорганизмов и связана с процессами микробиального дыхания. Поэтому было предложено использовать дегидрогеназную активность как показатель активности микроорганизмов. Действительно, многочисленные исследования обнаружили корреляции почвенной дегидрогеназной активности с метаболическими параметрами, такими как число микробиальных клеток, почвенное дыхание по выделению CO_2 .

Нами была определена актуальная активность дегидрогеназы ($\text{AD}_{\text{акт}}$) в исходных сорбентах и БИАКе (табл. 31).

Активность дегидрогеназы в органоминеральном сорбенте без иммобилизации на нем углеводородокисляющих микроорганизмов не обнаруживается. В сорбентах с иммобилизованными микроорганизмами определяется невысокая актуальная активность дегидрогеназы. Актуальная активность дегидрогеназы в грибном сорбенте составляет 0.14 мкл $\text{H}_2/\text{г}$ субстрата·ч, и в два раза выше – 0.26 мкл $\text{H}_2/\text{г}$ субстрата·ч – уровень активности фермента в бактериально-дрожжевом сорбенте.

По сравнению с органоминеральными сорбентами с иммобилизованными микроорганизмами наиболее высокая активность дегидрогеназы – 1.1 мкл $\text{H}_2/\text{г}$ субстрата·ч – определена в биологически активном компосте (БИАК).

В табл. 32 показана динамика актуальной активности дегидрогеназы в почве натурального опыта.

Данные табл. 32 показывают, что внесение биологически обогащенных материалов уже в исходных образцах спо-

Таблица 31

Актуальная активность дегидрогеназы ($\text{AD}_{\text{акт}}$) в исходных субстратах

Сорбент	$\text{AD}_{\text{акт}}$ мкл $\text{H}_2/\text{г}$ субстрата·ч
Сорбент бактериально-дрожжевой	0.26
Сорбент грибной	0.14
Сорбент без микроорганизмов	0.00
БИАК	1.1

Актуальная активность дегидрогеназы ($AD_{акт}$) в почве

№ варианта	$AD_{акт}$ мкл H_2 /г субстрата·ч, по срокам взятия образцов, сутки					
	исход-ная	7	14	29	43	88
1. Контроль	0.00	0.00	0.00	0.06	0.09	0.26
2. Сорбент без м/о	0.00	0.00	0.00	0.14	0.18	0.17
3. БИАК	0.01	0.01	0.02	0.78	0.83	0.74
4. Бактериально-дрожжевой биосорбент	0.12	0.13	0.13	0.14	0.27	0.40
5. Грибной биосорбент	0.06	0.06	0.08	0.10	0.13	0.36

способствует проявлению $AD_{акт}$, причем большей в варианте с внесением бактериально-дрожжевой ассоциации. Рассматривая динамику величины актуальной дегидрогеназной активности по вариантам, важно отметить, что первые 14 суток опыта характеризовались подавлением нефтью почвенной микробиоты, с чем связано отсутствие $AD_{акт}$ в почве вариантов 1 и 2 (см. схему опыта), а в почве вариантов 3-5 она оставалась на низком уровне. Лишь через месяц наблюдалось возрастание ферментативной активности. При этом $AD_{акт}$ оставалась самой низкой в вариантах 1 и 2, в полтора-два раза большей – в вариантах с внесением биосорбентов в конце эксперимента.

Интересно отметить, что наиболее высокий показатель $AD_{акт}$ (0.78-83 мкл H_2 /г сорбента·ч) характеризовал со второй половины опыта почву варианта с внесением БИАК (вариант 3). Заметим, что в процессе изготовления БИАК использовали грибную ассоциацию, что определило высокую $AD_{акт}$ в почве варианта 3. При этом БИАК характеризуется довольно высоким содержанием основных элементов питания, в отличие от биосорбентов.

В табл. 33 приведены результаты измерения активности выделения CO_2 («дыхание почвы»), а также общее количество микроорганизмов. Видно, что загрязнение нефтью вызвало заметное воздействие на общую биологическую активность почвы. В контрольном варианте отмечено снижение

Дыхательная активность почвы (нмоль CO_2 /час на 1 г в.с. почвы)

Вариант	Срок отбора образцов, сутки				
	Исходная почва без нефти	10	29	43	88
1	$\frac{230.3^*}{4.48 \cdot 10^7}$	$\frac{144.0}{1 \cdot 10^7}$	$\frac{375.6}{\text{не опред.}}$	$\frac{280.6}{1.12 \cdot 10^8}$	$\frac{424.5}{1.96 \cdot 10^8}$
2	$\frac{235.7}{1.37 \cdot 10^7}$	$\frac{215.4}{1.62 \cdot 10^7}$	$\frac{293.5}{\text{не опред.}}$	$\frac{273.5}{1.11 \cdot 10^8}$	$\frac{452.3}{2 \cdot 10^8}$
3	$\frac{234.3}{2.96 \cdot 10^7}$	$\frac{310.0}{3.69 \cdot 10^7}$	$\frac{439.3}{\text{не опред.}}$	$\frac{441.4}{4.08 \cdot 10^8}$	$\frac{520.5}{4.68 \cdot 10^8}$
4	$\frac{223.2}{3.42 \cdot 10^7}$	$\frac{290.5}{1.6 \cdot 10^7}$	$\frac{339.1}{\text{не опред.}}$	$\frac{382.6}{1.42 \cdot 10^8}$	$\frac{505.5}{2.73 \cdot 10^8}$
5	$\frac{219.3}{3.97 \cdot 10^7}$	$\frac{324.5}{3.86 \cdot 10^7}$	$\frac{491.2}{\text{не опред.}}$	$\frac{486.7}{2.05 \cdot 10^8}$	$\frac{473.2}{1.98 \cdot 10^8}$

* В числителе – активность выделения CO_2 , в знаменателе – общее микробное число КОЕ/1 г в.с.п.

выделения CO_2 и общей численности м/о. Однако в вариантах с внесением биосорбентов, в том числе БИАК, наблюдалось даже некоторое увеличение дыхания почвы. Через месяц в контроле восстанавливается общая биологическая активность в загрязненном слое, по-видимому, за счет аборигенных м/о. Вместе с этим, важно, что по сравнению с контролем большие показатели характеризуют варианты с биосорбентами и особенно с БИАК (варианты 3, 4, 5).

Можно отметить, что рассмотренный показатель хорошо согласуется с данными определения дегидрогеназы, позволяя с большей определенностью судить об эффективности воздействия биосорбентов и особенно БИАК. Более высокий эффект БИАКа обусловлен обогащением его ассоциацией мигцелиальных грибов, используемых в биотехнологическом процессе получения биологически активного компоста, что отмечено выше.

Как видно из данных табл. 34, в почве контрольного варианта (вариант 1) лишь только через полтора месяца существенно понизилось содержание нефти (около 50% от начального уровня). Еще через полтора месяца остаточное загряз-

нение было около 7%. Надо отметить, что внесение сорбента без м/о (вариант 2) по результату было близким к контролю.

Как и следовало ожидать, воздействие биосорбентов (варианты 4, 5) существенно ускорило деструкцию нефти в почве. Уже через 10 суток содержание остаточной нефти составило 38-44% от внесенного количества.

Обращает на себя внимание заметный положительный эффект от внесения в загрязненную почву БИАК (вариант 3). Через полтора месяца остаточное содержание нефти составило 27%. К концу эксперимента почва полностью очистилась от нефти, как и в вариантах 4, 5.

