



Гидротехнологии Сибири



Исследование обезвреживания почв и шламов, загрязненных нефтепродуктами, с помощью микроорганизмов

Магистрант: Вронская М.А.

Научный руководитель: Фомина Е.Ю.

г. Иркутск, 2013

Актуальность, цель и задачи работы



Гидротехнологии Сибири



Актуальность работы – существующая проблема поиска наиболее эффективного с экологической и экономической точки зрения способа обезвреживания нефтешламов и загрязненных нефтью почв.

Цель работы - исследование способности обезвреживания нефтешламов с помощью микроорганизмов.

Задачи работы:

- проведение анализа существующих способов утилизации нефтешламов, их применимости, преимуществ и недостатков;
- изучение характеристики отечественных биопрепаратов, предлагаемых для очистки почв от загрязнения нефтью и нефтепродуктами;
- изучение свойств бактериальных штаммов, выделенных из долгохранившихся нефтепродуктов, бионефти и навоза крупного рогатого скота;
- оценка углеводородокисляющей активности исследуемых штаммов в процессе обезвреживания нефтешламов.

Объект и методы исследования работы



Гидротехнологии Сибири



Объекты исследования:

- Исследуемые культуры - 5 бактериальных штаммов, выделенных из долгохранившихся нефтепродуктов, бионефти и навоза КРС
- Вещества, используемые для изучения субстратной специфичности штаммов:
 - различные углеводороды нефти;
 - нефть и нефтепродукты;
 - нефтешлам, образованный при зачистке мазутного резервуара

Методы исследования:

- Изучение морфолого-культуральных признаков выделенных штаммов;
- Изучение физиолого-биохимических признаков;
- Изучение субстратной специфичности выделенных штаммов;
- Оценка углеводородокисляющей способности микроорганизмов;
- Статистическая обработка результатов.

Исследовательская часть работы проводилась совместно с лабораторией водной токсикологии НИИ биологии при ИГУ (зав. лабораторией - Д.И.Стом)

Научная новизна и практическая значимость работы



Гидротехнологии Сибири



Научная новизна работы

Проведено изучение углеводородокисляющей способности алканотрофных штаммов микроорганизмов на углеводородах, нефти и нефтепродуктах, нефтешламах.

Исследованы морфолого-культуральные и физиолого-биохимические свойства и субстратную специфичность данных штаммов.

Практическая значимость и реализация результатов работы

Проблема утилизации как накопленных так и вновь образующихся нефтешламов является одной из остро стоящий в нефтегазовом комплексе.

Данная работа производилась по одному из перспективных направления развития деятельности ООО «ГТС» (организации, занимающейся утилизацией нефтесодержащих отходов).

Проведенные исследования являются первым шагом на пути проработки возможности реализации биотехнологического метода переработки нефтеотходов.

Предполагается, что данный способ утилизации остаточных (после выделения жидкой части) нефтешламов и загрязненного грунта будет являться более эффективным и с экологической, и с экономической точки зрения.



Гидротехнологии Сибири



1 Современное состояние проблемы утилизации нефтеотходов

Нефтяное загрязнение, его негативное влияние на окружающую среду



Гидротехнологии Сибири



Нефть и нефтепродукты являются наиболее распространенным загрязнителем природных экосистем. К числу основных характеристик этого загрязнения можно отнести органогенную природу, сложный многокомпонентный состав, токсичность ряда составляющих, масштабность распространения, высокую миграционную способность.

Согласно одной из экспертных оценок, потери нефти в мире при ее добыче, переработке и использовании превышают 45 млн. т в год или 2% от ее добычи, из них 22 млн. т теряется на суше, что составляет 48,9% от общей потери, или 0,98% от добычи.

Со временем происходит накопление нефтепродуктов в водоемах, реках и в почве, поскольку скорость их поступления превышает возможности природы к самоочищению от токсических веществ химическими методами.



Наше сообщество встало перед проблемой масштабной загрязненности окружающей среды и нефтепродуктами. Положение уже настолько серьезное, что требует срочных мер для борьбы с этим загрязнением хотя бы на уровне сегодняшнего дня.

