ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НЕФТЕШЛАМА

Дурдымырат Гадамов,
директор Центра Технологий Академии наук Туркменистана,
доктор химических наук

Дуньягозель Аманназарова,
старший научный сотрудник лаборатории Технологий синтеза новых материалов
Центра Технологий Академии наук Туркменистана

Аннотация

В данной статье приведены результаты физико-химических, физико-механических и микробиологических исследований нефтешлама по выделению и идентификации аборигенной микрофлоры, а также углеводородокисляющих микроорганизмов – нефтедеструкторов почв, загрязненных нефтепродуктами. Проведены микробиологические и микологические анализы нефтезагрязненных почв и нефтешламов Туркменбашинского и Сейдинского нефтеперерабатывающих заводов Туркменистана.

В результате исследований почв, загрязненных нефтепродуктами Сейдинского нефтеперерабатывающего завода, были выявлены 3 штамма бактерий, 14 актиномицетов и 9 штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов. В нефтезагрязненных почвах Туркменбашинского нефтеперерабатывающего завода были выявлены 24 штамма бактерий, относящихся к 8 родам и 11 видам углеводородокисляющих микроорганизмов.

Ключевые слова: нефтезагрязненная почва, нефтешлам, аборигенная микрофлора, бактерии, актиномицеты, грибы, углеводородокисляющие микроорганизмы.

Введение

С развитием технологий продукты переработки нефти применяются во всех отраслях промышленности, из нефти и газа производится в больших количествах химические материалы, синтетические волокна, пластмасса, лаки, краски, моющие средства, минеральные удобрения и многое другое. В связи с этим объемы добычи нефти с каждым годом растут. Необходимость утилизации нефтешламов определяется многими причинами. В то же время отходы содержат ценное углеводородное сырье (Абзалов, 1988). В связи с этим проблемы, связанные с разработкой способов утилизации отходов и методов защиты окружающей среды от нефти и нефтепродуктов, являются наиболее остро стоящими и актуальными.

Целью исследования является проведение физико-химических, физико-механических и микробиологических исследований нефтешлама и выделение аборигенной микробиоты – нефтедеструкторов из почв загрязненной нефтешламом территорий Туркменбашинского и Сейдинского нефтеперерабатывающих заводов.

Туркменистан является одной из ведущих стран по добыче и переработке нефти и нефтепродуктов. В нашей стране функционирует Туркменбашинский комплекс нефтеперерабатывающих заводов в состав которого входит и Сейдинский

нефтеперерабатывающий завод. На территории заводов накоплено большое количество нефтешламов. Образуются они, как правило, при добыче, переработке нефти, очистке резервуаров.

На сегодняшний день актуальным и экономически эффективным методом утилизации нефтешламов является биологический метод, то есть микробиологическая очистка земель от нефтяного загрязнения, основанные на использовании чистых или смешанных культур углеводородокисляющих микроорганизмов в сочетании с веществами, стимулирующими их активность (Алексеев, 2011).

Основой реабилитации нефтезагрязненных почв путем применения штаммов микроорганизмов является учет факторов влияющих на деградацию нефти, т.е. рода, вида вносимых микроорганизмов и их влияние на естественные микробные сообщества; температура окружающей среды; pH среды; концентрация различных классов нефтяных углеводородов в почве; механического состава почвы и степени её аэрации. Еще одним важным требованием к данным микроорганизмам является их непатогенность (Бузолева, 2001).

Таким образом, утилизация и переработка нефтяных шламов на Туркменбашинском комплексе нефтеперерабатывающих заводов требует глубоких исследований и разработки экономически эффективных методов очистки нефтезагрезненных почв.

Нефтешламы (нефтяные шламы) – это сложные физико-химические смеси, состоящие из нефтепродуктов, воды и механических примесей, к которым относятся глина, песок, окислы металлов (Шпербер, 2014).

В зависимости от способа их образования нефтешламы разделяют на группы: грунтовые, придонные и резервуарного типа (Шангареев, 2000). Грунтовые нефтешламы образуются при проливе на грунт нефтепродуктов в аварийных ситуациях или в процессе производства. Одной из причин образования нефтешламов в резервуарах является физико-химическое взаимодействие нефтепродуктов с металлом резервуара, водой, кислородом и механическими примесями. Образование нефтешламов также происходит в водоочистных сооружениях, в системах оборотного водоснабжения, при ремонте оборудования, в процессе добычи, транспортировки и переработки нефти.