Почва, на которой был проведен опыт, характеризуется невысоким содержанием основных элементов питания (табл. 35), соответственно азота 6.2-7.3 мг/100 г почвы, фосфора – 15.9-17.8-21.9-24.2, от 6.0-7.5 до 9.0-10.5 мг/100 г почвы – калия.

Через 10 суток обращает на себя внимание существенное увеличение содержания азота в варианте с внесением БИАК. Это объясняется высоким содержанием азота, фосфора, калия в массе БИАК, благодаря чему активизируется аборигенная микробиота. С этим, видимо, связаны наиболее высокие показатели АД_{акт}, выделения CO₂, связанные с жизнедеятельностью микроорганизмов не только за счет почвенных, но и вносимых дополнительно с БИАК микроорганизмов. Интересно добавить, что через 43 дня (середина эксперимен-

Таблица 34

Динамика содержания остаточной нефти (%) в почве опыта

Вариант	Срок отбора, сутки				
	Исходная концентрация нефти по вариантам	10	29	43	88
1	7.3 (100)	5.5 (75.3)	5.5 (75.3)	3.8 (52)	0.5 (6.8)
2	7.3 (100)	4.5 (61.6)	3.8 (52)	3.5 (47.9)	0.33 (4.5)
3	7.3 (100)	4.5 (61.6)	3.75 (51.3)	2 (27.4)	0 (0)
4	7.3 (100)	3.25 (44.5)	2.25 (30.8)	1.2 (16.3)	0 (0)
5	7.3 (100)	2.75 (37.7)	2.2 (30.1)	0.7 (9.5)	0 (0)

Результаты химического анализа почвы

Срок отбора проб, сутки	Вариант опыта	Содержание остаточной нефти в почве	Химические показатели почвы		
			Азот гидролизуемый	Фосфор	Калий
			мг/100 г в.с.п.		
0 (исходный)	№ 1	7.3	7.28	24.2	7.53
	№ 2	7.3	6.72	17.8	10.54
	№ 3	7.3	6.16	21.97	9.03
	№ 4	7.3	5.6	15.91	6.02
	№ 5	7.3	6.72	16.67	10.54
10	№ 1	4.5	4.48	16.67	12.8
	№ 2	3.83	7.84	11.0	15.06
	№ 3	3.41	21.28	16.68	16.56
	№ 4	4.33	7.84	13.2	10.54
	№ 5	1.92	6.72	16.3	15.8
43	№ 1	2.5	4.9	15.52	7.53
	№ 2	2.5	6.72	11.74	9.03
	№ 3	2.0	6.72	15.15	15.06
	№ 4	1.0	10.0	12.88	10.54
	№ 5	0.5	6.16	16.3	11.3
88	№ 1	0.2	5.6	11.55	4.29
	№ 2	0.33	4.48	8.9	3.84
	№ 3	0.0	10.08	13.44	6.4
	№ 4	0.0	5.6	5.68	4.71
	№ 5	0.0	5.04	7.39	5.12

та) содержание азота в варианте «БИАК» (№ 3) резко снизилось (до 6.7 мг/100 г почвы) параллельно со снижением содержания остаточной нефти. В конце эксперимента при полной очистке почвы от нефти в варианте «БИАК» наблюдается увеличение содержания азота (отсутствует его потребление м/о).

В целом по всем другим вариантам можно отметить тенденцию к снижению содержания легкоусвояемых веществ от начала опыта к его концу, поскольку использовались эти элементы из почвы (без дополнительного внесения с удобрением).

ниями). С низким содержанием в исходной почве легкодоступных элементов питания связаны и более низкие показатели микробной активности $AD_{\text{акт}}$ и общей биологической активности почвы («дыхание почвы» по выделению CO_2) по сравнению с БИАК.

Таким образом, при внесении биосорбентов в загрязненные нефтью бедные питательными веществами почвы для эффективного воздействия биосорбентов необходимо внесение дополнительно питательных веществ.

Изменение состава микобиоты в почве по вариантам опыта

Представляет интерес выявление изменения состава микробиоты в почве рассматриваемого опыта. Выявлено, что в составе микробиоты под воздействием нефти заметно снижается доля доминирующих и часто встречающихся микромицетов, характерных для незагрязненной (фоновой) почвы (табл. 36), возрастает доля некоторых до этого редко встречавшихся микроорганизмов. К этому нужно добавить, что в составе микромицетов появляются виды, не обнаруженные в исходной, незагрязненной освоенной почве: *Aspergillus wentii*, *A. ochraceus*, *Penicillium chrysogenum*, *P. lanosum*, *P. tardum*, *Paecilomyces carneus*. Эти микроорганизмы, устойчивые к нефтезагрязнению (Киреева, 2000), начинают активно развиваться уже через неделю после внесения нефти в почву.

Как видно из данных табл. 36, через 10 суток произошло заметное обеднение состава микромицетов как в контроле, так и в вариантах с внесением биосорбентов и органоминерального удобрения БИАК. В этих вариантах доминирующее положение занимают вид *P. tardum* и темноокрашенный микромицет семейства *Dematiaceae*, представленный стерильным мицелием, который не был обнаружен в сообществе исходной, фоновой почвы. При внесении сорбента и органоминерального удобрения БИАК количество видов увеличивается, но остается меньшим, чем в вариантах с использованием бактериально-дрожжевого и грибного биосорбентов.