Нефтешламы, природа образования, характеристики



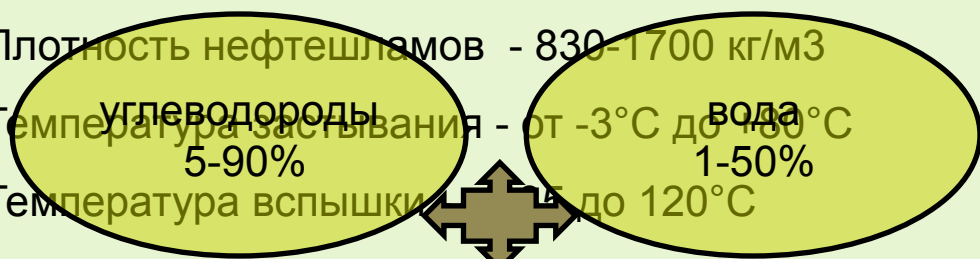
Гидротехнологии Сибири



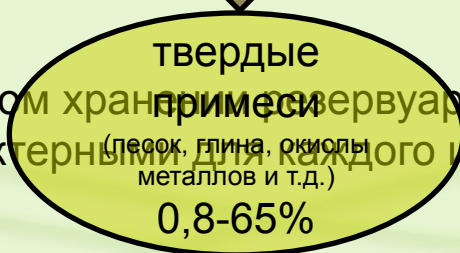
Поскольку любой шлам образуется в результате взаимодействия с конкретной по своим условиям окружающей средой и в течение определенного промежутка времени, **одинаковых по составу и физико-химическим характеристикам шламов в природе не бывает.**

Нефтешламы - многокомпонентные физико-химические (смеси)

- ✓ Плотность нефтешламов - 830-1700 кг/м³
- ✓ Температура застывания - от -3°C до +40°C
- ✓ Температура вспышки - от -5 до 120°C



При длительном хранении резервуарные нефтешламы опять же разделяются на несколько слоев, с характерными для каждого из них свойствами.



Методы переработки и обезвреживания нефтешламов



Гидротехнологии Сибири



Методы переработки и обезвреживания нефтешламов:

- ✓ – механические (отстаивание, гидрообработка, центробежное разделение и гидроциклический метод);
- ✓ – физико-химические (экстракция, флотация и сбор нефтепродуктов барабанными сепараторами);
- ✓ – термические (сжигание, пиролиз);
- ✓ – биохимические (активизация метаболической активности естественной микрофлоры, внесение специально подобранных штаммов);

ванные на сочетании вышеперечисленных методов.

Основная технология переработки нефтяных шламов :

переработка нефтеэмульсионного слоя с утилизацией нефтепродуктов;

переработка водозэмульсионного слоя с утилизацией или обезвреживанием нефтепродуктов;

обезвреживание осадочного слоя, близкого по своим свойствам к нефтезагрязнённым грунтам.



Биохимический метод переработки нефтезагрязнений (алканотрофные бактерии, механизмы биodeградации)



Гидротехнологии Сибири



В основе биотехнологий для нефтяной промышленности лежит способность микроорганизмов к окислению углеводов.

Совершая колоссальную биохимическую работу, они утилизируют органические и минеральные соединения, непрерывно синтезируя новые вещества. Микроорганизмы – единственные живые существа способные использовать углеводороды, как источник энергии.

Наиболее часто упоминаемые среди алканотрофных бактерий - это *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* и многие другие.

Изученные механизмы биodeградации:

- ✓ алифатических углеводов (моно-, ди- и внутритерминальными путями)
- ✓ ароматических структур (аэробные бактерии: окисление ароматическое кольцо до катехолов и гидрохинонов с последующим окислительным раскрытием ароматического кольца; анаэробные бактерии: восстановление ароматического кольца с дальнейшей дефрагментацией образовавшихся циклогексановых производных)
- ✓ полиароматических углеводов (использование обоих атомов молекулярного кислорода с получением цисдигидродола, который затем подвергается дегидрогенизации, образуется катехол)

Биохимический метод переработки нефтезагрязнений (подходы и условия применения)



Гидротехнологии Сибири



Основные подходы в биоремедиации



Для оптимизации процесса биodeградации нефти необходимо решить следующие вопросы:

1. Способ должен быть экологически чистым.
2. Для обеспечения физиологического баланса кроме имеющегося источника углерода и энергии необходима добавка источников азота, фосфора, калия, магния.
3. Необходимо обеспечить аэрацию, так как разложение нефти наиболее эффективно в аэробных условиях.
4. Обеспечить численное преимущество для биодеструкторов и защитить их от паразитирующих видов.
5. Создать оптимальную концентрацию нефти.
6. Обеспечить необходимый уровень pH и влажности.

