

УДК 62.09.33; 62.13.99

Destruction of Oil by Immobilizovannoy Mikrofloroy

Tatyana V. Ryazanova^{*a},

Olga S. Fedorova^a and Sergy R. Loskutov^b

*^aReshetnev Siberian State University of Science and Technology
31 Krasnoyarsky Rabochy, Krasnoyarsk, 660037, Russia*

*^bN.V. Sukachev Institute of Forest SB RAS
FRC "Krasnoyarsk Science Center SB RAS"
50/28 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia*

Received 19.02.2018, received in revised form 27.02.2018, accepted 06.03.2018

In model experiments shows the efficiency immobilized oil-degrading bacteria when the concentration of contaminant in soil 5 and 15 % (vol). As immobilizing agent used, the polymer sorbent of the type "Unisorb".

Using the method of chromatography – mass – spectrometry we have determined the changes of the component composition of oil in the process of bioremediation. It is shown that for the nine weeks of exposure at 5 % (about) of the contaminant in the soil disposal of oil was 95 %, while 15 % (about) – 86 %. What testifies to high efficiency of the proposed method of destruction of oil using immobilized microflora – sorbent "Unisorb-Bio". The obtained results allow to recommend it for combating oil and create backup reserves in case of emergencies.

Keywords: bioremediation, sorption, hydrocarbon-oxidizing microorganisms, immobilization, biosorbent.

Citation: Ryazanova T.V., Fedorova O.S., Loskutov S.R. Destruction of oil by immobilizovannoy mikrofloroy, J. Sib. Fed. Univ. Chem., 2018, 11(2), 184-196. DOI: 10.17516/1998-2836-0067.

© Siberian Federal University. All rights reserved

* Corresponding author E-mail address: tatyana-htd09@mail.ru

Деструкция нефти иммобилизованной микрофлорой

Т.В. Рязанова^а, О.С. Федорова^а, С.Р. Лоскутов^б

*^аСибирский государственный университет науки
и технологий имени М.Ф. Решетнева
Россия, 660037, Красноярск,
пр. им. газ. «Красноярский рабочий», 31*

*^бИнститута леса им. В.Н. Сукачева СО РАН
ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»
Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/28*

В модельных экспериментах показана эффективность использования иммобилизованной нефтеокисляющей микрофлоры при концентрации загрязнителя в почве 5 и 15 % (об). В качестве иммобилизующего агента использован полимерный сорбент типа «Унисорб».

С использованием метода хромато-масс-спектрометрии установлено изменение компонентного состава нефти в процессе биоремедиации. Показано, что за девять недель экспонирования при 5 % (об) содержании загрязнителя в почве утилизация нефти составила 95 %, а при 15 % (об) – 86 %. Это свидетельствует о высокой эффективности предлагаемого способа деструкции нефти с применением иммобилизованной микрофлоры – сорбента «Унисорб-Био». Полученные результаты позволяют рекомендовать его для борьбы с нефтяными загрязнениями и создавать резервные запасы на случай возникновения аварийных ситуаций.

Ключевые слова: биоремедиация, сорбция, углекислородокисляющие микроорганизмы, иммобилизация, биосорбент, биопрепарат.

Введение

Нефть – это ценнейшее сырье, без использования которого невозможна современная цивилизация. Динамичные темпы развития промышленности и возрастающие энергетические потребности человечества приводят к ежегодному росту нефтедобычи во всем мире; в связи с этим обострились вопросы, связанные с влиянием нефтегазового комплекса на экологическую ситуацию. Установлено, что нефтяное загрязнение приводит к глубокому изменению всех звеньев естественных биоценозов [1-9].

Процесс самовосстановления нефтезагрязненной почвы, особенно в северных районах, длителен и может продолжаться до 25 и более лет. Решение проблемы очистки почвенного покрова от загрязнений нефтью, разработка новых и совершенствование существующих технологий восстановления нефтезагрязненных земель относятся к числу приоритетных.

На текущий момент по экономическим показателям и экологической безопасности все большее предпочтение отдается биотехнологическим методам очистки почвы, к числу которых относится активация аборигенной микрофлоры либо использование адаптированных к высоким концентрациям загрязнителя биопрепаратов, не наносящих вреда окружающей среде [10].

Анализ ранее проведенных исследований показал, что эффективность процесса биодеструкции возрастает при иммобилизации микроорганизмов на полимерный сорбент. Контактное взаимодействие микроорганизмов с твердым пористым материалом является основным способом их функционирования в природных условиях. Иммобилизация, помимо закрепления в загрязненной экосистеме, способствует повышению ферментативной активности и устойчивости микроорганизмов к неблагоприятному воздействию факторов окружающей среды и ускоряет процессы биодеградациии нефтяных углеводородов [11].

Одним из наиболее эффективных биопрепаратов является «Унисорб-Био» – карбамидный сорбент типа «Унисорб» с иммобилизованной аборигенной микрофлорой, обладающий комбинированным действием (сбор, удержание нефти и биоокисление углеводородов *in situ* с использованием ферментативных возможностей микроорганизмов) [11-13].