Динамика видового состава почвенных микромицетов в вариантах полевого опыта

Сроки проведения учётных работ, сутки	Варианты опыта, №					Контроль (№ 1)
	Степень доминирования	БИАК (№ 3)	Сорбент (бактерии + дрожжи) (№ 4)	Сорбент грибной (№ 5)		
Исходный	Доминанты	<i>Paezilomyces variotii</i> var. <i>variotii</i> Bainier (№ 2)	<i>Paezilomyces variotii</i> var. <i>variotii</i> Bainier	<i>Paezilomyces variotii</i> var. <i>variotii</i> Bainier	<i>Paezilomyces variotii</i> var. <i>variotii</i> Bainier	<i>Paezilomyces variotii</i> var. <i>variotii</i> Bainier
	Часто встречающиеся	<i>Mortierella</i> sp. <i>M. rammanniana</i> (Moller) Linnem <i>M. isabellina</i> Oudem. <i>M. jenikini</i> Smith <i>Mycella sterilia</i> (светлоокаш.) <i>Chaetomium globosum</i> Kunze <i>Ch. spirale</i> Zopf <i>Paezilomyces variotii</i> var. <i>variotii</i> Bainier <i>Ch. indicum</i> Corda <i>Chryso sporium pannorum</i> (Link) S. Hughes <i>M. sterilia</i> (r/o) <i>P. soppitii</i> Zaleski <i>M. sterilia</i> (r/o) <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) de Vries <i>Trichoderma hamatum</i> (Bon.) Bainier <i>T. viride</i> Pers.:Fr. <i>P. soppitii</i> Zaleski	<i>Mortierella</i> sp. <i>M. rammanniana</i> (Moller) Linnem <i>M. isabellina</i> Oudem. <i>Mycella sterilia</i> (светлоокаш.) <i>Chaetomium globosum</i> Kunze <i>Ch. spirale</i> Zopf <i>Ch. indicum</i> Corda <i>Chryso sporium pannorum</i> (Link) S. Hughes <i>M. sterilia</i> (r/o) <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) de Vries <i>Trichoderma hamatum</i> (Bon.) Bainier <i>T. viride</i> Pers.:Fr. <i>P. chrysogenum</i> Thom <i>Dicoccum minutissimum</i> Corda <i>P. soppitii</i> Zaleski	<i>Mortierella</i> sp. <i>M. rammanniana</i> (Moller) Linnem <i>M. isabellina</i> Oudem. <i>Mycella sterilia</i> (светлоокаш.) <i>Chaetomium globosum</i> Kunze <i>Ch. spirale</i> Zopf <i>Ch. indicum</i> Corda <i>Chryso sporium pannorum</i> (Link) S. Hughes <i>M. sterilia</i> (r/o) <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) de Vries <i>Trichoderma hamatum</i> (Bon.) Bainier <i>T. viride</i> Pers.:Fr. <i>P. chrysogenum</i> Thom <i>M. rammanniana</i> (Moller) Linnem <i>P. soppitii</i> Zaleski	<i>Mortierella</i> sp. <i>M. rammanniana</i> (Moller) Linnem <i>M. isabellina</i> Oudem. <i>Mycella sterilia</i> (светлоокаш.) <i>Chaetomium globosum</i> Kunze <i>Ch. spirale</i> Zopf <i>Ch. indicum</i> Corda <i>Chryso sporium pannorum</i> (Link) S. Hughes <i>M. sterilia</i> (r/o) <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) de Vries <i>Trichoderma hamatum</i> (Bon.) Bainier <i>T. viride</i> Pers.:Fr. <i>P. chrysogenum</i> Thom <i>Mucor</i> sp. <i>P. soppitii</i> Zaleski	<i>Mortierella</i> sp. <i>M. rammanniana</i> (Moller) Linnem <i>M. isabellina</i> Oudem. <i>Mycella sterilia</i> (светлоокаш.) <i>Chaetomium globosum</i> Kunze <i>Ch. spirale</i> Zopf <i>Ch. indicum</i> Corda <i>Chryso sporium pannorum</i> (Link) S. Hughes <i>M. sterilia</i> (r/o) <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) de Vries <i>Trichoderma hamatum</i> (Bon.) Bainier <i>T. viride</i> Pers.:Fr. <i>P. chrysogenum</i> Thom <i>Mucor</i> sp. <i>P. soppitii</i> Zaleski
	Редко встречающиеся	<i>Paezilomyces carneus</i> (Duche et Heim) Brown et G. Sm. <i>Penicillium camemberti</i> Thom	<i>T. hamatum</i> (Bonord.) Bainier <i>Penicillium funiculosum</i> Thom <i>M. rammanniana</i> (Moller) Linnem	<i>Chryso sporium pannorum</i> (Link) S. Hughes <i>M. vinacea</i> Dixon-Stewart	<i>Mortierella</i> sp. <i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	<i>Mycella sterilia</i>

Сроки проведения учений, сутки	Степень доминирования	Варианты опыта, №№				Сорбент грибной (№ 5)	Контроль (№ 1)
		Сорбент "Сорбент-нафт" без иммобилизованных микроорганизмов (контроль) (№ 2)	БИАК (№ 3)	Сорбент (бактерии + дрожжи) (№ 4)	Сорбент (№ 5)		
		<i>P. funiculosus</i> Thom <i>P. simplicissimum</i> Thom <i>P. chrysogenum</i> Thom <i>Mycelia sterilia</i> (c/o.) <i>M. sterilia</i> (m/o) Неидентиф. (Dematiaceae)					
10	Доминанты	<i>Mycelia sterilia</i> (т/о) <i>P.tardum</i> Thom	<i>Mycelia sterilia</i> (темноокрашен.) <i>P.tardum</i> Thom	<i>Trichoderma hamatum</i> (Bon.)Bainier <i>Paecilomyces variotii</i> var. <i>variotii</i> Bainier <i>Mycelia sterilia</i> (т/о)	<i>Pochro-chloron Bionige</i> <i>Paecilomyces variotii</i> var. <i>variotii</i> Bainier	<i>P.tardum</i> Thom <i>Mycelia sterilia</i> (т/о) <i>Chaetomium globosum</i> Kunze	
	Часто встречающиеся	<i>Chaetomium globosum</i> Kunze <i>Paecilomyces variotii</i> var. <i>variotii</i> Bainier	<i>Mortierella</i> sp. <i>Trococeum</i> Blisset <i>Mucor citrinelloides</i> van Tiegh <i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Paecilomyces variotii</i> var. <i>variotii</i> Bainier	<i>Mortierella</i> sp. <i>Mycelia sterilia</i> (светлоокраш.) <i>Chaetomium globosum</i> Kunze <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) de Vries <i>P. chrysogenum</i> Thom <i>Dicoccum minutissimum</i> Corda	<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom)Samson <i>P.variotii</i> var. <i>variotii</i> Bainier <i>Penicillium funiculosum</i> Thom <i>P.purpurogenum</i> Stoll <i>P. chrysogenum</i> Thom <i>P.tardum</i> Thom <i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Pochro-chloron Bionige</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) de Vries <i>Gliocladium deliquescens</i> Sopp. <i>Fusarium lateritium</i> Nees ex Fries	<i>P. funiculosus</i> Thom	

Сроки проведения учений, сутки	Степень доминирования	Варианты опыта, №№				Контроль (№ 1)
		Сорбент "Сорбонафт" без иммобилизующих микроорганизмов (контроль) (№ 2)	БИАК (№ 3)	Сорбент (бактерии + дрожжи) (№ 3)	Сорбент грибной (№ 5)	
43	Редко встречающиеся	<i>P.tardum</i> Thom <i>M. sterilia</i> (темноокраш.) <i>Chaetomium globosum</i> Kunze	<i>M. sterilia</i> (темноокраш.) <i>P.tardum</i> Thom	<i>Chyso sporium pannorum</i> (Link) S. Hughes <i>Trichoderma hamatum</i> (Bon.) Bainer <i>Paecilomyces variotii</i> var. <i>variotii</i> Bainer <i>Mycelia sterilia</i> (v/o)	<i>Mortierella</i> sp. <i>Mycelia sterilia</i> (c/o.)	
	Часто встречающиеся	<i>Ch. spirale</i> Zopf <i>Ch. indicum</i> Corda <i>Aspergillus wentii</i> Wehmer <i>A. ochraceus</i> Wilhelm	<i>Mortierella</i> sp.	<i>Mortierella</i> sp. <i>Mycelia sterilia</i> (самоокупа.) <i>Chaetomium globosum</i> Kunze <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) de Vries <i>P. chrysogenum</i> Thom <i>Dicoccum minutissimum</i> Corda	<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson <i>P. variotii</i> var. <i>variotii</i> Bainer <i>Penicillium funiculosum</i> Thom <i>P. purpurogenum</i> Stoll. <i>P. chrysogenum</i> Thom <i>P.tardum</i> Thom <i>Mortierella</i> sp. <i>P.ochro-chloron</i> Bionge <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) de Vries <i>Gliocladium deliquescens</i> Sopp. <i>Fusarium lateritium</i> Nees ex Fries <i>Mycelia sterilia</i> (c/o.)	<i>P.tardum</i> Thom <i>M. sterilia</i> (v/o) <i>Aspergillus wentii</i> Wehmer <i>A. ochraceus</i> Wilhelm <i>Chaetomium globosum</i> Kunze
	Редко встречающиеся	<i>Mortierella</i> sp. <i>M. isabellina</i> Oudem. <i>Mycelia sterilia</i> (c/o.)	<i>Chyso sporium pannorum</i> (Link) S. Hughes <i>T. croceum</i> Bisset <i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Chyso sporium pannorum</i> (Link) S. Hughes <i>Diplococcus</i> sp.	<i>Trichoderma hamatum</i> (Bon.) Bainer T.v inde Pers. .Fr. P.soppit Zaleski	<i>Mortierella</i> sp. <i>P.tardum</i> Thom <i>Trichoderma hamatum</i> (Bon.) Bainer