Российские биопрепараты, описание, опыт применения



Гидротехнологии Сибири



В настоящее время известен целый ряд биологических препаратов состоящих как из отдельных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов, так и из микробных ассоциаций.

Сводная характеристика отечественных биопрепаратов - нефтедеструкторов

№ п/п	Параметр	Диапазон возможных изменений параметра
1	Углеводородоокисляющие микроорганизмы	от монокультуры до ассоциации
2	Титр микроорганизмов, кл/мл (кл/г)	$2,8 \cdot 10^8$ кл/г; 10^{10} - 10^{11} кл/мл; плотность 10^6 кл/см
3	Форма биопрепарата	жидкость, жидкий гель, паста, суспензия, эмульсия, порошок
4	Характер загрязнения	нефть и нефтепродукты, керосин, сырая нефть, мазут, тяжелые фракции нефти, длительное загрязнение нефтью, нефтешлам
5	Степень загрязнения	толщина загрязненного слоя < 3 см; 1 кг/м ² ; 10-30%; 60%; 175 г/кг; 60 – 80 м ³ /га
6	Продолжительность очистки	от 72 часов до 4-х месяцев, в среднем 2-3 месяца
7	pH	1,5 – 10; широкий диапазон
8	t°C	3 - 50°C; широкий диапазон
9	Эффективность очистки загрязнения (% от исходного загрязнения)	сырая нефть 50 – 90; нефть 25 – 94; парафины 98; дизельное топливо 85 – 95; нефтепродукты 50 -100; нефтешлам 33 – 53; длительное загрязнение нефтью 78 - 96

Реального использования микробиологических препаратов в России (имеется в виду сертифицированная и производящаяся в промышленных масштабах продукция) для очистки среды от углеводородного загрязнения практически нет.

Выводы по литературному обзору



Гидротехнологии Сибири



1. Нефть и нефтепродукты являются распространенным загрязнителем природных экосистем.
2. Одним из основных видов нефтеотходов, образуемых в результате хозяйственной деятельности, - являются нефтешламы.
3. Решающим фактором, определяющим загрязняющие свойства шламов, а также направления их утилизации и нейтрализации вредного воздействия на объекты природной среды, является состав и физико-химические свойства.
4. Выбор способа переработки зависит от качества шлама и состава содержащихся в нем нефтепродуктов и механических примесей.
5. В связи с тем, что при выборе способа утилизации приоритет в основном отдается способам, направленным на извлечение из нефтешламов углеводородного сырья, сверх актуальной остается проблема доочистки образовавшихся в результате переработки твердых отходов и водной фазы. И одним из наиболее перспективных с экологической и экономической точки зрения способов доочистки данных отходов, на взгляд автора, является биотехнологический метод.
6. В настоящее время известен целый ряд биологических препаратов состоящих как из отдельных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов, так и из микробных ассоциаций. Однако, по реальному использованию микробиологических препаратов (имеется в виду сертифицированная и производящаяся в промышленных масштабах продукция) для очистки среды от углеводородного загрязнения практически нет.



Гидротехнологии Сибири



2 Исследовательская часть



Исследуемые культуры

Шифр штамма	Источник выделения
Б-1	Бионефть
3-15	Долгохранившийся мазут
17-1	Долгохранившийся дизель
ACHZ	Креозот
Н-1	Навоз КРС

Вещества, используемые для изучения субстратной специфичности штаммов

Вещества

1. Различные углеводороды нефти следующие соединения и вещества: углеводороды: гексан $[C_6H_{14}]$, октан $[C_8H_{18}]$, изооктан, декан $[C_{10}H_{22}]$, декалин, изопропилбензол $[C_6H_5CH(CH_3)_2]$, тетрадекан, хроматографические метки C_{21} , C_{23} , додекан, тридекан

2. Нефтепродукты: нефть Марковского месторождения Иркутской области, топочный мазут, бензин автомобильный 92 марки, дизельное топливо (зимний и летний сорта), базовое масло, реактивное топливо, вазелиновое масло

3. Нефтешлам, образованный при зачистке мазутного резервуара РВС-100 (работы по зачистке резервуара проводились ООО «ГТС», объем отобранного материала – 5 литров, дата отбора – 05.11.2012г.)

