

РАЗРАБОТКА НАУЧНЫХ ОСНОВ НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ОЧИСТКИ ПРИРОДНЫХ И ТЕХНОГЕННЫХ ЭКОСИСТЕМ ОТ ЗАГРЯЗНЕНИЯ НЕФТЬЮ И НЕФТЕПРОДУКТАМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОПОТЕНЦИАЛА МИКРООРГАНИЗМОВ

Борзенков И.А., Тарасов А.Л., Беляев С.С.
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН

На территориях большинства нефтеперерабатывающих заводов (НПЗ) накоплены значительные количества нефтешлама (НШ), являющегося основным отходом устаревших технологий переработки нефти. Особая опасность этих отходов обусловлена тем, что большинство НПЗ расположено в пределах городских агломераций и вблизи больших рек. Все это создает реальную угрозу окружающей среде и непосредственно здоровью человека. В состав НШ входят механические примеси, углеводороды (в основном их средне- и высокомолекулярные фракции) нефтяного происхождения и вода. Нефтешламы токсичны и весьма устойчивы к физико-химическим и биологическим воздействиям, вследствие чего проблема утилизации этого распространенного загрязнителя окружающей среды остается по-прежнему актуальной.

Сложность работ по биологической детоксикации НШ объясняется прежде всего экстремально высоким содержанием в них углеводородов (до 70%, в среднем 30–50%). Значительная часть данных работ связана с изучением процессов деструкции в почвах при относительно невысоком содержании углеводородов, порядка 0,5–5,0%. При этом показано, что максимальная скорость дыхания наблюдалась при содержании углеводородов около 5%. При содержании углеводородов более 10% наблюдалось существенное замедление биологических процессов [1]. В некоторых случаях для осуществления процессов деструкции нефтешлама в почвах проводились исследования возможности активации природной микрофлоры. Так метод низкотехнологичной биологической обработки (landfarming) включал контролируемое применение биоактивных отходов, жидких или твердых, которые внедряли в верхний горизонт почвы. Позднее было показано, что такие факторы, как плодородие почв, распашка, дренирование, ускоряют разрушение загрязнителей. Кроме того, активированное углеводородоокисляющее сообщество в обработанной почве может быть использовано для утилизации дополнительных порций нефтешлама [2, 3].

Эффективность биоремедиации нефтешлама увеличивается при повышении температуры и внесении дополнительных источников азота. Проницаемость почвы для

воды в присутствии нефтешлама пропорционально снижается при концентрациях углеводов от 0 до 3,0% [4]. Вместе с тем встречаются объекты с высокими уровнями загрязнения. К ним относятся как сильно загрязненные почвы, так и собственно нефтешламы. В этих условиях эффективным оказалось использование опилок в качестве разрыхлителя. Дополнительное внесение легкоусвояемой органики (свиного навоза) не оказало большого влияния на скорость деструкции углеводов при их высокой концентрации (около 7,0%) [5].

Следует отметить, что лабораторные штаммы углеводородокисляющих микроорганизмов имеют, как правило, ограниченный спектр действия. Аборигенная микрофлора способна использовать более широкий спектр субстратов, но её численность и активность растут медленно. Одним из перспективных подходов является интродукция выделенной из загрязненных местообитаний эндогенной микрофлоры после наращивания ее биомассы в контролируемых условиях. Такой микробный консорциум более устойчив к внешней среде, характеризуется более высокими скоростями деградации и устойчивостью к высоким концентрациям поллютанта. Потенциал почвенных углеводородокисляющих микроорганизмов относительно невелик, т.к. их численность составляет 10^3 – 10^4 клеток на 1 г почвы. Однако при проведении мероприятий по увеличению их численности можно достичь определенного результата. В работах [6, 7] для ускорения процессов деструкции в почву с высоким содержанием углеводов НШ (10,0%) была интродуцирована биомасса предварительно выделенного аборигенного штамма *Acinetobacter baumannii*. Это позволило за 120 дней снизить содержание углеводов НШ на 90%. Исследования, представленные в работе [8], показали, что при длительном хранении НШ в нем развивается собственная микрофлора, при этом численность углеводородокисляющих микроорганизмов может достигать 10^9 клеток на 1 мл. Деградации подвергались как алканы, так и ароматические углеводороды, хотя некоторые соединения (м-ксилол, бензол, полиароматические соединения) практически не разрушались. Проведение успешного эксперимента по биоремедиации углеводов НШ с 12,0 до 5,3% за 160 дней на хранилище нефтешлама показало возможность массовой утилизации этих крупнотоннажных отходов с применением промышленных бактериальных препаратов [9].

В связи с вышесказанным становится очевидным, что исследования, связанные с разработкой методов утилизации нефтешламов, актуальны и критически востребованны.

Целью настоящего исследования была проверка эффективности использования микробиологических процессов для детоксикации нефтешлама. В рамках этой работы изучались условия оптимизации процессов биодеструкции нефтешлама в лабораторных условиях с целью практического использования полученных результатов.

Объекты и методы исследований

Объекты исследований. Образцы нефтешлама были получены от московского нефтеперерабатывающего завода. В ходе проведения исследований использовались две разновидности нефтешлама. Одна разновидность была представлена жидкой эмульсией углеводородов в воде, другая – плотной по консистенции субстанцией, напоминавшей гуталин. В состав такого плотного нефтешлама входили: углеводороды (до 52%), минеральная составляющая (до 37%) и вода (до 11%). Углеводороды были представлены парафинами (30–35%), конденсированными и неконденсированными нафтенами (35–45%), различными ароматическими соединениями (в том числе и полиароматическими, до 20%). В минеральной составляющей присутствовали тяжелые металлы в концентрациях, значительно превышающих ПДК.