Сорбенты этого типа быстро сорбируют нефть и нефтепродукты, не требуют уборки после проведения очистных мероприятий, так как служат структурообразователем почвы и источником биогенных элементов [13]. Применение аборигенных нефтеокислителей позволяет сохранять нативный микробиоценоз. Поэтому одной из задач, решаемых в рамках данного исследования, является оценка эффективности иммобилизованных на карбамидном сорбенте типа «Унисорб» штаммов нефтеокислителей при разном уровне загрязнения почвы. Поскольку известно, что уровень загрязнения, а также метод иммобилизации и носитель оказывают существенное влияние на жизнеспособность микроорганизмов и свойства их биокаталитической системы. Результаты этих исследований, в свою очередь, позволят решить ряд существующих в настоящее время экологических проблем, связанных с нефтяными загрязнениями.

Экспериментальная часть

В данной работе проведена оценка эффективности воздействия биопрепарата «Унисорб-Био» на компоненты нефти в модельных лабораторных экспериментах. «Унисорб-Био» – биопрепарат, его получали методом капельного орошения сорбента типа «Унисорб» («Сорбенты полимерные» по ТУ 2223-001-02067907-1996, с изменениями № 1 2006 г., производсто ООО «НПФ» ЭКОСОРБ»), который имел следующие характеристики: объемная масса, г/дм³, 25; нефтеемкость, г/г, 40; водопоглощение, %, 400; пористость по воде, см³/г, 2,0; плавучесть, %, 100; содержание свободного формальдегида, %, 0,01; рН водной вытяжки, ед. рН, 5,5. Критерием отбора ассоциаций наиболее активных штаммов – нефтедеструкторов – являлась их нефтеокисляющая активность при высоких концентрациях загрязнителя в почве, а также способность длительное время сохранять ее после иммобилизации их на полимерный сорбент, так как не все микроорганизмы способны полноценно адаптироваться к сорбенту этого типа. Отобранные в работе штаммы микроорганизмов были выделены из почвы нефтехранилища ОАО «Краз» и Кемчугской нефтеперекачивающей станции Красноярского края. Было получено четыре изолята: 12М, 2сп, 11аб, баб. Идентификацию выделенных штаммов проводили по методикам, принятым в микробиологии [14-16]. Для идентификации нефтеокисляющих штаммов использовали метод секвенирования гена 16S рибосомальной РНК, проведенной в центре «Биоинженерия» РАН (г. Москва).

Анализ последовательности ДНК вели после ее выделения стандартными методами. Концентрация полученного препарата ДНК составляла 30-50 мкг/мл.

ПЦР гена 16S рРНК. Для проведения полимеразной цепной реакции и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК была использована универсальная праймерная система. Объем амплификационной смеси составлял 50 мкл и имел следующий состав: 1× буфер ДНК полимеразы BioTaq (17 мМ (NH₄)₂SO₄, 67 мМ трис-НСl, рН 8.8, 2 мМ MgCb); по 12.5 нмоль каждого из dNTP, 50 нг ДНК-матрицы; по 5 пмоль соответствующих праймеров и 3 ед. ДНК полимеразы BioTaq (Диалат ЛТД, Россия). Температурно-временной профиль ПЦР был следующим: первый цикл – 94 °С × 9 мин, 55 °С × 1 мин, 72 °С × 2 мин; последующие 30 циклов – 94 °С × 1 мин, 55 °С × 1 мин, 72 °С × 2 мин; завершающий цикл – 72 °С × 7 мин. Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 2%-м геле агарозы при напряженности электрического поля 6 В/см. Выделение и очистку продуктов ПЦР проводили из легкоплавкой агарозы с применением набора реактивов Wizard PCR Preps (Promega, США) согласно рекомендациям производителя.

Секвенирование ПЦР-продуктов. Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов генов, кодирующих 16S рРНК, проводили по методу Сэнгера с соавт. с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Inc., USA) на автоматическом секвенаторе ABI PRIZM 3730 (Applied Biosystems, Inc., USA) согласно инструкциям производителя. При этом для секвенирования использовали праймеры и чтение проводили в двух направлениях. Первичный анализ сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК изучаемых штаммов проводили с помощью программного пакета BLAST. Сравнение проводили с аналогичными последовательностями, помещенными в базу данных GenBank. Уровень сходства последовательностей от 1466 до 1488 нуклеотидов 16S рРНК составляет для исследуемых штаммов от 99,1 до 100 %.

Исследование компонентного состава образцов нефти до и после биодеструкции проводили с использованием хромато-масс-спектрометра «Agilent 5975С-7890А» фирмы Agilent (США) с применением парофазного пробоотборника HeadSpace Sampler G 1888, 30-метровой кварцевой колонки HP-5 (сополимер 5 %-дифенил-95 %-диметилсилоксан) с внутренним диаметром 0,25 мм. Газ-носитель – гелий с постоянным потоком 1,1 мл/мин. Температура колонки: начальный изотермический участок 60 °С (изотерма 10 мин), подъем температуры со скоростью 6 °С/мин до 220 °С (изотерма 20 мин). Температура испарителя 280 °С, температура ионизационной камеры 170 °С, энергия ионизации 70 эВ.

Полученные хроматографические профили сравнивали по характерным органическим соединениям, идентифицированным при помощи библиотеки масс-спектров «NIST05a. L».

Оценку эффективности использования биопрепарата «Унисорб-Био» проводили в нестерильных условиях, моделирующих естественные, в двух параллелях. Образцы почвы помещали в пластиковые контейнеры. Начальную влажность их доводили до 60 % путем увлажнения водой. Сырую нефть ($\rho_{20} = 0,870$ г/см³) вносили в количестве 5 и 15 % (об), что соответственно составило 4,35 и 13,05 мас. %. Первый образец содержал нефтезагрязненную почву с полимикробным биопрепаратом «Унисорб-Био» (суммарный титр $2,4 \cdot 10^{11}$ кл/г сорбента), второй образец – «Унисорб», который вносили в нефтезагрязненную почву из расчета 1 г на 100 г почвы. Контрольный образец содержал только почву, загрязненную нефтью. Содержимое контейнеров перемешивали, рыхление и увлажнение осуществляли каждые три дня (5 мл воды на 200 г почвы). Эффективность процесса биодеструкции оценивали гравиметрически по количеству

остаточной нефти после ее экстракции хлороформом общей смеси почвы, нефти и сорбента, без их разделения [17].

Результаты и обсуждение

На основании проведенных исследований и результатов молекулярно-биологического анализа было установлено, что штамм 11аб относится к роду *Arthrobacter*, штамм 12М относится к виду *Bacillus cereus*, баб относится к виду *Bacillus pumilus*, 2сп относится к виду *Bacillus subtilis*. Об изменениях содержания нефти в почве в процессе биоремедиации с использованием биопрепарата «Унисорб-Био» и сорбента «Унисорб» можно судить по результатам, приведенным на рис. 1.

На рис. 1а представлена динамика деструкции нефти с применением сорбента «Унисорб», биопрепарата «Унисорб-Био» и в контрольном варианте при уровне начального нефтяного загрязнения почвы 5 % (об).

Как видно из результатов, за шесть недель экспонирования наибольшему количественному преобразованию подверглось загрязнение в почве с внесением биопрепарата «Унисорб-Био», остаточное содержание нефти составило 0,24 %, что составляет 4,85 % от начального содержания нефти в почве. Степень деструкции нефти в этих условиях равнялась 95,15 %, это позволяет говорить о практически полной ликвидации нефтяного загрязнения.

Сравнительно большее количество нефти осталось в почве с внесенным в нее сорбентом «Унисорб», степень деструкции ее за 45 сут. составила 78,90 %, т. е. остаточное содержание нефти в данном случае на 12 % выше, чем в эксперименте с использованием сорбента с иммобилизованной микрофлорой. Следует сказать, что это все равно достаточно высокий уровень утилизации нефти. Такой уровень связан с тем, что «Унисорб», благодаря его развитой пористой структуре, сорбировал часть нефти, снижая ее содержание в почве, а наличие в составе сорбента биогенных компонентов (С, N, P) способствовало активизации аборигенной микро-

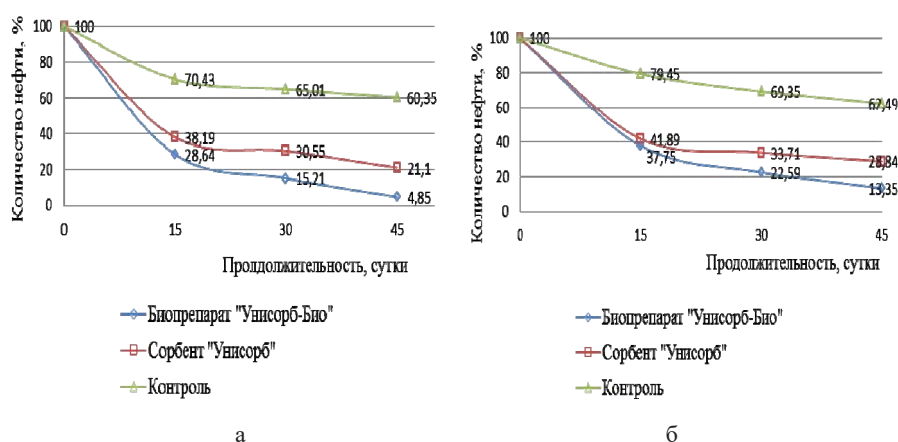


Рис. 1. Динамика деструкции нефти при применении биопрепарата «Унисорб-Био» и сорбента «Унисорб» при уровне начального загрязнения 5 % (а) и 15 % (б)

Fig. 1. The Dynamics of degradation of oil with application of biopreparation “Unisorb-Bio” and sorbent “Unisorb” at the level of initial contamination of 5 % (a) and 15 % (b)

флоры нестерильной почвы. Благодаря этому содержание нефти в почве снизилось до 21,10 % от начального количества, принятого за 100 %.

За этот же период, деструкция нефти в контрольном варианте составила около 40 %, вероятней всего, это связано с фотохимическим разложением нефти и частичным воздействием находящейся в почве аборигенной нефтеокисляющей микрофлоры.

Как видно из результатов (рис. 1б), деструкция нефти при более высоком содержании ее в почве (15 %) происходит медленно, что, по-видимому, связано со специфическими условиями: снижением доступности кислорода и воды для микрофлоры. Известно, что особенно это проявляется в случае длительного воздействия нефти на почву, когда в верхних горизонтах сорбируются высокомолекулярные фракции, особенно смолы и асфальтены, лимитируя доступ кислорода и воды в нижние горизонты почвы [5]. Внесение сорбента «Унисорб» при уровне загрязнения почвы 15 % (об) позволяет в течение 45 сут снизить в ней содержание нефти на 71,16 % от начального уровня загрязнения. Более высокие показатели деструкции получены при внесении биопрепарата «Унисорб-Био»; так, за 45 сут экспонирования содержание нефти в почве снизилось до 13,35 %. Количество нефти, утилизированной иммобилизованной культурой, превышает количество нефти, утилизированной при использовании только сорбента на 15 %. Концентрация загрязнителя в контрольном варианте, как и при уровне загрязнения 5 %, снизилась на 40 % за весь период экспонирования, что свидетельствует о низкой активности аборигенной микрофлоры в почве при этом уровне загрязнения.

Сравнивая полученные показатели деструкции нефти сорбентом «Унисорб» и биопрепаратом «Унисорб-Био», можно заключить, что деструкция проходит более эффективно с применением биопрепарата при любом уровне загрязнения. Результаты хромато-масс-спектрометрии позволили установить изменение качественного состава нефти в условиях эксперимента. Об изменении состава нефти при уровне начального загрязнения 5 % можно судить по результатам, приведенным в табл. 1.

Из результатов видно, что изменение компонентного состава нефти в процессе ремедиации протекает неоднородно. Снижение содержания отдельных компонентов составляет от 6 до 94 % от их содержания в исходной нефти. На процесс ремедиации существенное влияние оказывает химический состав исходной (сырой) нефти. Судя по результатам, приведенным в табл. 1, можно говорить о том, что чем меньше молекулярная масса углеводорода и чем меньше его содержание в нефти, тем быстрее и полнее он утилизируется. Более глубокая деградация углеводородов прошла при обработке почвы биопрепаратом «Унисорб-Био». Алифатические углеводороды изомеры ряда декана и ундекана окислились полностью. Такие углеводороды, как додекан, ундекан, доля которых в исходной нефти составляет более 6 %, утилизируются значительно медленнее; через 15 сут экспонирования доля додекана в нефти составляет более 33 %, ундекана – 10,5 %. Даже при экспонировании в течение 45 сут не наблюдается полной утилизации этих компонентов. Интересные изменения происходят среди таких высших алканов, как тридекан, тетрадекан, пентадекан, гексадекан и тритетраконтан, содержание которых в начальный период экспонирования снижается до 0, к 30-м сут вновь возрастает до 10-33 %, а при дальнейшем экспонировании наблюдается снижение в 2,0-2,5 раза. Такой характер изменений, по-видимому, связан с образованием этих соединений в результате деструкции других высших углеводородов. Подобные изменения происходят с алициклическим углеводородом

Таблица 1. Изменение состава нефти в процессе ремедиации при уровне загрязнения 5 %

Table 1. Changes in the composition of oil in the process of remediation when the pollution level 5 %

Наименование компонента	Время удержания, мин	Содержание в исходной нефти, %	Содержание, % от его содержания в исходной нефти			
			«Унисорб»			Контроль
			Продолжительность экспонирования, сут			
			15	30	45	45
1	2	3	4	5	6	7
Carbon dioxide	1,49	0,499	<u>174,710</u> 68,191	<u>46,112</u> 57,234	<u>6,531</u> 34,758	-
1-Ethyl-4-methylcyclohexane	6,011		-	-	-	-
Benzene, 1,3,5-trimethyl	8,883	0,61	-	<u>27,147</u> -	<u>3,657</u> -	<u>29,980</u> -
Decane	10,971	4,343	<u>-</u> 3,896	-	-	<u>24,580</u> -
Cyclohexane, butyl	12,593	1,489	<u>-</u> 22,493	-	-	<u>41,295</u> -
Decane, 5-methyl	13,94	1,869	<u>-</u> 22,354	<u>-</u> 13,034	<u>-</u> 10,477	<u>41,86</u> -
Decane, 4-methyl	14,083	1,624	<u>-</u> 28,525	<u>-</u> 15,277	<u>-</u> 11,680	<u>42,591</u> -
Decane, 2-methyl	14,238	1,699	<u>-</u> 28,907	<u>-</u> 13,331	<u>-</u> 10,705	<u>41,361</u> -
Decane, 3-methyl	14,507	1,568	<u>-</u> 33,928	<u>-</u> 17,851	<u>-</u> 14,291	<u>44,878</u> -
Cyclohexane, 1-ethyl-2-propyl	15,201	0,447	<u>-</u> 46,563	-	-	<u>54,658</u> -
Undecane	15,703	6,159	<u>10,5046</u> 15,407	<u>3,814</u> 8,592	<u>0,933</u> 7,677	<u>30,441</u> -
trans-Decalin, 2-methyl	15,904	0,883	<u>112,614</u> 46,148	<u>40,039</u> 25,821	<u>13,649</u> 21,411	<u>46,804</u> -
Benzene, 1,2,3,5-tetramethyl	16,349	1,087	<u>-</u> 48,765	<u>17,912</u> 13,993	<u>4,096</u> -	<u>50,429</u> -
Naphthalene, decahydro-2-methyl	16,502	0,523	<u>-</u> 50,312	<u>45,918</u> 26,673	<u>10,590</u> -	<u>43,778</u> -
Cyclohexane, pentyl	16,865	1,818	<u>-</u> 40,585	<u>-</u> 16,2211	<u>-</u> 14,183	<u>45,201</u> -
Undecane, 5-methyl	17,667	2,508	<u>-</u> 45,332	<u>-</u> 31,256	<u>-</u> 27,317	<u>46,182</u> -
Undecane, 4-methyl	17,789	1,784	<u>-</u> 45,661	<u>-</u> 31,328	<u>-</u> 26,564	<u>46,816</u> -
Undecane, 2-methyl	17,929	2,088	-	-	-	<u>45,356</u> -
Undecane, 3-methyl	18,132	1,519	<u>-</u> 54,431	<u>-</u> 38,058	<u>-</u> 32,657	<u>47,494</u> -
Cyclohexane, 1-methyl-2-pentyl	18,566	0,754	<u>-</u> 67,111	<u>-</u> 51,167	<u>-</u> 40,689	<u>65,443</u> -

Продолжение табл. 1

Continued Table 1

1	2	3	4	5	6	7
Dodecane	19,045	6,341	$\frac{33,7483}{36,136}$	$\frac{7,839}{24,365}$	$\frac{2,578}{21,313}$	$\frac{32,845}{-}$
Undecane, 2,6-dimethyl	19,45	1,27	$\frac{-}{63,269}$	$\frac{-}{50,409}$	$\frac{-}{40,854}$	$\frac{52,951}{-}$
Heptylcyclohexane	20,1	1,096	$\frac{-}{49,689}$	$\frac{-}{39,553}$	$\frac{-}{32,420}$	$\frac{45,328}{-}$
Oxalic acid, bis(6-ethyloct-3-yl)ester	20,402	0,617	$\frac{-}{63,815}$	$\frac{-}{62,139}$	$\frac{-}{47,159}$	$\frac{60,681}{-}$
Undecane, 2,6-dimethyl	20,523	0,999	$\frac{-}{55,087}$	$\frac{-}{47,838}$	$\frac{-}{40,531}$	$\frac{45,742}{-}$
Undecane, 2,4-dimethyl	20,576	0,989	-	$\frac{-}{45,986}$	$\frac{-}{37,421}$	$\frac{43,875}{-}$
Dodecane, 2-methyl	20,823	1,909	$\frac{-}{49,413}$	$\frac{-}{42,069}$	$\frac{-}{33,943}$	$\frac{43,399}{-}$
10-Methylnonadecane	20,995	1,154	$\frac{-}{53,413}$	$\frac{-}{47,262}$	$\frac{-}{56,151}$	-
Tridecane	21,764	3,848	$\frac{-}{44,413}$	$\frac{10,307}{34,810}$	$\frac{3,618}{29,479}$	$\frac{29,813}{-}$
Tetradecane	24,141	2,684	$\frac{-}{46,784}$	$\frac{11,049}{38,383}$	$\frac{4,790}{31,249}$	$\frac{35,660}{-}$
Tetradecane, 5-methyl	25,304	0,329	-	$\frac{-}{60,456}$	$\frac{-}{47,908}$	$\frac{46,103}{-}$
Tetradecane, 4-methyl	25,419	0,331	$\frac{63,897}{47,997}$	$\frac{-}{57,009}$	$\frac{-}{47,236}$	$\frac{47,565}{-}$
Pentadecane	26,302	2,009	$\frac{-}{40,091}$	$\frac{17,232}{32,300}$	$\frac{6,149}{28,746}$	$\frac{32,111}{-}$
Hexadecane	28,311	0,926	$\frac{-}{37,077}$	$\frac{12,376}{33,726}$	$\frac{7,055}{29,850}$	$\frac{39,499}{-}$
Tritetracontane	30,201	0,306	-	$\frac{33,137}{54,019}$	$\frac{13,329}{52,474}$	$\frac{55,843}{-}$

Примечание: числитель – «Унисорб-Био», знаменатель – «Унисорб».

транс-декалин 2-метил, содержание которого в первый период экспонирования возрастает до 112 % от его содержания в исходной нефти, при дальнейшем экспонировании содержание этого углеводорода плавно снижается до 13,6 %.

Следует отметить, что изомеры бензена, ундекана, додекана, тридекана, тетрадекана, пентадекана и гексадекана остаются в почве в следовых количествах, их присутствие отмечено в анализируемых образцах, и после 45 сут экспонирования, деструкция их за весь период экспонирования составляет более 95 %. В ходе эксперимента, при увеличении продолжительности экспонирования более 30 сут, отмечено появление изомеров ряда бензена, нафталина, декана,

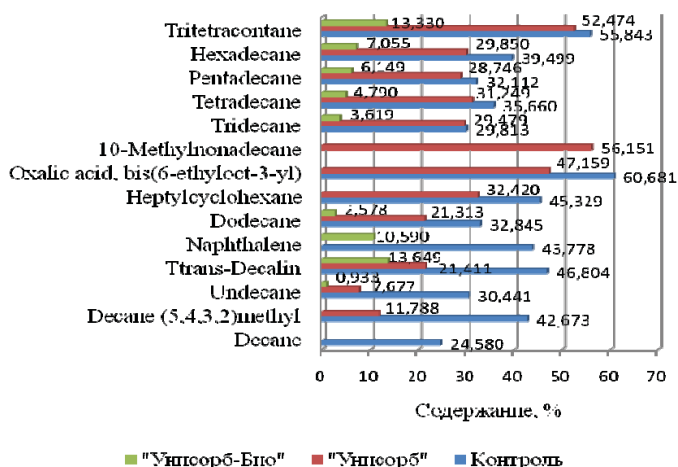


Рис. 2. Состав остаточной нефти 5%-го загрязнения после 45 сут биоремедиации

Fig. 2. Composition of residual oil of 5 % contamination after 45 days of bioremediation

тридекана, тетрадекана, пентадекана, гексадекана, тритетраконтана, появление которых в среде может быть связано с распадом и трансформацией более сложных соединений, под действием ферментативных систем иммобилизованной микрофлоры.

К концу экспонирования, как это хорошо видно на рис. 2, где показано изменение содержания основных компонентов нефти, идентифицированных методом хромато-масс-спектрометрии, в пробе преобладают такие соединения, как тритетраконтан, нафталин, транс-декалин на их долю приходится около 10 % от общего содержания остаточной нефти.

В варианте с применением сорбента «Унисорб» качественный состав нефти в процессе экспонирования практически не изменился, однако динамика изменения концентрации компонентов носит неоднородный характер. Как видим (табл. 1) в составе нефти преобладают соединения: оксолиниевая кислота, бис (6-этилокт-3-ил) эфир, 10-метилнонадекан, тритетраконтан, их остаточное содержание в пробе после шести недель экспонирования составляет 47–56 %.

Деструкция изомеров ряда додекана, транс-декалина, тридекана, пентадекана и гексадекана значительно выше, в пределах 70–78 %. Более полной деструкции подверглись такие соединения, как ундекан – 97 % и циклогексан – 85 %.

При концентрации нефти в почве 5 % биохимическая активность аборигенной углеводородоокисляющей почвенной микрофлоры частично сохраняется, а наличие в среде полимерного сорбента «Унисорб» как источника азота и фосфора, меллиоранта и структурообразователя способствует активации их окислительной активности, что ускоряет процесс деструкции нефти. Из результатов, приведенных в табл. 1 и на рис. 3, видно, что при применении сорбента «Унисорб» содержание компонентов в нефти в процессе экспонирования снижается в 1,5 раза и более по сравнению с контрольным образцом.

В случае 15 % (об) уровня загрязнения динамика изменения состава нефти в процессе ремедиации выглядит несколько иначе, так как это загрязнение относится к категории высоких и за 45 сут эксперимента ферментативная дегградация углеводородов происходит не полностью.

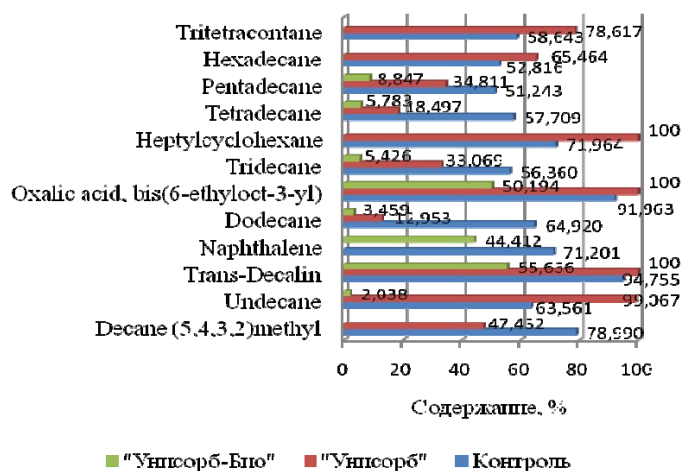


Рис. 3. Состав остаточной нефти 15%-го загрязнения после 45 сут биоремедиации

Fig. 3. Composition of residual oil of 15 % contamination after 45 days of bioremediation

Общее снижение загрязнителя при использовании биопрепарата «Унисорб-Био» составляет 70 %, при обработке сорбентом «Унисорб» менее 50 %, в контрольном образце не превышает 32 %.

Сравнительный анализ ремедиации почвы с уровнем нефтяного загрязнения 15 % (об) с использованием биопрепарата «Унисорб-Био» и полимерного сорбента «Унисорб» представлен на рис. 3.

По результатам, несмотря на высокое содержание загрязнителя в почве, концентрация анализируемых компонентов в почве по мере проведения процесса биодеструкции уменьшается, максимальная деструкция их наблюдается при применении биопрепарата «Унисорб-Био». Значительной деструкции подверглась парафино-нафтенная фракция. Следует отметить, что результаты изучения динамики изменения состава нефти в процессе экспонирования показали, что на начальной стадии биоремедиации количественное содержание гептилциклогексана, 10-метилнонадекана, оксалиниевой кислоты, нафталина, транс-декалина увеличивается в пределах 20–90 %. Несмотря на это, в целом концентрация этих компонентов в процессе ремедиации уменьшается в среднем на 50 %. Результаты исследования динамики изменения состава нефти в процессе биоремедиации показали также, что в начальный период в ней увеличивается количество соединений с разветвленной цепью, которые содержат метил-этильные радикалы. Эти соединения в дальнейшем, после 15 сут экспонирования, полностью утилизируются либо присутствуют в следовых количествах.

Таким образом, за шесть недель экспонирования деструкции подверглись все представленные на графике соединения, их количество в почве составляет около 60 % от остаточной нефти.

Анализ результатов, приведенных на рис. 2 и 3, позволяет сделать вывод о влиянии уровня загрязнения на изменение состава нефти в процессе биоремедиации. В почве с 15%-м начальным уровнем загрязнения на 45-е сутки экспонирования с использованием «Унисорб-Био» отсутствуют тритетраконтан, гексадекан, гептациклогексан, нафталин, декан(5,4,3,2)

метил. За такой же период экспонирования в почве с 5%-м начальным уровнем загрязнения из перечисленных выше компонентов не обнаружены только гептациклогексан и тетраметилдекан. Наличие таких углеводородов, как тритетраконтан, гексадекан, гептациклогексан, нафталин, декан(5,4,3,2)метил в почве с 5%-м уровнем загрязнения, по-видимому, связано с их образованием в результате биодеструкции высших алканов. В то же время в утилизации таких компонентов, как пентадекан, тридекан, тетрадекан, ундекан, различия наблюдаются, но не столь существенные. В почве с более высоким уровнем начального загрязнения их содержание выше в среднем на 1-2,5 % по сравнению с образцами с низким уровнем загрязнения.

Иной характер изменения компонентного состава нефти в процессе экспонирования наблюдается при использовании сорбента «Унисорб». Как видно на рис. 3, при использовании этого сорбента наблюдаются изменения состава нефти менее существенные по сравнению с изменениями, происходящими при использовании «Унисорб-Био». Содержание большинства компонентов практически прежнее, что, по-видимому, связано как с относительным перераспределением компонентов вследствие снижения доли углеводородов, более подверженных деградации, так и с увеличением их концентрации за счет деструкции более сложных соединений, так как остаточное содержание нефти к концу экспонирования составляет менее 30 % (рис. 1).

Следует отметить, что опытные образцы почвы с внесенным в нее сорбентом «Унисорб» по составу остаточной нефти сходны с контролем, где степень деструкции отдельных компонентов составляет 52-95 % при содержании остаточной нефти более 60 %. Сходство состава остаточной нефти и различие ее содержания в этих почвенных образцах служит подтверждением активирующего воздействия сорбента «Унисорб» на аборигенную микрофлору.

Выводы

Таким образом, результаты проведенных исследований в модельных экспериментах на нефтезагрязненной почве показали, что утилизация нефти проходит более полно с применением биопрепарата «Унисорб-Био». Количество утилизированной за девять недель экспонирования нефти при 5 % (об) уровне загрязнения составило 95 %, а при 15 % (об) – 86 % от исходного, что свидетельствует о высокой эффективности полученного биопрепарата при относительной простоте его использования. Полученные результаты позволяют рекомендовать для борьбы с нефтяными загрязнениями биопрепарат «Унисорб-Био» и создавать резервные запасы на случай возникновения аварийных ситуаций.

Нефть и продукты его аэробной биодеструкции изучены с использованием приборов Красноярского регионального центра коллективного пользования СО РАН.

Список литературы

1. Артемов А.В., Пинкин. А.А. Сорбционные технологии очистки воды от нефтяных загрязнений. *Вода: химия и экология 2008*. № 1, С. 19-25. [Artemov A.V., Pinkin A.V. Sorbtion technology of treat oil contaminated water. *Water: chemistry and ecology 2008*. Vol. 1, P. 19-25 (In Russ.)]

2. Надеин А.Ф. Очистка воды и почвы от нефтезагрязнений. *Экология и промышленность России 2001*, ноябрь, С. 24-26. [Nadein A.F. Cleaning water and soil from oil pollution. *Ecology and Industry of Russia*. 2001. November. P. 24-26 (In Russ.)]
3. Другов Ю.С., Родин А.А. *Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов*. СПб.: Наука, 2000. 250 с. [Drugov U.S., Rodin A.A. *Ecological analyzes for bottling of oil and oil production*. Sanct-Peterburg: Nauka, 2000. 250 p. (In Russ.)]
4. Абросимов А.А. *Экология переработки углеводородных систем*. Под ред. Долматова М.Ю., Теляшева Э.Г. М.: Химия, 2002. 608 с. [Abrosimov A.A. *Ecology convert of hydrocarbon systems*. Under Ed. Dolmatova M.U., Teleysheva E.G. Moscow: Chemistry, 2002. 608 p. (In Russ.)]
5. Туманян А.Ф. Батовская Е.К. Влияние нефтяного загрязнения на состояние почв. *Технология нефти и газа 2009*. № 6 (65), С. 8–12 [Tumaneyn A.F., Batovskaya E.G. The impact of oil pollution on soil condition. *Technology of oil and gas 2009*. Vol. 6 (65), P. 8-12 (In Russ.)]
6. Мазлова Е.А., Шагарова Л.А. *Экологические решения в нефтегазовом комплексе*. М.: Техника. 2001. 122 с. [Mazalova E.A., Shagarova L.A. *Ecological decision in oil and gas complex*. Moscow: Technika. 2001. 122 p. (In Russ.)]
7. Бреус И.П. Мониторинг и восстановление почв загрязненных нефтяными углеводородами. *Технология нефти и газа 2008*. № 1, С. 29–40. [Beus I.P. Monitoring and reduction of soil contaminated with petroleum hydrocarbons. *Technology of oil and gas 2006*. Vol. 1, P. 29-40 (In Russ.)]
8. Давыдова С.И. Тагасова В.И. *Нефть как топливный ресурс и загрязнитель окружающей среды*. М.: РУДН, 2006. 156 с. [Davidova S.I., Tagasova V.I. *Oil as a fuel resource and environmental contaminant..* Moscow: RUDN. 2006. 156 p. (In Russ.)]
9. Абдрахмонов Т.А., Жаббарова З.А., Хушвактов Э.М. Влияние загрязнений почвы нефтью и нефтепродуктами на ее микрофлору. *Материалы IV съезда почвоведов и агрохимиков Узбекистана*. Ташкент 2005, С. 208–209. [Abdarxmanov T.A., Dzabbarova Z.A., Xushvaktov E.M. The influence of contamination of soil by oil and oil products on her micro flora. *Materials IV congers of soil scientists and agricultural chemical of Uzbekistana. Tashkent 2005*, P. 208-209 (In Russ.)]
10. Сжабменов Е.В. Выбор активного микроорганизма-деструктора для очистки нефтезагрязненных почв. *Прикладная биохимия и микробиология 1995*. Т. 31, (5), С. 534–539 [Sjabmenov E.V. The choice of active microorganism – destructor for cleaning oil-contaminated soil. *Prikladnaya-biohimiya-i-mikrobiologiya 1995*. Vol. 5 (31), P. 534-539 (In Russ.)]
11. Коновалова Е.А., Лазыкин А.Г., Гаврилов К.Е. Сравнительная характеристика сорбентов, используемых в составе биопрепаратов для очистки почвы от нефтезагрязнений. *Наука вчера, сегодня, завтра: сб. ст. по матер. XXXIV междунар. науч.-практ. конф.* Новосибирск: СибАК 2016. № 5(27). Часть I, С. 6-17. [Konovalova E.A., Sazykin A.G., Gavrilov K.E. [and others] Comparative characterization of sorbents used in the composition of biopreparations for cleaning soil from oil pollution. *Science yesterday, today, tomorrow: collected articles on the mater. XXXIV international. scientific.-pract. Conf.* Novosibirsk: Sibak 2016. No. 5(27). Part I, P. 6-17. (In Russ.)]
12. Рязанова Т.В., Федорова О.С. Динамика микробиоценоза гетеротрофов в модельных опытах с применением биосорбента на основе смешанной бактериальной культуры. *Системы. Методы. Технологии 2017*. № 1(3), С. 157-164. [Ryazanova T.V., Fedorova O.S. Dynamics of microbiocenosis of heterotrophs in the model experiments with the use of a biosorbent based on a mixed bacterial culture. *System. Methods. Technology 2017*. Vol. 1(3), P. 157-164 (In Russ.)]

13. Рязанова Т.В. Федорова О.С. Получение биосорбента на основе аборигенной микрофлоры для очистки нефтезагрязненных территорий. *Всероссийская научно-практическая конференция «Новые экологически безопасные технологии для устойчивого развития регионов Сибири»*. Улан-Удэ, 2005. С. 65-70 [Ryazanova T.V., Fedorova O.S. Obtaining a biosorbent based on aboriginal microflora for cleaning oil-contaminated areas. All-Russian scientific-practical conference “*New ecologically safe technologies for sustainable development of the regions of Siberia*”, Ulan-Ude. 2005, P. 65-70 (In Russ.)]

14. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. *Практикум по микробиологии*. Под ред. В.К. Шильниковой. М.: Дрофа, 2004. 256 с. [Tepper E.Z., Shilnikova V.K., Pereverzeva G.I. *Practical work for microbiology*. Under Ed. Pereverzeva G.I. Moscow: Drofa, 2004. 256 p. (In Russ.)]

15. *Практикум по микробиологии*. Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с. [*Practical work for microbiology*. Under Ed. Under Ed. A.I. Netrusovoy. Moscow: Academy, 2005. 608 p. (In Russ.)]

16. *Современная микробиология. Прокариоты*: Т. 2. Пер. с англ. Под ред. Й. Ленглера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005. 496 с. [*Contemporary microbiology. Prokarioti*. Under Ed. I. Lenglera, G. Drevisa, G. Shlegeley, Moscow: Mir, 2002. 608 p. (In Russ.)]

17. ПНД Ф 16.1.41-04 «Количественный химический анализ почв. Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах почв гравиметрическим методом». [PND F 6.1.41-04 “Quantitative chemical analysis of soils. Technique of execution of measurements of mass concentration of oil products in soil samples by the gravimetric method” (In Russ.)]