Сроки проведения у че- тов, сутки	Степень домини- рования	Варианты опыта, №№					Контроль (№ 1)
		Сорбент "Сорбо- нафт" без иммобили- зованных микроорга- низмов (контроль) (№ 2)	БИАК (№ 3)	Сорбент (бактерии + дрожжи) (№ 4)	Сорбент грибной (№ 5)		
88	Доминанты	<i>M. sterilia</i> (темноо- крашен.)	<i>Paecilomyces variotii</i> var. <i>variotii</i> Bainier <i>M. sterilia</i> (t/o) <i>Ch. spirilliferum</i> Bain	<i>M. sterilia</i> (nr/o) <i>M. sterilia</i> (c/o.)	<i>Paecilomyces variotii</i> var. <i>variotii</i> Bainier.	<i>M. sterilia</i> (t/o)	
	Часто встре- чающиеся	<i>Cladosporium cla- dosporioides</i> (Fresen.) de Vries <i>P. chrysogenum</i> Thom <i>P. lanosum</i> Westling <i>P.tardum</i> Thom <i>Ch.spitale</i> Zopf <i>Paecilomyces carneus</i> (Duche et Heim) Brown et G. Sm.	<i>Paecilomyces lilac- inum</i> Mortierella sp. <i>Ch. pannorum</i> (Link) S. Hughes <i>P. chrysogenum</i> Thom	<i>Diplococcus</i> sp. <i>Penicillium camemberti</i> Thom <i>P. funiculosum</i> Thom <i>P.simplissimum</i> Thom <i>P. chrysogenum</i> Thom	<i>Mycelia sterilia</i> (c/o) <i>P.purpurogenum</i> <i>Cladosporium cladospori- oides</i> (Fresen.) de Vries <i>Glodiadium deliquescens</i> Sopp. <i>Fusarium lateritium</i> Nees ex Fries <i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom)Samson <i>P. chrysogenum</i> Thom Mortierella sp. <i>P.ochro-chloron</i> Bionige <i>Cladosporium cladospori- oides</i> (Fresen.) de Vries <i>Glodiadium deliquescens</i> Sopp. <i>Fusarium lateritium</i> Nees ex Fries	<i>P. chrysogenum</i> <i>P. funiculosum</i> Thom <i>P. chrysogenum</i> Thom <i>P. lanosum</i> Westling <i>P.tardum</i> Thom	
	Редко встре- чающиеся	<i>Paecilomyces carneus</i> (Duche et Heim) Brown et G.Sm. <i>Mycelia sterilia</i> (c/o.) <i>Chrysosporium pan- norum</i> (Link) S. Hugh- es	<i>Diplococcus</i> sp. <i>Trichoderma hama- tum</i> (Bon.)Bainier <i>Aureobasidium pullu- lanis</i>	<i>Glodiadium</i> sp. <i>Chaetoridium globosum</i> Kunze <i>Chrysosporium panno- rum</i> (Link) S. Hughes	<i>P.tardum</i>	<i>Trichoderma hamatum</i> (Bon.) Bainier <i>Mycelia sterilia</i> (c/o) <i>Paecilomyces variotii</i> var. <i>variotii</i> Bainier	

Однако и в этих вариантах с применением биосорбентов также произошло перераспределение видов микромицетов по доминированию, что характерно для зоны стресса в микробной системе почвы. Об этом позволяет судить полное исчезновение видов и низкое сокращение видов р. *Chrysosporium*, р. *Trichoderma*, р. *Mortierella*, р. *Penicillium*, р. *Chaetomium* (табл. 36).

Микробиологический анализ проб, проведенный через 88 суток, показал активное восстановление видового состава микромицетов во всех вариантах опыта. Варианты с использованием биосорбентов характеризуются появлением светлоокрашенных микромицетов, что является показателем приближения окончания процесса очистки нефтезагрязненного субстрата. В контроле к этому же сроку продолжают преобладать токсинообразующие микромицеты, что свидетельствует о еще не завершенном процессе деструкции нефти, согласующемся с наличием остаточного загрязнения (табл. 36).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Со второй половины XX в. промышленное освоение природных ресурсов (угля, нефти, газа и др.) интенсивно ведется на Крайнем Севере. Загрязнение нефтью и нефтепродуктами природной среды в районах добычи и транспорта нефти представляет серьезную экологическую проблему. Специфические климатические условия, наличие многолетнемерзлых пород, легко разрушаемые при техногенном воздействии и медленно восстанавливающиеся природные экосистемы – все это требует особого методологического подхода к разработке экологически обоснованных приемов, эффективных в условиях короткого в течение года биологически активного периода, обеспечивающих очистку нефтезагрязненных природных объектов и восстановление разрушенных экосистем.

В монографии рассмотрены результаты изучения экологически оптимизированной системы приемов очистки нефтезагрязненных природных объектов с учетом природно-климатической специфики Севера.

При очистке нефтезагрязненных объектов природной среды (водоемы, водотоки, почвы) используются сорбенты разного состава, а также микробиологические препараты, распыляемые на загрязненные компоненты природной среды.

Основу предложенной оптимизированной технологии восстановления загрязненных объектов составляет сочетание физических и биологических приемов. Разработана технология изготовления гидрофобного нефтяного сорбента из торфа, основу которой составляет термическая обработка торфа при 300 °С в течение 3 ч без доступа воздуха.

Для сравнения в качестве исходного сырья были использованы верховой и переходный торфа из Московской, Кировской и Калининградской областей, а также из Республики Коми.

Наилучшие результаты показывают сорбенты, изготовленные из верхового торфа месторождений Кировской области. Они поглощают 803% нефти за 30 секунд, впитывают влагу за сутки погружения не более 214% и плавают на поверхности воды не менее 30 суток.

На основе этого продукта был получен биосорбент при иммобилизации ассоциаций микроорганизмов – деструкторов нефти.

В первой части настоящей работы рассмотрены результаты подбора углеводородокисляющих микроорганизмов, исследования их активности в жидких средах и почвах, рекомендованы методы ее оценки.

Изучено воздействие низких отрицательных температур и восстановление жизнедеятельности микроорганизмов после оттаивания микробной массы.

Показана эффективность в качестве деструкторов нефти ассоциаций микроорганизмов. Исследованы бактериально-дрожжевая и грибная ассоциации.

Была выполнена серия опытов по очистке нефтезагрязненного сорбента с помощью изученных штаммов микроорганизмов и их ассоциаций. По результатам предложены практические рекомендации.

Полученные результаты были использованы для разработки приема и технологии создания новой группы сорбентов – биосорбентов. Способ их получения, изучение эффективности применения на водных поверхностях и в почвах приведены во второй части настоящей работы.

Проведенные многоаспектные исследования микробиологических методов очистки нефтезагрязненных природных компонентов (водные поверхности, почвы) позволили предложить систему комплекса приемов, сочетающих использование при высоких уровнях загрязнения гидрофобного сорбента на начальной стадии и биосорбентов на стадии доочистки. Гидрофобный сорбент с поглощенной нефтью на специальной площадке (полигоне) очищается биопрепаратами на фоне удобрений и может быть использован как удобрительный материал при озеленении поселков, а также повторно

в качестве сорбента. Скорость очистки сорбента после сбора нефти зависит от сезона года и соблюдения рекомендаций по применению препаратов.

Экологически безопасный, нетоксичный биосорбент, использованный при доочистке, может не удаляться с очищаемого водоема, поскольку под воздействием иммобилизованных микроорганизмов остаточное загрязнение не будет превышать ПДК, а опускающаяся на дно очищенная масса будет вовлечена в оборот органического углерода.

При умеренной степени загрязнения мелкие водотоки обрабатываются один-два раза биосорбентом, который не удаляется с поверхности. Наличие кислорода в воде, удовлетворительный тепловой режим способствуют разложению нефти, поглощенной биосорбентом, не только на поверхности, но и в части, осевшей на дно мелкого водоема.

Итак, результаты исследований позволили:

- разработать опытно-промышленную технологию производства сорбента из природного материала и на его основе – биосорбентов;
- подобрать безвредные природные микроорганизмы, обладающие высокой деструктивной активностью в отношении нефтепродуктов;
- отработать методы препаратного культивирования выбранных штаммов на плотных питательных средах и в условиях биореактора;
- разработать методики иммобилизации ассоциаций микроорганизмов на поверхность сорбента-носителя;
- испытать практическое применение разработанной технологии с применением биосорбентов.

Биосорбенты испытаны на загрязненных нефтью водных объектах и почве. На основе проведенных экспериментов рекомендована технологическая схема:

- применение биосорбента методом его распыла на нефтезагрязненную водную поверхность без его последующего сбора в местах, непроходимых для технических средств;
- применение биосорбентов для биоремедиации нефтезагрязненных земель с использованием комплексных минеральных и органических удобрений;

– замораживание-оттаивание препаратов, насыщенных нефтью, не приводит к гибели микроорганизмов, что позволяет использовать препарат, нанесенный на поверхность загрязненного водоема, до наступления заморозков с возобновлением его активности при положительных значениях температуры (весной).

Результаты работы могут быть рекомендованы организациям, занимающимся биоремедиацией загрязненных нефтью почв и водной поверхности как в России, так и за рубежом (Хабибуллина и др., 2005; Хабибуллина и др., 2007).

Предложенная на основе результатов детальных биологических исследований оптимизированная технология очистки нефтезагрязненных природных компонентов является частью двухэтапной системы природовосстановления с учетом специфики природных условий Крайнего Севера, разработанной в Институте биологии Коми НЦ Уральского отделения Российской академии наук (Арчегова, 1998; Восстановление земель на Севере, 2000).

Представленные в настоящей работе результаты биологических исследований дают экологическое обоснование новым методологическим подходам и развитию оптимизированных технологий восстановления разрушенных, в том числе нефтезагрязненных, объектов природной среды с учетом особенностей климатических условий Севера, без чего невозможно стабильное развитие экономики в различных регионах нашей обширной страны. Опыт решения экологических проблем, изложенный в настоящей работе, актуален и для других стран.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Арчегова И.Б., Маркарова М.Ю., Громова О.В. Способ получения органического удобрения. Патент № 2094414, зарегистрирован 27.10.1997.

Арчегова И.Б. Эффективная система природовосстановления – основа перспективного природопользования на Крайнем Севере. Сыктывкар, 1998. С. 10 (Сер. Науч. докл. / Коми НЦ УрО РАН; Вып. 412).

Биотехнология. В 8 кн. / Под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. Кн. 7. Иммуобилизованные ферменты / И.В. Березин, Н.Л. Клячко, А.В. Левашов и др. М.: Высшая школа, 1987. 159 с.

Воробейчик Е.Л., Садыков О.Ф., Фарафонов М.Г. Экологическое нормирование техногенных загрязнений наземных экосистем (локальный уровень). Екатеринбург: УИФ «Наука», 1994. 280 с.

Готтшалк Г. Метаболизм бактерий. М.: Мир, 1982. 310 с.

Егорова Л.Н. Почвенные грибы Дальнего Востока: Гифомицеты. Л.: Наука, 1986. 192 с.

Исмаилов Н.М. Биодegradация нефтяных углеводов в почве, инокулированной дрожжами // Микробиология, 1985. Т. 54, № 5. С. 835-841.

Квасников Е.М., Ключникова Т.М. Микроорганизмы – деструкторы нефти в водных бассейнах. Киев: Наукова думка, 1981. 132 с.

Киреева Н.А. Биодеструкция нефти в почве культурами углеводородокисляющих микроорганизмов // Биотехнология, 1996. № 1. С. 51-54.

Киреева Н.А., Водопьянов В.В., Мифтахова А.М. Биологическая активность нефтезагрязненных почв. Уфа: Изд-во «Гилем», 2001. 376 с.

Киреева Н.А., Галлимзянова Н.Ф., Мифтахова А.М. Микробицеты почв, загрязненных нефтью, и их фитотоксичность // Микология и фитопатология, 2000. Т. 34. Вып. 1. С. 36-41.

Литвинов М.А. Методы изучения почвенных микроскопических грибов. Л.: Наука, 1969. 118 с.

Краткий определитель по Берги. М.: Мир, 1980. 495 с.

Лосев К.С., Мнакацян Р.А., Дронин Н.М. Потребление возобновляемых ресурсов: экологические и социально-экономи-

ческие последствия (глобальные и региональные аспекты). М.: ГЕОС, 2005. 157 с.

Макаров В.Н. Газовый режим почвы. М.: ВО «Агропромиздат», 1988. 105 с.

Методы общей бактериологии. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхардта и др. М.: Мир, 1983. 536 с.

Милько А.А. Определитель мукооральных грибов. Киев: Наукова думка, 1974. 303 с.

Назаров С.К., Сивков М.Д. Методы измерения и расчета баланса углерода в естественных фитоценозах. Сыктывкар, 1992. 16 с. – (Сер. Новые научные методики / Коми НЦ УрО РАН; Вып. 43).

Новые методы исследования нефтей / Под ред. А.И. Богомолова. Л.: Наука, 1984. 471 с.

Пидопличко Н.М. Пенициллин. Киев: Наукова думка, 1972. 150 с.

Практикум по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. М.: Изд-во МГУ, 1976. 307 с.

Руссо Р.С. Информационная система по токсичности стоков сложного состава // Проблемы водной токсикологии, биотестирования и управления качеством воды. Л., 1986. С. 151-163.

Семенов А.Н. Осцилляции микробных сообществ в почвах. Перспективы развития почвенной биологии // Сб. к 250-летию МГУ им. М.В. Ломоносова. М.: МАКС-Пресс, 2001. С. 57-72.

Терехова В.А. Биотестирование как метод определения класса опасности отходов // Экология и промышленность России, 2003. № 12. С. 76-84.

Терехова В.А., Швед Л.Г. Изменчивость морфобиохимических признаков водных грибов под воздействием тяжелых металлов // Экология, 1994. Т. 6. С. 77-79.

Терехова В.А., Семенова Т.А., Головченко А.В., Трофимов С.Я. Влияние нефтяного загрязнения на деструкционную активность и состояние микобиоты олиготрофных торфяников Западной Сибири // Экобиотехнология: борьба с нефтяным загрязнением окружающей среды. Тез. докл. конф. Пущино: ИБФМ, 2001.

Хабибуллина Ф.М., Арчегова И.Б., Ибатуллина И.З. и др. Биосорбент для очистки водной поверхности от нефти и нефтепродуктов. Патент на изобретение № 2299181, зарегистр. 20.05.2007.

Хабибуллина Ф.М., Терехова В.А., Арчегова И.Б. и др. Микосорбент для очистки водной поверхности от нефтяных загрязнений. Решение о выдаче патента на изобретение патента на изобретение, заявка № 2005125503/13(028653) от 10.08.2005.

Хазиев Ф.Х. Ферментативная активность почв. Методическое пособие. М.: Наука, 1976. 180 с.

Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. М.: Наука, 1990. 189 с.

Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация. М.: МГУ, 1986. 132 с.

Шумный В.К., Сидорова К.К., Клевенская И.Л. и др. Биологическая фиксация азота. Новосибирск: Наука. Сиб. отд., 1991. 271 с.

Экологические основы восстановления экосистем на Севере. Екатеринбург: УрО РАН, 2006.

Ratledge G. Degradation of aliphatic hydrocarbons // Appl. Sci. Publ., 1978. P. 1-46.

Ramirez C. Manual and atlas of the Penicillia. Amsterdam; New-York-Oxford: Elsevier Biomedical Press, 1982. 874 p.

Raper B., Thom C., Fennell D.I. A manual of Penicillia. New-York-London: Hafner Publishing Company, 1968. 875 p.

Yakovlev A.S., Tumencev I.V., Yakovlev S.A. et al. Estimate of Ecological Soil Toxicity Using Biotestmethods (on the solid Waste Ranges in Moscow Region) The 2-nd Int. Congress Waste-Tech-2001. Moscow, 2001. 620 p.

СОЗДАНИЕ ОПТИМАЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ СОРБЕНТА-НОСИТЕЛЯ

Математическое обоснование модели сорбента-носителя для микроорганизмов

Математическое обоснование модели сорбента-носителя для микроорганизмов с оптимизацией его структурно-поверхностных элементов позволило бы подобрать оптимальное исходное сырье для производства сорбента с последующей отработкой режимов его производства.

Для этого необходимо:

- теоретически оценить параметры сорбентов, определяющие нефтеемкость и плавучесть;
- оценить допустимую степень «утяжеления» сорбентов биокультурой с точки зрения изменения плавучести и нефтеемкости;
- сравнить возможные различные схемы иммобилизации биокультур и выбрать наиболее рациональные;
- предложить расчетные формулы для определения нефтеемкости сорбента с биокulturой и без нее.

Основой разрабатываемого сорбента является торф, структура которого отличается большой сложностью. Практически невозможно охарактеризовать данную структуру каким-то одним количественным критерием, которым можно было бы учесть величину, форму, взаимное расположение и соотношение слагающих его элементов и т.д. Для приближенных расчетов обычно рассматривают капиллярно-пористые модельные тела. Для определения пористой структуры сорбента и ее модели была взята система цилиндрических связанных между собой капиллярных трубок и система соприкасающихся сферических частиц, так как первая в большей мере соответствует сплошным капиллярно-пористым телам, вторая – дисперсным материалам (порошок, крошка). Учитывая, что каждая частица дисперсного материала обладает собственной пористостью, то целесообразно сочетание этих двух моделей.

Размеры пор в торфе чаще изменяются от 0.35 до 8.5 мкм, что относит его к мезо-пористым грубодисперсным системам. Экспериментальные кривые распределения сквозных пор по размерам в торфе удовлетворительно аппроксимируются логарифмически нормальным и гамма-распределением.

Максимум на кривых распределения сдвинут в сторону меньших пор, в которых подвижная среда (например, вода или нефтепродукт) остается неподвижной даже при высоких гидравлических напорах.

Сопоставляя размер частиц биокультуры и параметры пористой структуры торфа, можно сделать вывод о том, что для иммобилизации внутри частиц сорбента более всего подходит сорбент, изготовленный из верхового торфа низкой степени разложения.

Решив задачу по определению нефтеемкости сорбентов, их пористости и плавучести, проведенные исследования показали, что для иммобилизации биокультуры необходимы широкопористые сорбенты-носители, такие как, например, органоминеральный сорбент на базе верхового торфа низкой степени разложения.

Наилучшие результаты показали сорбенты из верхового торфа месторождений Кировской области, в частности, из торфа предприятия Прокопьевского. Эти сорбенты поглощали 803% нефти за 30 секунд и плавали не менее 30 суток на поверхности воды.

Оптимизация структурно-поверхностных элементов модели носителя в технологии получения сорбентов

Оптимизацию структурно-поверхностных элементов модели носителя в технологии получения сорбентов возможно провести лишь подвергнув анализу структуру и состав исходного сырья, возможных технологических операций, глубоко изучив процессы термоллиза и т.д.

Полученные данные свидетельствуют о том, что основными параметрами сорбентов являются общая пористость и гидрофобность поверхности сорбентов – носителей биокультуры. Для органоминеральных сорбентов естественного происхождения изменение указанных параметров в желаемом направлении, т.е.

оптимизация структурно-поверхностных элементов модели носителя, требует определенных технологических операций. В частности, для увеличения емкости поглощения нефти необходимо увеличить объем проходных пор, а для сохранения пластичности – сохранить определенное количество закрытых и тупиковых пор, играющих роль «поплавков» для частиц сорбента.

Для обеспечения селективности поглощения нефти с поверхности воды необходима устойчивая гидрофобизация поверхности.

Анализ состава органоминерального сырья, в том числе торфа, свидетельствует о том, что существует принципиальная возможность повышения пористости сорбента за счет удаления части сырья (водорастворимых и легкогидролизующих соединений, возможно, части битумов), а также придания сорбенту гидрофильных свойств за счет изоляции или удаления функциональных гидрофобных групп органических молекул (гидроксилы, карбоксилы).

На основе закономерностей процесса термоллиза проанализированы основные технологические операции, такие как:

- промывка сырья водой с последующей сушкой;
- промывка сырья органическими растворителями и последующая сушка;
- сушка сырья с последующей пропиткой гидрофобным агентом и повторная сушка;
- сушка сырья и последующий нагрев без доступа воздуха (термолиз);
- сушка сырья и последующий нагрев (термолиз) в ВЧ и СВЧ электромагнитном поле.

Среди рассмотренных технических приемов наибольшим желаемым эффектом (увеличение пор и гидрофобизация поверхности) обладает термолиз. Наиболее легко при термообработке из торфа удаляется влага, но не вся, а наименее прочно связанная, затем физико-химическая и при остаточной влажности порядка 4% начинает удаляться химически связанная влага, рвутся водородные связи и связи функциональных полярных групп, определяющие гидрофильность поверхности.

При этом целостность основной органической молекулы, например, целлюлозы, не нарушается. Таким образом, при термоллизе органоминерального сырья растительного происхожде-

ния до температур около 300 °С, в частности, торфа, возможны следующие направления оптимизации структурно-поверхностных элементов в технологии получения сорбента: увеличение пористого пространства при потере массы до 30% от сухого состояния и устойчивая гидрофобизация поверхности сорбента.

Выбраны основные параметры процесса термоллиза.

Показано, что рациональной верхней температурной границей термоллиза является температура около 300 °С. За время около трех часов возможна потеря массы сырья до 30% от сухого состояния, при этом основные затраты тепла (64.5%) приходится на нагрев и испарение влаги.

Для подбора оптимального исходного сырья для производства сорбента были испытаны пробы верхового и переходного торфов Московской, Кировской, Калининградской областей и торф Республики Коми.

Наилучшие результаты показали сорбенты из верхового торфа моховой группы предприятия Прокопьевское (Кирово-Чепецкий район, Кировской области).

Для производства сорбента-носителя для биокультур в рамках настоящего проекта был рекомендован торф именно этого предприятия.

Нефтеемкость сорбентов

Если активная пористость сорбента Π_a , общая пористость Π , а объемная масса его скелета ρ_0 , то при объемной массе сорбата ρ^* относительная емкость сорбента по массе составит

$$X = \frac{\rho^* \Pi_a \xi}{\rho_0 (1 - \Pi)}, \quad (1)$$

где ξ – коэффициент заполнения пор сорбатом.

В то же время объемная масса самого сорбента

$$\rho = \rho_0 (1 - \Pi),$$

откуда

$$X = \rho^* \Pi_a \xi / \rho. \quad (2)$$

Очевидный вывод из этих уравнений – необходимость получения сорбентов с максимальной пористостью или, что почти то же самое, с объемной минимальной массой при максимальной степени заполнения пор. Так, например, для достиже-

ния емкости 6 т/т по продукту с объемной массой 900 кг/м³ при степени заполнения пор 0.9 и активной пористости 0.74 без учета набухания необходимо получить сорбент с объемной массой до 100 кг/м³.

Нефтеемкость слоя сорбента будет несколько выше емкости отдельных частиц за счет образования «манжет» нефтепродукта между частицами

$$X_{\text{доп}} = \frac{\Pi_{\text{сл}} \xi^* \rho^*}{\rho(1 - \Pi_{\text{сл}})}, \quad (3)$$

где $\Pi_{\text{сл}}$ – пористость слоя частиц (равная при гексагональной укладке 0.26), ξ^* – коэффициент заполнения пор нефтепродуктом (максимальный объем «манжет», равный 0.226 $\Pi_{\text{сл}}$ при гексагональной укладке).

Для приведенного выше примера $X_{\text{доп}} = 0.71$ и общая нефтеемкость составит 6.71 кг/кг.

Внесение посторонней твердой фазы (например, биокультуры после сушки), имеющей объемную массу ρ_m и массу по отношению к массе сорбента X_m , приведет к сокращению активной пористости и увеличению средней объемной массы сорбента, что вызовет уменьшение нефтеемкости до величины

$$X_1 = \rho^* \Pi_{a1} \xi / \rho_1, \quad (4)$$

где

$$\Pi_{a1} = \Pi_a - X_m \rho / \rho_m, \quad (5)$$

$$\rho_1 = \rho(1 + X_m). \quad (6)$$

Отсюда можно получить формулу для численной оценки допустимой массы биокультуры (по сухому весу) по отношению к массе сорбента при заданном коэффициенте уменьшения нефтеемкости.

Если обозначить $X_1/X = k_m$, то

$$X_m = \frac{\Pi_a \cdot (1 - k_m)}{\frac{\rho}{\rho_m} + \Pi_a k_m}. \quad (7)$$

Если для оценки принять $k_m = 0/9$, $\rho_m = 1000$ кг/м³, $\rho = 100$ кг/м³, $\Pi_a = 0.74$, то получим $X_m^m = 0.097$, т.е. сухой биокульту-

ры необходимо взять в количестве не более 9.7% от массы сорбента.

Для оценки количества раствора с биокulturой обозначим c – концентрация клеток в растворе, c_m – максимальная концентрация клеток при высушивании (на 1 г или 1 мл). Тогда массовая доля биораствора по отношению к массе сорбента будет равна

$$X_p = X_m c_m / c. \quad (8)$$

Для приведенного выше примера пусть $c_m = 10^{11}$ кл./мл, $c = 10^{10}$ кл./мл. Тогда $X_p = 0.97$, т.е. соотношение твердая : жидкая при обработке сорбента должно быть близко к 1 : 1.

Дополнительная нефтеемкость для слоя остается той же (см. формулу 3).

Пористость и плавучесть

Дополнительные ограничения накладываются условием соблюдения плавучести при необходимости устранения только поверхностных пленок сорбата на воде (например, нефтепродукта). Рассматривая баланс сил тяжести и выталкивающей силы при погружении гидрофобного насыщенного сорбатом сорбента в воду плотностью ρ_w , можно заключить, что критерием плавучести сорбента в воде является соотношение

$$\rho \leq \rho_w - \rho^* \Pi_a \xi, \quad (9)$$

или

$$\rho \leq \frac{\rho_w}{1+X}.$$

Например, плавучий сорбент с емкостью по жидким углеводородам 6 кг/кг должен иметь объемную массу не более 143 кг/м³.

Набухание сорбентов, обусловленное расклинивающим эффектом при поглощении смачивающих жидкостей, присуще многим сорбентам, особенно органического происхождения. Если коэффициент набухания, численно равный отношению объема насыщенного сорбента к его первоначальному объему, обозначить как β , то соответствующие выражения для емкости сорбента и его плавучести примут вид:

$$X = \beta \rho \cdot \Pi \xi / \rho. \quad (10)$$

Для приведенных выше примеров объемная масса сорбента для достижения емкости 6 т/т должна составлять 146.4 кг/м³ (при $\beta = 1.2$), а для обеспечения плавучести – не превосходить 171.6 кг/м³.

При внесенной биокультуре условия плавучести сорбента аналогичны:

$$\rho(1 + X_m + X_1) \leq \rho_w. \quad (11)$$

Отсюда еще один критерий для определения допустимой массовой доли биокультуры (но с точки зрения плавучести):

$$X_m \leq \frac{\rho_w}{\rho(1 + X_1)}. \quad (12)$$

Для приведенных выше значений параметров $X_m < 1.56$.

Более точное решение неравенства требует раскрытия выражения для X_1 , содержащего X_m . Решая полученное квадратное уравнение, находим уточненное условие:

$$X_m \leq 0,5a + 0,5\sqrt{a^2 + 4b}, \quad (13)$$

где

$$a = \rho_w / \rho - \rho \cdot \xi / \rho_m - 2,$$

$$b = (\rho_w - \rho \cdot \xi \Pi_a) / ?.$$

Плавучесть ненасыщенного сорбента в воде зависит также от гидрофобности материала (величины краевого угла смачивания водой), соотношения объемов проходных, тупиковых и закрытых пор, а также от диаметра пор (5).

Получение проб гидрофобного органоинерального нефтяного сорбента

Для того, чтобы сорбент, поглотивший нефть, не смачивался водой и держался на поверхности водоема, было предложено использование процесса термоллиза торфа, заключающегося в

постепенном выделении летучих соединений при нагреве торфа без доступа воздуха.

Термическую обработку образцов торфа различных месторождений производили в два этапа. На первом этапе не рассеянный по фракциям торф нагревали в сушильном шкафу до 80-100 °С и выдерживали до постоянного веса пробы. По разнице начального и конечного весов рассчитывали влажность исходного торфа.

Затем в сушильном шкафу устанавливали заданную температуру обработки в диапазоне 150-300 °С. В связи с тем, что температура воспламенения торфа на воздухе составляет 170-180 °С, предпринимались меры по изоляции торфа от атмосферы. Для этого керамический цилиндр с пробой торфа плотно закрывали пористой крышкой из кварцевых волокон. Выдержка пробы при заданной температуре составляла 1-3 часа. После остывания пробу взвешивали и определяли потерю веса от сухого состояния и рассеивали по нескольким классам крупности.

Наилучшие результаты показывают сорбенты из верхового торфа месторождений Кировской области, в частности, из торфа предприятия Прокопьевское (1 карта 3 южной площади). Эти сорбенты поглощали 803% нефти за 30 секунд, впитывали влаги за сутки погружения не более 214% и плавали не менее 30 суток на поверхности воды.

Характеристика коллекционных культур нефтеокисляющих микроорганизмов

Условные названия штаммов микроорганизмов	Место выделения	Таксономические данные	Культуральная характеристика штаммов
НК-16 анаморфа НК 1/1 и НК 1/2	Нефтезагрязненная почва. 203 кв. Усинский район. 1999 г.	Идентифицирован Институтом биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина 13.04.01 как <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Грамположительные бактерии, образующие слизистые колонии кремового цвета на большинстве питательных сред. В молодых культурах преобладают прямые или слегка искривленные слабо ветвящиеся палочки, которые с возрастом распадаются до кокковидных форм.
НК-15	Нефтезагрязненная почва. 203 кв. Усинский район. 1999 г.	<i>Bacterium</i>	Грамотрицательные аэробные палочковидные бактерии, образующие слизистые округлые колонии кремового цвета на МПА
НК-41	Нефтезагрязненная почва. 203 кв. Усинский район. 1999 г.	<i>Bacterium</i>	Грамотрицательные аэробные бактерии, образующие на МПА слизистые колонии с хорошо выделенной зональностью, желтовато-белые, края ажурные.
НК-102	Нефтьшлам из шламо-накопителя Сыктывкарского аэропорта. 2002 г.	<i>Trichoderma</i> sp. 1	Хорошо растет на питательной среде сусли. На среде Чапека рост слабый. Колонии темно-зеленые. Мицелий стелющийся, септированный, светлоокрашенный, образующий дерновинки. Конидиеносцы разветвленные, на их концах располагаются мутовчато веточки филлы. Конидии скучены в небольшие головки.

Условные названия штаммов микроорганизмов	Место выделения	Таксономические данные	Культуральная характеристика штаммов
НК-103	Нефтьшлам из шламонакопителя Сыктывкарского аэропорта. 2002 г.	<i>Trichoderma sp. 1</i>	Хорошо растет на питательной среде сусла. На среде Чапека рост слабый. Колонии желто-зеленые. Мицелий стелющийся, септированный, светлоокрашенный, образующий дерновинки. Конидиеносцы разветвленные, на их концах располагаются мутовчато веточки фиалиды. Конидии скучены в небольшие головки.
НК-104	Нефтьшлам из шламонакопителя Сыктывкарского аэропорта. 2002 г.	<i>Mucor sp.</i>	Колонии на среде Чапека очень низкие, до 1 мм, бархатистые, серые. Мицелий редкий, спорангиеносцы ветвятся. симподиально.
НК-105	Нефтьшлам из шламонакопителя Сыктывкарского аэропорта. 2002 г.	<i>p. Bacterium</i>	Колонии желто-белые, плоские, гладкие, блестящие.
НК-106	Нефтьшлам из шламонакопителя Сыктывкарского аэропорта. 2002 г.	<i>Rhodotorula sp.</i>	Колонии на среде сусла гладкие, слизистые, окрашены в розово-красный цвет. Клетки округлые, овальные и слегка округлые, с почками.
НК-201	Усинская нефть. 2002 г.	<i>Fusarium sp.</i>	Мицелий на агаровых средах хорошо развит, белый. Микроконидии многочисленны, одно- и двужлеточные, округлые, иногда удлиненные.
НК-202	Усинская нефть. 2002 г.	<i>Mucor</i>	Колонии на среде Чапека бархатистые, серые. Мицелий плотный, спорангиеносцы ветвятся моноподиально.

Условные названия штаммов микроорганизмов	Место выделения	Таксономические данные	Культуральная характеристика штаммов
НК-203	Усинская нефть. 2002 г.	<i>Fusarium</i>	Мицелий на агаровых средах хорошо развит, беловато-желтый. Микроконидии многочисленны, типично овальные.
НК-204	Усинская нефть. 2002 г.	<i>Fusarium</i>	Мицелий на агаровых средах хорошо развит, бело-розовый. Микроконидии немногочисленны, типично овальные. Макроконидии в спорах, типично овальные. Макроконидии в спорах, сужены к обоим концам, с тремя перегородками.
НК-205	Усинская нефть. 2002 г.	<i>Glodadium sp.</i>	На среде Чапека на 7 день колонии достигают до 7 см диаметра. Колонии в центре желтые, по краям спороносная зона имеет темнозеленую окраску. Конидиеносцы в развитых колониях образуют типичные кисточки, как у р. <i>Penicillium</i> . Конидии на конидиеносцах образуют головки и окружены слизью.
НК-206	Усинская нефть. 2002 г.	<i>Glodadium sp.</i>	На среде Чапека на 7 день колонии достигают до 7 см диаметра. Колонии в центре желтые, по краям спороносная зона имеет темнозеленую окраску. Конидиеносцы в развитых колониях образуют типичные кисточки, как у р. <i>Penicillium</i> . Конидии на конидиеносцах образуют головки и окружены слизью.

Условные названия штаммов микроорганизмов	Место выделения	Таксономические данные	Культуральная характеристика штаммов
НК-301	НИИ генетики промышленных микроорганизмов в 1990 г.	<i>Candida guillemondii</i> КБП-3175	Колонии на среде сусла гладкие, серо-белые, мелкозернистые.
НК-302	НИИ генетики промышленных микроорганизмов в 1990 г.	<i>Candida guillemondii</i> КБП-3176	Колонии на среде сусла гладкие, серо-белые, мелкозернистые.
НК-303	Выделен из имаго <i>Aedes aegyptus</i> , Томская область, п. Басандайка в августе 1982 г.	<i>Pichia guillemondii</i> КБП-3205	Колонии на среде сусла гладкие, серо-белые, мелкозернистые.
НК-304	Выделен 3 марта 1992 г. из пластмассовых вод Бондюжского нефтяного месторождения	<i>Candida lipolytica</i> КБП-3308н. <i>Yarrowia lipolytica</i>	Колонии на среде сусла гладкие, серо-белые, мелкозернистые.
НК-305	Выделен в мае 1986 г. из морской воды	<i>Yarrowia lipolytica</i> КБП-287з	Колонии на среде сусла гладкие, серо-белые, мелкозернистые.

ПОЛЕВЫЕ ИСПЫТАНИЯ



Рис. 1. Подготовка к полевому испытанию.



Рис. 2 А, Б. Распыление биосорбента в водной струе.



Рис. 2 В. Сорбент на водной поверхности.



Рис. 3 А, Б. А – работа ранцевого распылителя, Б – участники полевого испытания. Слева направо: доктор Хазен (США), доктор В.А. Терехова (МГУ), менеджер проекта Г.М. Тулянкин.



Рис. 4 . Опытный участок.



Рис. 5. Участники полевого испытания у знака «Полярный круг». Слева направо: доктор В.А. Терехова, доктор Хазен (США), к.б.н. М.Ю. Маркарова.

ДЛЯ ЗАМЕТОК

Г.М. Тулянкин, И.Б. Арчегова, Ф.М. Хабибуллина,
О.М. Гридин, А.А. Шубаков, А.И. Таскаев, В.А. Терехова,
Ю.С. Жучихин, А.Н. Козьминых

**ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
ОПТИМИЗИРОВАННОЙ ТЕХНОЛОГИИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ
НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПРИРОДНЫХ ОБЪЕКТОВ
НА СЕВЕРЕ**

Оригинал-макет и корректура Е.А. Волкова

Лицензия № 19-32 от 26.11.96 г. КР 0033 от 03.03.97 г.

Компьютерный набор. Подписано в печать 06.11.2007.
Формат 60×90^{1/16}. Усл. печ. л. 8.75. Уч.-изд. л. 8.5. Тираж 200 экз.
Заказ № 31(07).

Информационно-издательская группа Института биологии Коми НЦ УрО РАН.
г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28.