Методы культивирования. При культивировании углеводородокисляющих микроорганизмов использовали минеральную среду М9 следующего состава (г/л): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 1,5, KH_2PO_4 – 3,0, Na_2SO_4 – 0,6, NH_4Cl – 1,0, $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,5, CaCl_2 – 0,01, с добавлением NaCl (если необходимо) и 0,5% источников углерода.

Культивирование микроорганизмов проводили на качалке при скорости вращения 150 об/мин и температуре 28–29 °С. Рост культур измеряли по оптической плотности и сухой биомассе. Измерение условной оптической плотности (светопоглощение + светорассеяние) проводили при длине волны $\lambda = 540$ нм, на нефелометре КФК-2-УХЛ 4.2 (Россия). Для определения численности микроорганизмов использовали метод десятикратных разведений с высевом аликвоты в 50 мкл на поверхность богатой органикой агаризованной среды LB (Carl Roth GmbH, № X965.1) и (или) ВН1А (Carl Roth GmbH, № X915.1).

Методические приемы, использованные при работе с нефтешламом. Для исследования развития микроорганизмов на образцах жидкого НШ, содержащего около 1% углеводородов, во флакон объемом 0,5 л помещали 50 мл жидкости с НШ, 50 мл воды

или 50 мл среды Раймонда (г/л): Na_2CO_3 –0.1; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ –0.01; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ –0.02; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ –0.1; Na_2HPO_4 –3.0 г/л; KH_2PO_4 –2.0г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ –0.2; NH_4Cl –2.0; NaCl –5,0; pH–6,8, а также суспензию углеводородокисляющих микроорганизмов, состоящую из *Pseudomonas aeruginosa* и *Yarrowia lipolytica* (10^7 клеток на мл). Флаконы закрывали ватной пробкой, а на время измерения скорости дыхания – силиконовой пробкой.

Для исследования развития микроорганизмов на образцах густого НШ, содержащего около 50% углеводов, 25 или 40 г НШ помещали в чашку Петри и накрывали донной частью другой чашки Петри, в которой было проделано отверстие. Место соединения герметизировали, отверстие закрывали ватной пробкой. В разных вариантах опыта в НШ добавляли также воду, среду Раймонда, суспензии микроорганизмов и различные сорбенты (древесные опилки, асбест, глауконит и пенопласт).

Для измерения скорости дыхания ватную пробку меняли на резиновую и через 1 час инкубации измеряли дыхательную активность

Определение углеводородной составляющей. Для определения содержания углеводов в составе НШ использовали метод экстракции горячим гексаном в аппарате Сокслета с гравиметрическим окончанием. Для выделения алифатической фракции использовали метод адсорбционной колоночной хроматографии. Деструкцию n-алканов определяли методом ГЖХ на хроматографе 3700 с пламенно-ионизационным детектором и 25-метровой капиллярной колонкой с апиезоном в качестве неподвижной фазы. Газом-носителем служил водород. Температура колонки была в начале анализа – 100°C , конечная – 320°C , скорость нагрева – $5^\circ\text{C}/\text{мин}$. В качестве внутреннего стандарта при обсчете хроматограмм алифатической фракции используют суммарную длину пиков фитана и пристана ($\text{isoC}_{19} + \text{isoC}_{20}$). Обсчет считался корректным при сохранении в ходе экспериментов соотношения $\text{изо-C}_{19} / \text{изо-C}_{20}$. Таким образом, результаты расчетов позволяли оценить относительную величину изменения содержания индивидуального n-алкана в ходе эксперимента с длиной цепи C_{12} – C_{30} , выраженную в процентах к содержанию в контрольном образце.

Метод определения дыхательной активности. Дыхательную активность в экспериментах измеряли на инфракрасном анализаторе INFRALIT (ГДП) по приросту CO_2 за определенное время.

Микроскопические исследования осуществляли с использованием микроскопа Axio Imager. D1 Carl Zeiss (Объектив: EC PLAN – NEOFLUAR 100x) в фазовом контрасте.

Полученные результаты и обсуждение

Исследование возможности активации аборигенной микрофлоры. Для оценки возможности активации нативной микрофлоры, содержащейся в НШ, использовали пробу НШ, отобранного из резервуара, заполненного преимущественно водой. В контрольном варианте НШ разбавляли водой, в других вариантах добавляли среду Раймонда с ацетатом (5.0 г/л) или без ацетата. Полученные результаты представлены на рис. 1. В присутствии среды Раймонда и ацетата скорость дыхания достигла максимума на 4-е сутки и была примерно в 4-5 раз больше, чем в остальных вариантах. Еще более высокая активация дыхания достигалась при более позднем внесении среды и ацетата, на 5-е сутки. На 6-е сутки скорость дыхания в этом варианте была примерно в 2 раза больше, чем в варианте 4 со средой Раймонда с ацетатом и в 4,5 раза больше, чем в контроле и варианте со средой Раймонда. Численность органотрофных микроорганизмов возрастала с 10^7 до 10^9 КОЕ на мл в присутствии добавок. Таким образом, внесение дополнительных источников азота и фосфора, а также ацетата, который является промежуточным метаболитом n-алканов, стимулирует развитие аборигенной углеводородокисляющей микрофлоры (УОМ).