Свойства исследуемых штаммов



Гидротехнологии Сибири



Проведенные исследования дали следующие результаты:

- **Морфолого-культуральные свойства исследуемых штаммов**. Все исследуемые штаммы грамположительны. 3 из выделенных изолятов представлены спорообразующими палочками. 2 культуры обладают полиморфностью.
- **Культуральные свойства исследуемых штаммов**. На скошенном РПА рост обильный с гладкой или шероховатой поверхностью, грязно-белого или желтовато-белого цвета. Штамм АСНЗ представлен колониями красного цвета. При росте в МПБ для всех культур характерно образование осадка, на 5-е сутки отмечено появление пристеночного кольца.
- **Физиолого-биохимических признаков исследуемых штаммов**. Способностью к использованию минеральных солей азота обладают 2 штамма (АСНЗ и Н-1). Все пять штаммов являются аэробными. Изоляты Б-1, Н-1 оказались оксидазоположительными. Кatalазоположительными были АСНЗ, 17-1 и 8 3-15. Культура Н-1 и производила незначительное количество H_2S . Остальные изоляты не обладали такой способностью. Желатин разжижали все исследуемые штаммы. При росте на молоке, образование казеинового сгустка наблюдали у 4 штаммов из 5. Изолят 17-1 не обладал казеинкиназой. Лецитиназную активность проявили все штаммы, но в разной степени. Наибольшей активностью фиксировали у культуры 3-15. Липолитическую активность наблюдали у всех исследуемых изолятов. Культуры не образовывали АМК. Все исследуемые культуры ферментировали из сахаров мальтозу, лактозу и глюкозу, рамнозу, из спиртов - глицерин. Три штамма использовали дульцит, два (АСНЗ и 3-15) такой способностью не обладали.
- **Таким образом, по совокупности исследованных морфолого-культуральных и физиолого-биохимических признаков изолятов, можно сделать вывод, что штаммы Н-1, 3-15, Б-1 относятся к роду *Bacillus*, АСНЗ – *Rhodococcus*, 17-1 – *Actinomyces*.**

Субстратная специфичность исследуемых штаммов (1)



Гидротехнологии Сибири



Рост исследуемых штаммов на средах с углеводородами

Углеводороды	Исследуемые культуры				
	Б-1	3-15	17-1	ACHZ	Н-1
Октан	++	++	++	+	++
Декалин	±	±	-	-	±
Тетрадекан	+	+	+	+	++
С21	++	+	-	++	++
Изооктан	+	+	±	+	++
Декан	-	±	-	+	++
С23	++	+	+	+	++
Додекан	±	±	+	+	++++
Тридекан	++	+	++	+	+
Изопропилбензол	±	-	±	-	±

Примечание: «++++» - обильный рост; «+++» - хороший рост; «++» - умеренный рост; «+» - слабый рост; «±» - скудный рост; «-» - отсутствие роста.

Субстратная специфичность исследуемых штаммов (2)