Воздействие нефти и нефтеотходов на основные свойства почвы. Разнообразные химические соединения нефти, состоящие из насыщенных углеводородов с нормальной и разветвленной цепью, олефинов, циклоалканов, ароматических углеводородов, асфальтенов (фенолы, жирные кислоты, кетоны, эфиры,порфирины) и смол (пиридины, хинолины, карбазолы и др.) (Мурзаков и др.,1992) попадая в почву, нарушают сложившийся биологический и геохимический баланс почвы. Эти нарушения возникают под действием различных механизмов: нарушение водно-воздушного режима почвы; изменение миграционной способности отдельных химических элементов в ней; ингибирования микробиоценоза.

Так, в ряде исследований (Халимов и др., 1996), при измерении величины влажности верхнего горизонта нефтезагрязненных почв, выявлено снижение этого параметра, тогда как в нижележащем горизонте отмечено его возрастание. С ростом нефтяного загрязнения влажность почвы закономерно возрастает с каждой последующей дозой в среднем на 1%. Причиной этого является снижение скорость транспирации влаги через вышележащий слой загрязненной нефтью почвы. Вследствие этого в нижних горизонтах почва часто избыточно увлажнена и

проявляет признаки заболачиваемости. Гидрофобные свойства изменяются при загрязнении лишь тяжелыми фракциями нефти, тогда как легкие – практически не влияют на физические свойства почвы. При этом гудрон оказывает в 35 раз более пагубное негативное воздействие на воздушно-физические свойства почвы, чем компоненты сырой нефти.

Эффект длительного воздействия нефти на почву проявляется в изменении её микробиологических свойств и комплекса почвенных микроорганизмов в целом. В почвах в большом количестве содержатся микроорганизмы, способные окислять различные углеводороды. Они являются обычными компонентами биоценозов почв (Benka-Coker, 1997). Нефть оказывает селекционное действие на почвенную микробиоту. В загрязненных почвах микроорганизмы, использующие углеводороды, находятся в большем количестве, чем в почвах без нефти.

Обнаружено увеличение количества узкоспециализированных форм микроорганизмов, окисляющих газообразные углеводороды, твердые парафины, ароматические и алифатические углеводороды. Среди них выявлены бактерии родов *Arthrobacter, Bacillus, Brevibacterium, Nocardia, Pseudomnas, Rhodococcus, Micrococcus, Micromonaspora* и др., микроскопические грибы родов *Aspergillus, Penicillium, Mucor, Fusarium, Trichoderma* (Исмаилов, 1985).

Нефтяное загрязнение почвы вызывает снижение численности актиномицетов, а численность бактерий и грибов возрастает, причем наименее чувствительными являются грибы видов *Rhižopus nigricans, Fusarium miniliforme, Aspergillus Havus* и A.Ustus (Славина и др., 1992). По другим данным при загрязнении нефтью возрастает доля бактерий, а актиномицетов и микромицетов – снижается.

По данным Славиной Т.П. и др. (Киреева, 1995) в загрязненных сырой нефтью подзолистых почвах на первом месте по численности находятся микромицеты, на втором – актиномицеты и на третьем – миксобактерии. Микромицеты рода *Penicillium*, потребляющие тяжелые фракции углеводородов, твердые битумы, сохраняются в небольшом количестве в самой верхней части почвы, актиномицеты исчезают полностью и остаются миксобактерии, что коррелируется (связано) с обогащением почвы органическим веществом и ухудшением её водно-физических свойств.

Н.М. Исмаилов (Мурзаков и др., 1992) также отмечает, что следствием увеличения содержания нефтепродуктов в почве является повышение содержания микроорганизмов. Свыше 40% общего количества микроорганизмов занимают актиномицеты, незначительную часть составляют микромицеты. Наибольшего развития грибной мицелий достигает в почве, загрязненной высокими концентрациями нефти 20-25%. Устойчивость грибов к нефтяному загрязнению, по мнению исследователей, связана с тем, что pH загрязненной почвы смещается в кислую сторону, что благоприятствует росту микромицетов.

Таким образом, при нефтяном загрязнении в почве происходят разнонаправленные изменения в комплексе почвенных микроорганизмов.

Характеристика углеводородокисляющих микроорганизмов. Углеводородокисляющие микроорганизмы широко распространены в природных экосистемах, так как способность к окислению углеводородов связана с наличием ферментов группы оксидаз (Духанин, 2003). Однако основной вклад в процесс микробиологического разрушения углеводородов вносят микроорганизмы, способные использовать нефть и нефтепродукты в качестве единственного источника углерода и энергии. Такие организмы встречаются, главным образом, среди аэробных форм и получили название «углеводородокисляющие микроорганизмы» (УОМ) (Алехин, 1998).

Углеводородокисляющие микроорганизмы являются частью гетеротрофного сообщества и присутствуют как в загрязненных, так и в незагрязненных экосистемах (Гриценко, 1997). От других гетеротрофных микроорганизмов они отличаются наличием комплекса ферментов и способностью к поглощению гидрофобного субстрата.

Загрязнение биоценоза нефтью и нефтепродуктами вносит дополнительный источник углерода в экосистему, что стимулирует развитие данной группы бактерий, поэтому в хронически загрязненных экосистемах, численность углеводородокисляющих бактерий всегда выше, по сравнению с незагрязненными, однако количественная связь между численностью углеводородокисляющих бактерий и количеством углеводородов в среде отсутствует (Минебаев, 1986).

Таксономический состав почвенных углеводородокисляющих микроорганизмов представлен, в основном, бактериями и грибами. Типичными обитателями почв являются виды родов *Arthrobacter, Bacillus, Mycobacterium, Brevibacterium, Rhodococcus, Nocardia, Klebsiella, Enterobacteriaceae, Alhaligenes, Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Trichodermau* др. (Фролова, 1986).

Известно, в состав доминирующих родов углеводородокисляющих бактерий в биоценозах зависит от природы нефтепродукта. Так Т.В.Коранелли (Алексеева, 2000) указывает, что для загрязненных экосистем характерно доминирование видов родов Rhodococcus, Pseudomonas, Acinetobacter и Arthrobacter.

Объекты и методы исследования. Объектами исследований являются нефтешламы Туркменбашинского нефтеперерабатывающего комплекса заводов (ТНПКЗ) в состав которого входит и Сейдинский нефтеперерабатывающий завод (СНПЗ), почва, загрязненная нефтепродуктами, а также углеводородокисляющие микроорганизмы, выделенные в ходе эксперимента. Были проведены химические, микробиологические и микологические анализы, с целью выявления аборигенной микрофлоры и УОМ – деструкторов нефти.

Проведены физико-химические исследования указанных образцов нефтешламов и почвы загрязненной нефтепродуктами. Исследования образцов включало определение плотности, содержание воды, механических примесей и органической части в нефтешламах. Все исследования проводились согласно государственным стандартам.

Определение массовой доли воды в нефтешламах проводили по TDS 6370-39, метод Дина-Старка. Сущность метода заключается в нагреве пробы в колбе с обратным холодильником в присутствии не смешивающегося с водой растворителя, который перегоняется вместе с водой, находящейся в образце, при этом конденсированная вода собирается в градуированной части ловушки (Дина-Старка), а растворитель возвращается в колбу.

Содержание механических примесей в нефтепродуктах определяли по TDS 6370-39. Сущность метода заключается в фильтровании испытуемых продуктов с предварительным растворением медленно фильтрующихся продуктов в бензине, промывании осадка на фильтре растворителем с последующим его высушиванием и взвешиванием.

Содержание в нефтешламе органической части оценивал, по потере массы при прокаливании.

Численность микромицетов учитывали методом разведения почвенной суспензии с последующим высевом на поверхность агаризированной среды Чапека-Докса. Для выделения актиномицетов использовали среду Чапека, а для УОМ минеральную среду с добавлением сырой нефти в качестве единственного источника углерода.

Идентификацию выделенных УОМ проводили с помощью аппарата VitecMS, принцип работы которого основан на колориметрическом методе.

Наличие факторов патогенности у УОМ определяли по способности мацерировать растительную ткань.

Результаты исследования и их обсуждение. Содержание воды в нефти и нефтешламах определяли методом Дина и Старка. Количество механических примесей, содержание в нефтешламе органической части и плотность определяли по стандартным методикам. Полученные результаты исследований приведены в таблице 1.

Таблица 1

Физико-химическая характеристика нефтешламов ТНПКЗ и СНПЗ

Происхождение нефтешлама	Образцы	Состав нефтешламов, %			Плотность, г/см^3
		Вода	Мех. примеси	Органическая часть	
ТНПЗ	Нефтешлам с установки мех. очистки	28,4	43,09	28,51	1,3055
	Нефтешлам с резервуара	3,4	51,12	45,48	1,4165
СНПЗ	Нефтешлам с установка мех. очистки	1,9	2,77	95,33	0,890
	Нефтешлам с резервуара	2,3	11,37	86,33	0,9765

Выделение бактерий проводили методом прямого посева на среду МПА (мясопептонный агар); численность углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) – методом прямого посева на агаризированную минеральную среду с нефтью, не прошедшей промышленную обработку; микроскопические грибы определяли в соответствии с общепринятыми методиками.

В результате проведенного микробиологического анализа почвы, загрязненной нефтепродуктами, были выделены бактерии и актиномицеты. Из них 3 вида бактерий-деструкторов нефти: *Alcaligenesfaecalis, Acinetobacterlwoffii, Pseudomonasputida*.

Из рода *Actinomyces* были выделены и определены 14 штаммов: 8 штаммов – *Actinomyces bovis*, 3 штамма – *Actinomyces viscosus*, 2 штамма – *Actinomyces israelii*, 1 штамм – *Actinomyces odontolyticus*.

Методом накопительных культур углеводородокисляющих микроорганизмов были выделены и определены: 3 штамма – *Pseudomonas strutzeri*, 6 штаммов – *Acinetobacter ursingii* - свободноживущий в почве *Azotobacter*.

Выделенные из почвы микромицеты характеризуются бедным видовым составом. В небольших количествах выделены микромицеты из родов: *Aspergillus – Aspergillus terreus, Aspergillus flavus; Penicillium – Penicillium funiculosum; Trichoderma – Trichoderma lignorum, Fusarium – Fusarium sambucinum*.

Для получения накопительной культуры УОМ в колбе Эрленмейера объемом 250 мл с 100 мл питательной среды (жидкая минеральная среда Е8 с содержанием нефти 80%) вносили 1г нефтешлама и инкубировали в течение 7 суток в качалочных условиях (220 об\мин) при комнатной температуре. Нефть вносили непосредственно в ростовую среду в качестве единственного источника углерода и энергии. По истечению срока культивирования производили посев в чашках Петри, после чего вырастали УОМ.

О развитии УОМ судят по появлению следующих признаков: помутнение среды, появление пленки, выделение газов, а также образование хлопьевидного осадка.

В результате проведенного анализа были выделены в чистую культуру и идентифицированы УОМ – бактерии – нефтедеструкторы: 2 штамма – *Pseudomonas*, 3 штамма – *Bacillus*, 9 штаммов

– *Enterobacter*, 1 штамм – *Enterococcus*, 1 штамм – *Klebsiella*, 1 штамм – *Staphylococcus*, 1 штамм – *Aholigenes*.

Всего выделено 24 штамма, относящиеся к 8 родам и 11 видам микроорганизмов.

Наличие патогенности у выделенных углеводородокисляющих микроорганизмов определяли по способности мацерировать растительную ткань. В качестве растительной ткани использовали нарезанную дисками морковь диаметром 3-5 см, толщиной 1 см. Опыт проводили в термостате при оптимальной температуре 30°С в течении 1-3 суток. Наличие или отсутствие мацерации определяли визуально и прикосновением к морковным дискам бактериологической петлей.

Из 18 выделенных и идентифицированных штаммов с образцов почв Сейдинского нефтеперерабатывающего завода патогенность проявили 2 штамма - №14 – *Actinomyces odontolyticus* и №61 – *Actinomyces bovis*.

С образцов почв Туркменбашинского нефтеперерабатывающего комплекса заводов из выделенных 24 штаммов штамм №11 – *Pseudomonas aeruginosa* и №28 – *Klebsiella pneumonia* также явились патогенными.

ВЫВОДЫ

Таким образом, выбор рационального способа выделения и идентификации нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки и восстановления почвы загрязненной нефтью или отходами нефтяного производства осуществляется путем использования аборигенной микрофлоры Туркменистана.

Выделение чистых культур нефтеокисляющих микроорганизмов из окружающей среды обеспечит возможность создания туркменского банка микроорганизмов – бактерий-нефтедеструкторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абзалов Р.З. Влияние минеральных удобрений на свойства нефтезагрязненных серых лесных почв лесостепной зоны Башкирии / Р.З. Абзалов // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. – М.: Химия, 1988. – 164 с.
2. Алексеев А.Ю. Не навреди // Промышленность и экология Севера. 2011. № 5-6 (13-14). С. 40-47.
3. Алексеева Т.П. Перспективы использования торфа для очистки нефтезагрязненных почв/ Т.П. Алексеева, Т.И. Бурмистрова, Н.Н. Терещенко, Л.Д. Стахина, И.И. Панова. // Биотехнология. – 2000. №2. – С. 58-64.
4. Алехин В.Г. Биологическая активность и микробиологическая рекультивация почв, загрязненных нефтепродуктами / В.Г. Алехин, В.Т. Емцев, Е.А. Рогозина, А.И. Фахрутдинов // Биологические ресурсы и природопользование. Сборник научных трудов. - Нижневартовск: Изд-во Нижневарт. пед. ин-та, 1998. – Вып. 2. – С. 95 - 105.
5. Бузолева Л.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды: автореф. дис. … д-ра. биол. наук / Л.С. Бузолева. – Владивосток, 2001. – 48 с.
6. Гриценко А.И. Экология. Нефть и газ / А.И. Гриценко, Г.С. Акопова, В.М. Максимов – М.: Наука, 1997. - 598 с.
7. Духанин Ю.А. Агрохимия, биология и экология песчаных и супесчаных дерново-подзолистых почв / Ю.А. Духанин. – М.: ФГНУ Росинформагротех, 2003. - 240 с.
8. Исмаилов Н.М., Пиковский Ю.И. Биодинамика загрязненной нефтью почвы //Миграция загрязняющих веществ в почве и сопредельных средах. – Л., 1985. – С. 195-198.

9. Киреева Н.А., Галимзянова Н.Ф. Влияние загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами на численность и видовой состав микромицетов //Почвоведение. – 1995, №2. – С. 211-216.

10. Мурзаков Б.Г., Биттеева М.Б., Морщакова Г.Н. Биотехнология очистки нефтезагрязненных территорий //Защита окружающей среды, утилизация отходов, очистка сточных вод и выбросов, промышленная санитария и гигиена в медицинской промышленности: Обзор информации. – М.: НИТИСЭНТИ, 1992. – Вып. 3. – С 36.

11. Минебаев В.Г. К вопросу охраны почвенного покрова в нефтедобывающих районах / В. Г. Минебаев. – Казань, 1986. – 164 с.

12. Рыбак В.К., Овчарова Е.П., Ковань Э.З. Микрофлора почвы, загрязненной нефтью // Микробиол. журнал, 1984. – Т . 46. №4. – С. 29-32.

13. Славина Т.П., Середина В.П. и др. Биологическое состояние почв при загрязнении нефтью// Проблема экологии Томской обл. – Томск, 1992. – Т.2. – С . 66-67.

14. Фролова М. К. Полиэтиленовые композиционные материалы для профильтрационных устройств гидротехнических сооружений / М. К. Фролова // Материалы конференций и совещаний по гидротехнике. – Л.Энергатомиздат, 1986. – С. 19-20.

15. Халимов Э.М., Левин СВ., Гузев В.С. Экологические и микробиологические аспекты повреждающего действия нефти на свойства почвы // Вестник Московского Университета, серия 17 «Почвоведение», 1996. №2. – С. 59-64.

16. Шпербер Д.Р. Разработка ресурсосберегающих технологий переработки нефтешламов: дис.канд. техн. наук: 03.02.08. Краснодар, 2014, 154 с.

17. Шангареев Р.Р. Ликвидация донных отложений нефтешламовых амбаров с применением новой плазмохимической технологии: Дис. канд. техн. наук / Уфимский гос. нефт. техн. ун-т. – Уфа, 2000. 110 с.

18. Benka-Coker M.O., Ekundayo J. A. Application of evaluating the ability of microbes isolated from anoil spill to degrade oil // Environ. Monit. And assess 1997.-45.3-H/259-272.