Исследование влияния интродукции активных штаммов УОМ на процесс деструкции НШ. Для изучения влияния интродуцированных активных штаммов УОМ на процесс деструкции НШ в эксперимент на 5-е сутки культивирования вносили в разных комбинациях штаммы активных нефтедеструкторов *P. aeruginosa* и *Y. lipolytica* в конечной концентрации 10^7 КОЕ/ мл по каждому штамму и в качестве дополнительного источника азота аммонийную селитру в конечной концентрации 1 г/л.

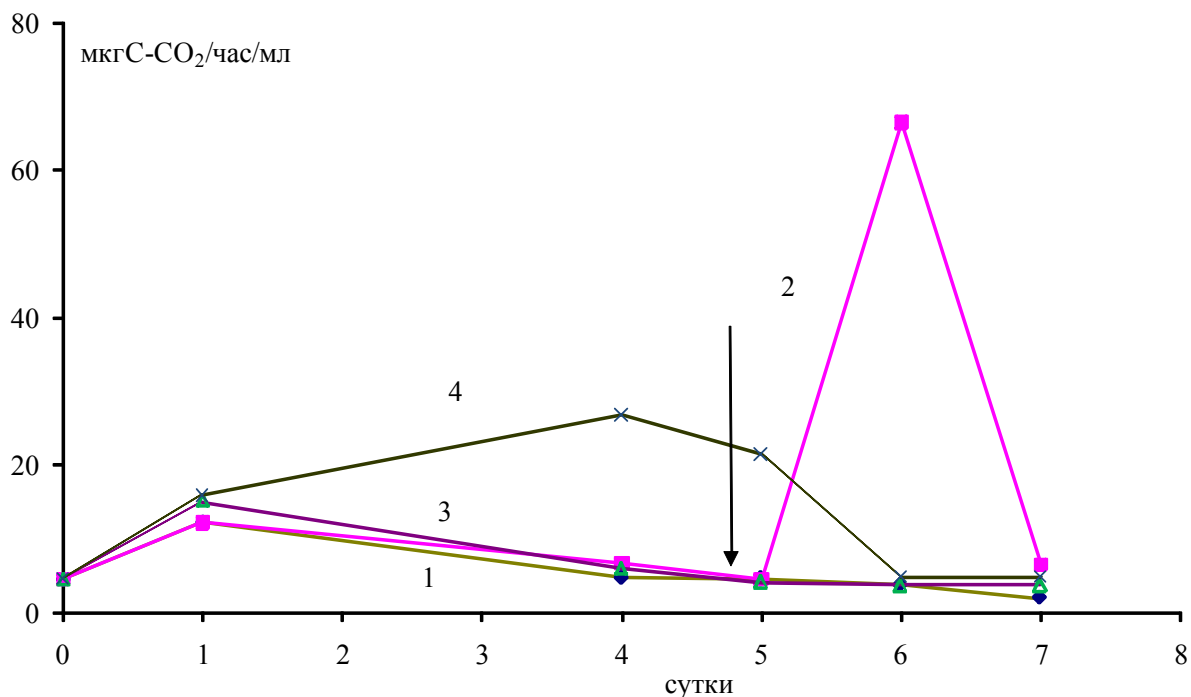


Рис. 1. Динамика дыхания в образцах жидкого НШ при внесении биогенных элементов и дополнительного субстрата. 1 – контроль (НШ и вода), 2 – контроль с внесенными на 5-е сутки средой и ацетатом, 3 – НШ со средой, 4 – НШ со средой и ацетатом

После внесения добавок наблюдали резкое увеличение дыхательной активности на 11–15-е сутки культивирования. В вариантах с добавлением NH_4NO_3 или микроорганизмов скорость дыхания выросла в 3 раза. В варианте с одновременным добавлением NH_4NO_3 и микроорганизмов скорость дыхания выросла уже в 7 раз по сравнению с контролем (рис. 2). Общее количество углекислого газа, выделенного после стимулирования процесса деструкции НШ, превышало контрольное в 3,7 раза в варианте с добавлением УОМ, в 4,7 раза – в варианте с добавлением минерального азота и в 10 раз (до 420 мгС) – в варианте с обоими аддитивами. Микроскопирование проб, отобранных в различные периоды культивирования, показало, что первый пик дыхательной активности коррелирует с увеличением численности бациллоподобных микроорганизмов, потребляющих легкоусвояемую органику.

Исследование возможности деструкции плотного нефтешлама при использовании различных технологических подходов. Детоксикация плотного НШ является гораздо более сложной задачей по сравнению с жидким эмульгированным НШ. В то же время основные отходы НПЗ представлены именно плотным НШ, поэтому технологические подходы к решению проблемы его обезвреживания имеют более значимый практический интерес. Все эксперименты с плотным НШ проводились в чашках Петри,

модифицированных, как указано в *Методических приемах*. В разных вариантах в НШ добавляли воду или среду Раймонда или среду Раймонда с суспензией бактерий. В качестве разрыхлителя вносили глауконит или опилки в количестве 6,5 или 12 г.

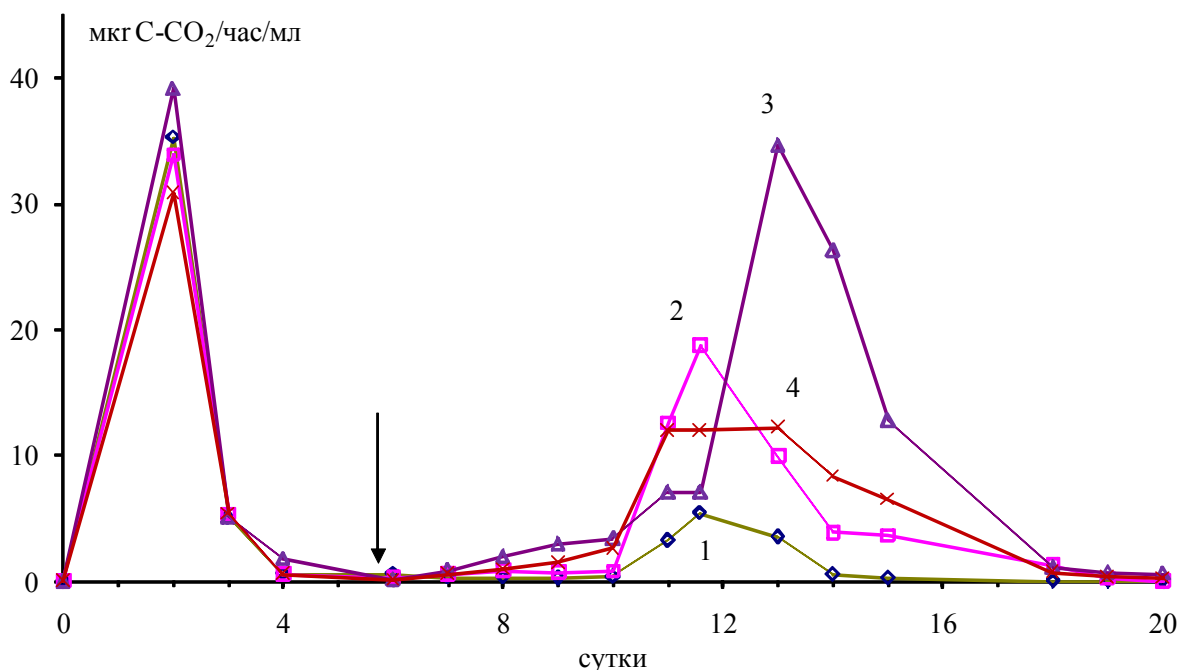


Рис. 2. Динамика дыхания в образцах жидкого НШ при внесении источника азота и активных штаммов УОМ: 1 – контроль (НШ и среда), 2 – НШ, среда и микроорганизмы, 3 – контроль с внесением на 7-е сутки источником азота, 4 – контроль с внесением на 7-е сутки источником азота и микроорганизмами

Интенсивность дыхания в образцах плотного НШ была на порядок ниже, чем в экспериментах с жидким НШ. Однако и в этом случае было отмечено два пика выделения CO₂. Добавление глауконита сопровождалось незначительным увеличением дыхательной активности. Значительно больший эффект наблюдался при дополнительном внесении биогенных элементов (в составе среды Раймонда), и особенно суспензии УОМ (табл. 1).

Внесение вместо глауконита опилок в количестве 6,5 г не выявило заметных различий между вариантами (табл. 1). Однако увеличение количества опилок до 12 г (т.е. от 1,7 до 3,2 объема НШ) привело к увеличению дыхательной активности в 1,7 раза.

Если сравнивать эффект от внесения опилок и глауконита, то стимулирующее действие глауконита заметно уже в небольших дозах (6,5 г), хотя объем вносимого глауконита был в 5 раз меньше, чем объем опилок. Это означает, что существенное значение имеет большая поверхность мелкозернистого разрыхлителя, заселяемого

микроорганизмами. Однако при внесении большого количества опилок (в 3 раза больше веса НШ) интенсивность дыхания была выше, чем для того же количества глауконита. Это свидетельствует о качественном изменении естественной аэрации при использовании больших объемов опилок.

Целью следующего эксперимента было изучение влияния количества разрыхлителя, добавленного в НШ вместе с микроорганизмами и биогенами. В качестве разрыхлителя вносили опилки в разных количествах: 5; 7,5; 10 и 13 г, в объемных долях 0,84; 1,26; 1,67 и 2,18 соответственно.

Таблица 1.

Суммарное количество углерода CO₂, образованного в присутствии глауконита и опилок. Отношение объемов разрыхлителя к НШ показано как Vразр/Vнш.

Вариант	V разр/Vнш	мгС-CO ₂	% от контроля
Контроль (НШ + вода)	0	91	100
Глауконит 6.5 г + вода	0.286	131	143
Глауконит 6.5 г + биогены	0.286	166	182
Глауконит 6.5 г + биогены + м/о	0.286	205	126
Опилки 6.5 г + вода	1.742	154	169
Опилки 6.5 г + биогены	1.742	159	175
Опилки 6.5 г + биогены + м/о	1.742	168	184
Глауконит 12 г + биогены + м/о	0.528	253	278
Опилки 12 г + биогены + м/о	3.216	284	311

Изучение динамики дыхания НШ в присутствии различных количеств опилок подтвердило, что увеличение доли разрыхлителя увеличивает скорость дыхания. В отсутствие опилок или при небольших их количествах (0.8–1.3 объема НШ), наблюдается лишь кратковременный всплеск активности. Более высокие содержания разрыхлителя (1.6–2.0 объема) изменяют динамику дыхания, увеличивая на максимуме скорость дыхания до 2,5 раза, а суммарное количество образовавшегося CO₂ – в 3 раза (рис. 3).

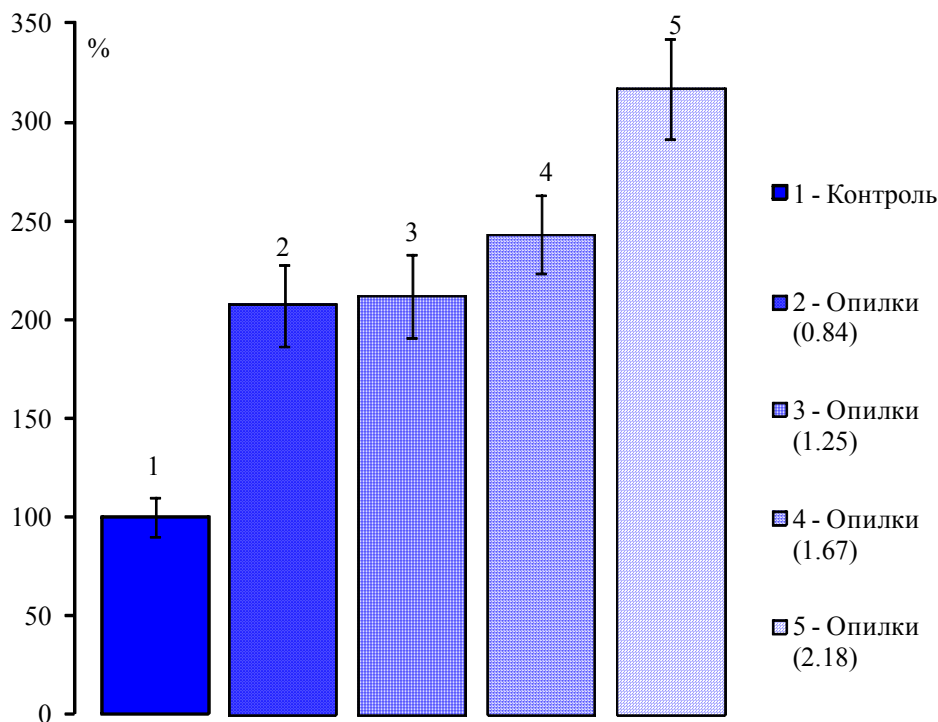


Рис. 3. Стимуляция образования CO₂ при различных объемах разрыхлителя; в скобках – отношение объемов разрыхлителя к НШ (в скобках соотношение объемов нефтешлама и опилок)

Хроматография гексановых экстрактов НШ в конце экспериментов показала значительное потребление углеводов, особенно легкой фракции (C10 – C19), и частичное потребление более тяжелых компонентов. В присутствии опилок (1,26 объема НШ и выше) происходила утилизация около 50% n-алканов.

С целью определения возможности использования различных типов разрыхлителей при проведении биоремедиационных работ с плотным НШ были проведены эксперименты с опилками, асбестом и пенопластом. Кроме того, оценивали значение перемешивания как дополнительного фактора, ускоряющего деструктивные процессы.

Суммарное количество CO₂, выделенного в процессе культивирования, для вариантов с близкими объемными соотношениями опилок и асбеста несколько выше для варианта с асбестом (в 1,2 раза, рис. 4). Таким образом, применение таких разрыхлителей с наибольшей поверхностью, как глауконит или асбест, дает определенное преимущество.

Перемешивание приводит к увеличению скорости дыхания, в варианте с опилками без перемешивания суммарное количество образовавшегося CO₂ в 1,2 раза меньше, чем в варианте с перемешиванием (рис. 4).

При увеличении доли опилок до величин более 1.6 от объема НШ наблюдается значительное увеличение дыхательной активности НШ. В варианте с внесением опилок объемом 2,1 суммарное количество образовавшегося CO_2 в 1,6–1,7 раза выше, чем в варианте с внесением опилок объемом 0,54 или контролем (рис. 4).

Хроматография остаточных n-алканов показала высокую степень деградации углеводов: в присутствии 6-8 г опилок – до 98-99%, в случае асбеста – до 90%.

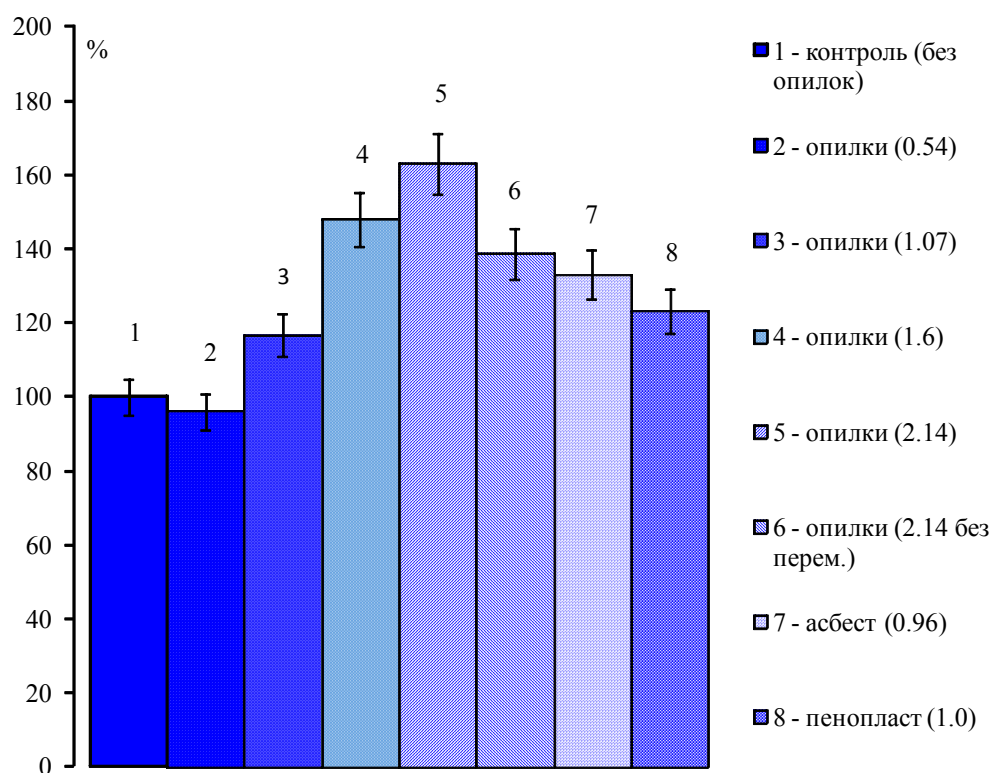


Рис. 4. Стимуляция образования CO_2 в присутствии опилок, асбеста и пенопласта; в скобках – отношение объемов разрыхлителя к НШ (в скобках соотношение объемов нефтешлама и опилок)

Для исследования влияния степени увлажнения в сосуды, содержащие 35 г НШ, 5 г опилок и 12 мл среды Раймонда с суспензией бактерий, вносили воду в продолжение всего эксперимента, поддерживая в каждом варианте свой уровень увлажнения. Степень увлажнения контролировали по весу сосуда.

Результаты, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что при небольшом увлажнении (18%) процессы дыхания были существенно подавлены, количество образовавшегося CO_2 почти в 3 раза ниже чем в вариантах с более высокой влажностью.

При влажности от 45 до 79% суммарное количество CO₂ оказалось достаточно близким. Однако при 100% -ом увлажнении активность дыхания составила только 60% от максимального значения (табл. 2). Таким образом, увлажнение, выходящее за пределы диапазона 45–79%, недостаточное или избыточное, должно быть неблагоприятно для окислительных процессов в почвах, которые загрязнены большими концентрациями нефтешлама.

Таблица. 2.

Общее количество CO₂, образованного при окислении нефтешлама при различных степенях увлажнения.

Степень увлажнения, по отношению к весу НШ, %	Суммарное количество CO ₂ (мг С-CO ₂)
18	307
45	855
58	887
79	795
100	540

Исследование влияния гуминовых кислот на процесс деструкции углеводородов проводили в 150- мл флаконах, содержащих 25 мл среды Раймонда, 0,5 г НШ и различные концентрации препарата гуминовых кислот, предварительно нейтрализованного до нейтральных значений pH (7,5). Флаконы засеивали суспензией углеводородоокисляющих микроорганизмов *P. aeruginosa* и *Y. lipolytica* (10⁷ КОЕ/мл) и затем инкубировали на качалке при 120 об/мин и температуре 30 °С.

Сравнение интенсивности дыхания в вариантах с нефтешламом в присутствии различных концентраций гуминовых кислот показало, что внесение гуминовых кислот в небольших концентрациях (0,25–0,5 г/л) приводит к усилению окисления нефтепродуктов в 3 раза (рис. 5).

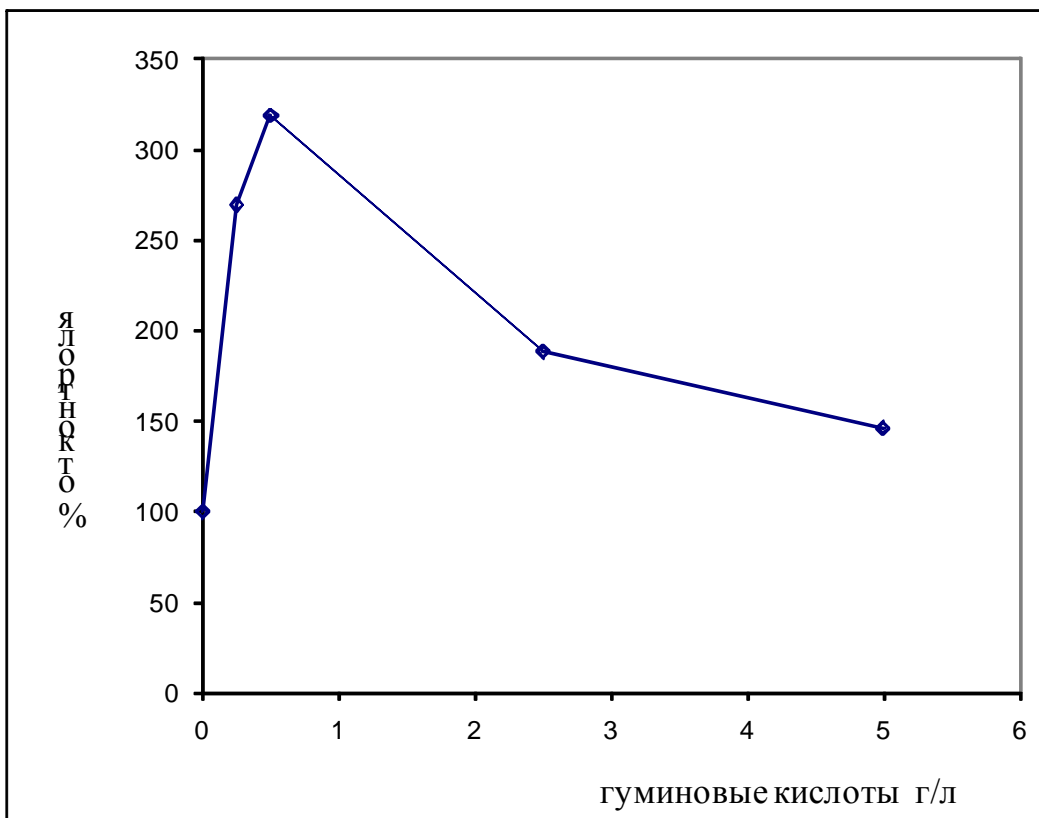


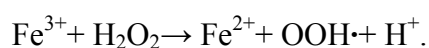
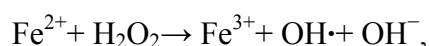
Рис. 5. Эффект стимулирования дыхания при деструкции НШ в присутствии различных концентраций гуминовых кислот

Исследование возможности использования реакции Фентона для повышения степени биодеструкции НШ. В составе нефтешламов на долю нормальных парафинов (н-алканов) приходится около трети общего количества углеводородов. Остальное приходится на долю циклопарафинов и ароматических (в т.ч. полиароматических) соединений. Эти соединения более устойчивы к микробиологической деструкции и их окисление по сравнению с н-алканами требует более продолжительного времени.

Возможность предварительного окисления устойчивых углеводородов нефтешлама исследовали в реакции Фентона [10].

Реакция Фентона – реакция пероксида водорода (H_2O_2) с ионами железа (Fe^{2+}), которая используется для разрушения многих органических веществ [11].

Ионы железа(II) окисляются пероксидом водорода до ионов железа(III), а затем под действием пероксида снова переходят в железо(II):



Образующиеся при этом кислородсодержащие радикалы чрезвычайно реакционны и способны полностью окислять легкую органику, что широко используется при очистке сточных вод.

Эксперименты проводили во флаконах объемом 150 мл с 20 мл среды Раймонда и 0,6 мл нефтешлама. Перекись водорода и сульфат железа вносили в соответствующие варианты опыта, флаконы закрывали резиновыми пробками и помещали на качалку при температуре 30 °С на 24 часа. Начальная концентрация H_2O_2 составляла 3,4 г/л, а $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 2,8 г/л. Затем вносили суспензию углеводородокисляющих микроорганизмов в количестве 10^{12} кл на флакон и дальнейшую инкубацию проводили на качалке при 30 °С 120 об/мин. Полученные результаты представлены на рис. 6.

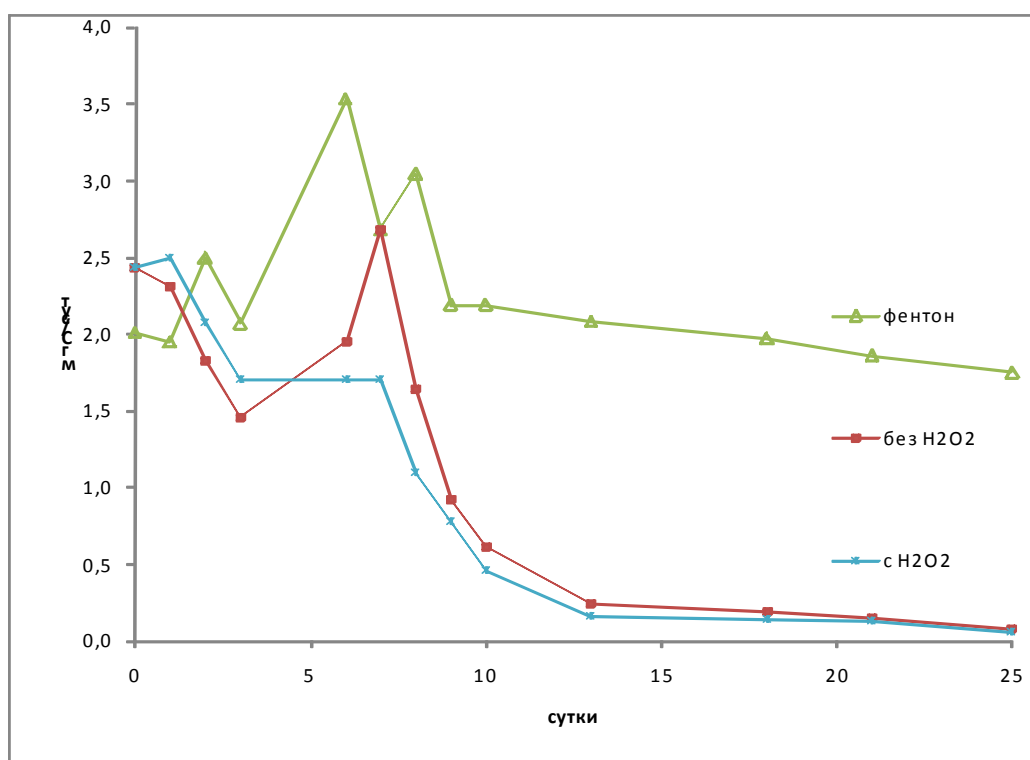


Рис. 6. Динамика скорости дыхания после предварительной обработки нефтешлама с помощью H_2O_2 и Fe^{2+} (по Фентону), а также в вариантах с предварительной обработкой H_2O_2 , но без Fe^{2+} или Fe^{2+} , но без H_2O_2

Предварительная обработка нефтешлама по методу Фентона дает ощутимый вклад в активацию дыхательных процессов. На 10 сутки эксперимента активность дыхания в вариантах с неполным составом реагентов резко снизилась, что, вероятно, связано с завершением процесса окисления углеводородов алифатического ряда. В варианте с реагентами Фентона такого резкого снижения дыхательной активности не наблюдалось,

что указывает на более глубокую степень окисления углеводородов нефтешлама. Последнее возможно только при вовлечении в микробиологические процессы углеводородов, окисленных в ходе указанной реакции. Суммарный выход CO_2 в варианте со всеми реагентами реакции Фентона был в 3 раза выше, чем в вариантах с отдельными реагентами.

В следующих экспериментах исследовали влияние реакции Фентона на дыхательную активность при окислении нефтешлама нативной и интродуцированной микрофлорой.

Эксперименты проводили во флаконах объемом 150 мл с 20 мл среды Раймонда с добавлением 0,15% гуминовых кислот (ГК) и 0,6 мл нефтешлама. Часть флаконов стерилизовали при 0,5 атм в течение 30 мин, и эти варианты обозначались как НС (нефтешлам стерильный). Другая часть флаконов участвовала в экспериментах без стерилизации и обозначалась как Н (нефтешлам). Перекись водорода и сульфат железа вносили в соответствующие варианты опыта, флаконы закрывали резиновыми пробками и помещали на качалку при температуре 30 °С на 24 часа. Начальная концентрация H_2O_2 составляла 0,34 г/л (10^{-2} М), а $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2,8 г/л (10^{-2} М). В отдельные варианты вносили суспензию углеводородоокисляющих микроорганизмов *P. aeruginosa*, 201; *Y. lipolytica*, 367-4 в конечной концентрации 10^8 клеток/мл по каждой культуре.

Через 7 суток в газовой фазе определяли содержание CO_2 . Результаты представлены в табл. 3, при этом за 100 % было принято полученное максимальное значение концентраций CO_2 (вариант 1, табл. 3). Полученные результаты коррелируют с ранее полученными данными и свидетельствуют, что максимальный эффект при окислении нефтешлама наблюдается в варианте, где наряду с реакцией Фентона используются специализированные нефтеокисляющие микроорганизмы.

В целом можно констатировать, что предварительная обработка нефтешлама реактивами Фентона повышает степень биодеструкции нефтешлама. При этом суммарный выход углекислоты в процессе микробиологической деструкции увеличивается в два раза. Учитывая ранее полученные результаты, можно предположить, что реакция Фентона делает доступными микробиологическому окислению около 50% остаточных углеводородов.

Таблица 3.

Влияние реакции Фентона на дыхательную активность микроорганизмов при окислении нефтешлама.

№ варианта эксперимента	Нефтешлам	Реагенты Фентона	Микроорганизмы	Биогены+ГК	Относительное содержание CO ₂ , %
1	НС	10 ⁻²	+	+	100
2	НС	10 ⁻²	-	+	0
3	НС	нет	+	+	45
4	Нет	нет	+	+	0
5	Н	10 ⁻²	-	++	0
6	Н	нет	+	+	24
7	Н	нет	-	++	17

ВЫВОДЫ

1. Показано влияние ацетата, гуминовых кислот, биогенных элементов (N, P), мелиорантов (разрыхлителей) и воды (влажности) на активацию микробиологических процессов окисления нефтешлама. Использование оптимальных соотношений позволяет интенсифицировать процессы микробиологического окисления нефтешлама в несколько раз.

2. Показано, что интродукция высокоактивных штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов позволяет увеличить активность окисления нефтешлама в 4-5 раз.

3. Предварительная обработка нефтешлама реактивами Фентона повышает степень его биодеструкции как минимум в 2 раза.

4. Полученные результаты дают основание для использования биопотенциала углеводородокисляющих микроорганизмов при разработке технологии детоксикации нефтешлама.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Dibble J.T., Bartha R.* Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge//Appl. Environ. Microbiol. 1979. V. 37. No. 4. P. 729–739.

2. *Genouw G., de Naeyer F., van Meenen P., van de Weft H., de Nijs W., Verstraete W.* Degradation of oil sludge by landfarming - a case-study at the Ghent harbor// Biodegradation. 1994. V.5. P. 37–46.

3. *Bossert I., Kachel W.M., Bartha R.* Fate of hydrocarbons during oily sludge disposal in soils//Appl. Environ. Microbiol. 1984, V.67. No. 4. P. 763–767.

4. Sandvic S., Lode A., Pedersen T.A. Biodegradation of oily sludge in Norwegian soils// Appl. Microbial. Biotechnology. 1986. V. 23. P. 297–301.
5. Marin J.A., Moreno J.L., Hernandez T., Garcia C. Bioremediation by composting of heavy oil refinery sludge in semiarid conditions//Biodegradation. 2006. V.17. P. 251–261.
6. Mishra S. Jyot J., Kuhad R C., Banwari Lal. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil//Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67, No. 4. P. 1675–1681.
7. Mishra S., Jyot J., Kuhad R.C., Banwari Lal. In situ bioremediation potential of an oily sludge-degrading bacterial consortium//Current. Microbiology. 2001. V. 43. P. 328-335.
8. Nikitina E.V. , Yakusheva O. I., Zaripov S. A., Galiev R.A., Garusov A.V., Naumova R.P. Distribution and Physiological State of Microorganisms in Petrochemical Oily Sludge// Microbiology. 2003. V. 72. No. 5. P. 621–627. Translated from Mikrobiologiya, Vol. 72. No. 5, 2003. P. 699–706.
9. Shi De-qing, Zhang Jian, Gui Zhao-long, Dong Jian, Wang Tian-li, Valentina Murygina, Sergey Kalyuzhnyi. Bioremediation of Oil Sludge in Shengli Oilfield//Water Air Soil Pollut. 2007. V.185. P.177–184.
10. Fenton H. J. H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. J. Chem. Soc., Trans.// 1894. 65. P. 899–911.
11. Соловьева А.А. Окислительная деструкция нитрозамещенных фенолов: Автореф. дис... канд. хим. наук, Иваново, 2009.