Гидротехнологии Сибири



Рост исследуемых штаммов на средах с нефтью и нефтепродуктами

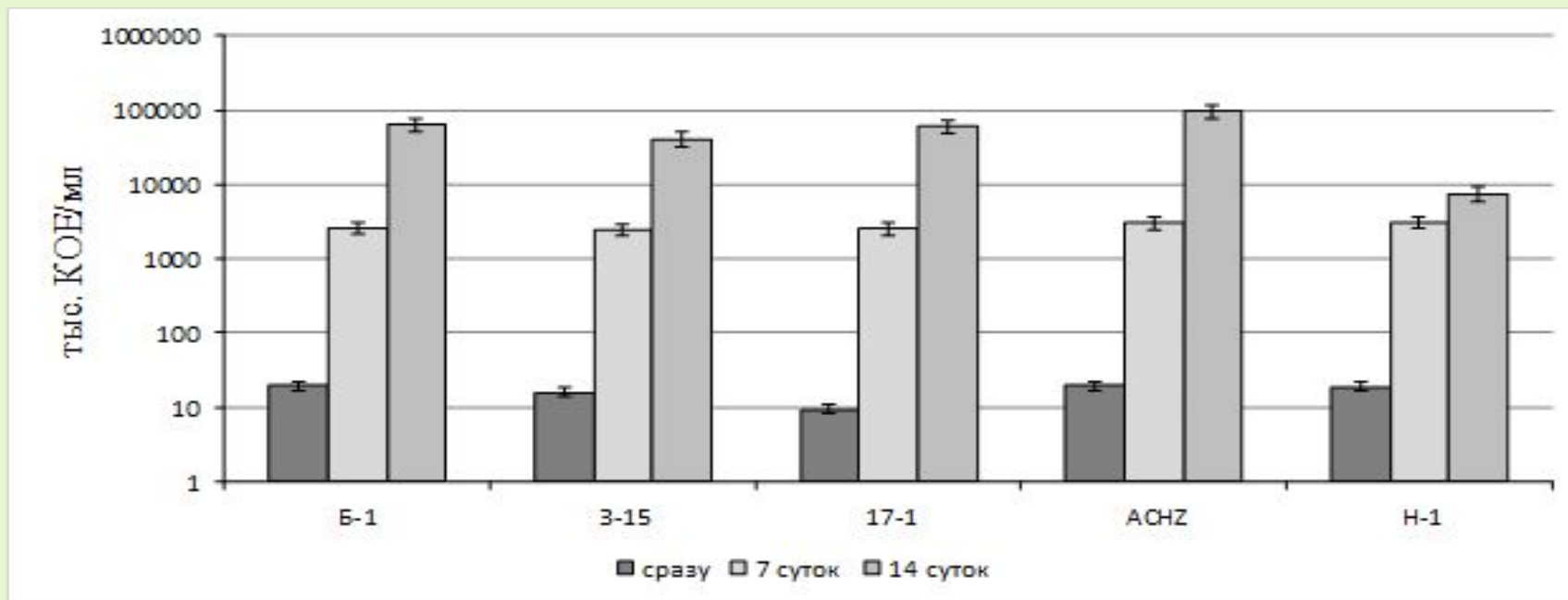
Углеводороды	Исследуемые культуры				
	Б-1	3-15	17-1	ACHZ	Н-1
Нефть	++	+	+	+	++++
Дизельное топливо летнее	±	+	+	++	++
Дизельное топливо зимнее	+++	+++	+	+	++++
Мазут	+	+	+	+	+++
Бензин	+	+++	+	+	++++
Базовое масло	++	++	+	+	+++
Реактивное топливо	++	+	+	+	++
Вазелиновое масло	+	++	+	-	+

Примечание: «++++» - обильный рост; «+++» - хороший рост; «++» - умеренный рост; «+» - слабый рост; «±» - скудный рост; «-» - отсутствие роста.

Сохранение жизнеспособности штаммов на среде с нефтешламом



Гидротехнологии Сибири



При изучении выживаемости исследуемых изолятов на нефтешламе, образованном при зачистке мазутного резервуара, был выявлен рост у всех штаммов. Рост культур фиксировали в течение всего эксперимента.

Титр определяли на круговой качалке (180 об/мин.) при температуре 25°C, используя метод серийных разведений с последующим высевом на РПА.

Углеводородокисляющая способность штаммов на среде с нефтешламом



Гидротехнологии Сибири



Деструкция среды с нефтешламом исследуемыми штаммами

штамм	Исходная концентрация нефти (г/л)	через 1 неделю концентрация нефти (г/л)	степень деструкции (%)	через 2 недели концентрация нефти (г/л)	степень деструкции (%)
Б-1	1,00±0,15	0,20±0,02	80,00	0,03±0,004	97,00
3-15	1,10±0,19	0,07±0,01	93,64	0,04±0,001	96,36
17-1	1,20±0,17	0,11±0,01	90,83	0,01±0,001	99,25
ACHZ	0,90±0,11	0,15±0,02	83,33	0,01±0,001	99,22
Н-1	1,00±0,09	0,09±0,01	91,00	0,03±0,001	97,00

В первую неделю эксперимента у штамма Б-1 фиксировали наименьшую убыль нефтепродуктов. Через 2 недели эксперимента у всех культур степень деструкции составляла не менее 95%.

Содержание нефтепродуктов определяли флуориметрическим методом по ПНД Ф 14.1:2:4.128-98.

Выводы по исследовательской части



Гидротехнологии Сибири



Результаты проведенных исследований показали:

- 1) По совокупности изученных морфолого-культуральных и физиолого-биохимических признаков штаммов, выделенных из отходов долгохранившихся нефтепродуктов, бионефти и навоза КРС, можно сделать вывод, что изоляты под шифрами Н-1, 3-15, Б-1 представленные грамположительными спорообразующими палочками были отнесены к роду *Bacillus*, грамположительная кокковая культура АСНЗ – *Rhodococcus*, штамм 17-1, способный к образованию воздушного мицелия – *Actinomyces*.
- 2) Исследуемые штаммы не обладали способностью расти на синтетической среде и среде Эшби. Все выделенные штаммы были аэробны. Все исследуемые культуры ферментировали из сахаров мальтозу, лактозу и глюкозу, рамнозу, из спиртов глицерин.
- 3) Как показали проведенные с помощью метода «лунок» эксперименты, изоляты в различной степени использовали октан, изооктан, тридекан и тетрадекан. При проведении исследований наибольшей активностью по отношению ко всем углеводородам обладал штамм Н-1. На декалине не наблюдался рост АСНЗ и изолята 17-1. Слабый рост на изопропилбензоле показали культуры 3-15, АСНЗ. Все тестируемые штаммы проявили способность разлагать нефть, дизельное топливо как летнее, так зимнее, бензин, реактивное топливо, базовое масло, мазут.
- 4) Анализ выживаемости микроорганизмов при культивировании на нефти показал, что все исследуемые изоляты сохраняли жизнеспособность в течение 14 суток как в нефти, так и в нефтешламах.
- 5) При оценке степени биодеструкции нефтепродуктов было выявлено, что за две недели инкубирования убыль нефти у всех штаммов была равна или выше 90%. Наименьшую степень деструкции нефти наблюдали у штамма 3-15, она составила 89,89%, а наибольшую у 17-1 – 98,97%. Убыль нефтепродуктов при культивировании исследуемых изолятов в среде с 1 %-м содержанием нефтешламов через 2 недели эксперимента у всех культур степень деструкции составляла не менее 95%, при этом первую неделю эксперимента у штамма Б-1 фиксировали наименьшую убыль нефтепродуктов (80%).

Заключение (1)



Гидротехнологии Сибири



В выполненной работе рассмотрены:

- ✓ вопросы нефтяного загрязнения;
- ✓ особенности образования, состав, свойства и методы утилизации нефтешламов;
- ✓ биохимические методы переработки нефтеотходов;
- ✓ характеристики и особенности российских биопрепаратов – нефтедеструкторов.

Сделаны выводы:

- ✓ о предпочтительности комплексных методов переработки нефтешламов, включающих в себя извлечение углеводородного сырья;
- ✓ о перспективности использования биохимического метода для обезвреживания остаточных нефтешламов и загрязненных грунтов;
- ✓ об оправданности индивидуального подбора подходящего углеводородоокисляющего микроорганизма или консорциума штаммов для конкретного случая (например, конкретного предприятия, конкретного вида отходов), а также последующей выработки оптимальных условий его производства и применения.

Заключение (2)



Гидротехнологии Сибири

Проведены исследования:

- ✓ морфолого-культуральных, физиолого-биохимических свойств исследуемых бактериальных штаммов;
- ✓ субстратной специфичность и углеводородокисляющей способности штаммов в процессе обезвреживания нефтешламов.

Полученный результат – подтверждение применимости обследованных штаммов для утилизации нефтеотходов.

Практическая ценность полученных результатов - создана база для последующего проведения натурных испытаний, по итогам которых может быть осуществлено применения микроорганизмов в реальных производственных условиях ООО «ГТС».

БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ!