

Изобретение относится к способам ликвидации нефтяных загрязнений биологическими методами в местах разливов нефти и нефтепродуктов при их добыче, транспортировке, хранении и использовании, в том числе для ликвидации так называемых "амбаров" - крупных скоплений нефти и нефтепродуктов в углублениях земной поверхности, превратившихся с течением времени в плотную битумоподобную массу.

Известны способы очистки водоемов и почв, основанные на использовании деятельности углеводородокисляющих микроорганизмов естественных биоценозов в местах нефтяных загрязнений, путем внесения в нефтесубстрат (загрязненная нефтью и/или нефтепродуктами почвенная и/или водная среда, содержащая углеводородокисляющие микроорганизмы и служащая основой для их развития) дополнительных источников питания, в том числе модифицированных для придания им требуемых свойств, таких, например, как плавучесть, диспергирующая способность, пролонгированное выделение азота и т.д. [Патенты США №№ 3959127, 4087356, 4230562; Великобритании №№ 1542154, 2115339].

Однако использование таких способов не позволяет достичь удовлетворительной степени и сроков очистки из-за недостаточно высокой углеводородокисляющей способности микроорганизмов естественных биоценозов.

Наиболее близким к заявляемому является способ очистки водоемов и почв от нефтяных загрязнений, предусматривающий нанесение препарата углеводородокисляющих микроорганизмов (как монокультур, так и консорциумов) на нефтесубстрат загрязненного участка [НИИСЭНТИ НПО "Медбиоэконика". Обзорная информация. Защита окружающей среды, утилизация отходов очистки сточных вод и выбросов, промышленная санитария и гигиена в медицинской промышленности. 1992, вып. 3. Биотехнология очистки нефтезагрязненных территорий, с.29].

Несмотря на более высокую эффективность такого способа в сравнении с предыдущими, при его использовании также возникают определенные трудности. Так, полученные как правило в результате селекции или методами генной инженерии штаммы углеводородокисляющих микроорганизмов, входящие в состав препаратов, при внесении на нефтезагрязненные участки не всегда выдерживают конкуренцию с местной микрофлорой, в результате чего последняя быстро подавляет искусственно созданные штаммы и интенсивность биодеструкции оказывается ниже ожидаемой. Проблему не решило ни использование в препаратах чистых культур, выделенных из естественных биоценозов, ни введение в состав питательной среды для получения препаратов специфических для загрязнений углеводородов, поскольку различные нефтезагрязнения могут существенно отличаться фракционным составом углеводородов, что предполагает необходимость использования специфичных для данного состава микроорганизмов-биодеструкторов.

В основу изобретения поставлена задача создать такой способ очистки водоемов и почв от нефтяных загрязнений, который, благодаря специальной подготовке входящих в состав препарата микроорганизмов перед его нанесением на нефтесубстрат, обеспечил бы повышение активности углеводородокисляющих микроорганизмов препарата и нефтесубстрата и их конкурентоспособности по отношению к тем микроорганизмам нефтесубстрата, которые не являются углеводородокисляющими, и тем самым позволил бы полнее ликвидировать нефтяные загрязнения.

Поставленная задача решается тем, что в способе очистки водоемов и почв от нефтяных загрязнений, предусматривающем нанесение препарата углеводородокисляющих микроорганизмов на нефтесубстрат загрязненного участка, согласно изобретению микроорганизмы препарата перед упомянутым нанесением культивируют в среде, содержащей нефтесубстрат загрязненного участка, взятый в количестве, обеспечивающем симбиотический рост углеводородокисляющих микроорганизмов препарата и нефтесубстрата загрязненного участка.

Указанное культивирование микроорганизмов в среде, содержащей нефтесубстрат загрязненного участка, позволяет адаптировать их к существованию в условиях данного нефтезагрязнения, а именно к его химическому составу и видовому составу его природной микрофлоры. Гарантией этого является такое соотношение препарата и нефтесубстрата в культивационной среде, при котором имеет место симбиотический рост углеводородокисляющих микроорганизмов препарата и нефтесубстрата, поскольку такой рост свидетельствует о повышении активности как микроорганизмов препарата, так и углеводородокисляющих микроорганизмов нефтесубстрата, а также об увеличении их конкурентоспособности по отношению к другим микроорганизмам, населяющим данный нефтесубстрат. В результате такой подготовки углеводородокисляющие микроорганизмы активнее и дольше осуществляют биодеструкцию углеводородов нефтесубстрата загрязненного участка, преобразуя их в экологически безвредную биомассу.

Понятие "симбиотический рост" как известно предполагает наличие более высокого титра биомассы двух или нескольких культур микроорганизмов при их совместном культивировании в сравнении с суммой титров биомасс этих же микроорганизмов при их раздельном культивировании. На практике симбиотический рост считается имеющим место, если отмечается не менее чем двукратное превышение "титра суммы" в сравнении с "суммой титров". Следует также отметить, что подбор обеспечивающего симбиотический рост количества нефтесубстрата загрязненного участка для добавления в культивационную среду на практике не вызывает затруднений, поскольку может быть осуществлен с помощью общеизвестных экспресс-методов определения титра биомассы микроорганизмов еще на начальных стадиях их роста. Последнее обстоятельство позволяет без существенных материальных затрат и потерь времени, осуществляя скрининг и мониторинг процесса культивирования микроорганизмов в присутствии нефтесубстрата, постоянно корректировать данный процесс для максимизации симбиотического роста.

Поставленная задача решается и тем, что культивирование прекращают до наступления лаг-фазы роста углеводородокисляющих микроорганизмов препарата и нефтесубстрата загрязненного участка. Несмотря на то, что культивирование может быть прекращено на любой стадии роста, целесообразнее осуществлять это до наступления вышеупомянутой фазы, поскольку только на предшествующей ей лаг-фазе происходит непрерывное повышение титра биомассы и активности микроорганизмов.

Поставленная задача решается также тем, что культивирование осуществляют глубинным методом в течение 2-24 часов при доле нефтесубстрата в массе культивационной среды 1-50%. Такой способ

культивирования предназначен для подготовки микроорганизмов вне загрязненного участка и осуществляются как правило в емкостях с использованием мешалок и/или барботирования. Указанные параметры получены опытным путем и практически являются предельными для данного способа культивирования.

Поставленная задача решается кроме того и тем, что культивирование осуществляют путем нанесения препарата на нефте-субстрат части загрязненного участка с экспонированием в течение 1-4 суток. Данный способ культивирования является по существу вариантом использования естественных условий загрязненного участка для подготовки на определенной его части (как правило небольшой) микроорганизмов препарата к использованию с последующим нанесением препарата на нефтесубстрат всего участка. Указанное время экспонирования (выдержки препарата на поверхности нефтесубстрата) является с одной стороны минимально необходимым, а с другой - вполне достаточным для осуществления упомянутого варианта подготовки препарата.

В дальнейшем изобретение поясняется конкретными примерами его осуществления, которые однако не ограничивают возможности его использования.

Пример 1. Культивирование микроорганизмов препарата глубинным методом в среде, содержащей нефтесубстрат загрязненного участка. В лабораторных условиях был поставлен опыт по определению количества нефтесубстрата, необходимого для обеспечения симбиотического роста углеводородокисляющих микроорганизмов препарата и нефтесубстрата. Использовали препараты двух видов: монокультура ("Путидойл") и консорциум ("Динал"). В качестве нефтесубстрата был взят мазутоподобный нефтепродукт возрастом более 10 лет (Краснокамск, КС Н ХМ). В колбы с водной суспензией препарата добавляли различное количество нефтесубстрата и устанавливали их на мешалки. По меньшей мере в одну из колб не добавляли нефтесубстрат, а в другую - препарат. После включения мешалок каждые 4 часа на протяжении суток осуществляли отбор проб из колб для определения общего титра биомассы. Результаты испытаний (для препарата "Динал") занесены в таблицу.

Как следует из таблицы, значительное увеличение общего титра биомассы наблюдалось при доле нефтесубстрата 2-5 мас.%, В дальнейшем происходило постепенное угнетение роста микроорганизмов. Выборочно, путем микроскопирования определяли также относительное содержание в культивационной среде дикой углеводородокисляющей микрофлоры нефтесубстрата. Было отмечено существенное усиление ее роста при культивировании в среде, содержащей 2-5 мас. % нефтесубстрата.

При использовании для культивирования легких или жидких нефтесубстратов (разливы нефтепродуктов на песчаных почвах, в водоемах и т.п.) наличие симбиотического роста наблюдалось даже в том случае, когда доля нефтесубстрата в культивационной среде составляла до 50% ее массы. Подобные результаты были получены и в аналогичных опытах с использованием препарата "Путидойл". Значения доли нефтесубстрата при культивировании микроорганизмов, а также длительности такого культивирования целесообразно определять в каждом конкретном случае отдельно, учитывая вид нефтезагрязнения, состав используемого препарата и т.д. Как показали многочисленные испытания, подобное определение может быть без особых ограничений осуществлено в реальных условиях при подготовке к ликвидации нефтезагрязнения. Необходимым и достаточным условием при этом является наличие симбиотического роста углеводородокисляющих микроорганизмов препарата и нефтесубстрата загрязненного участка.

Пример 2. Моделирование процесса биодеструкции сырой (товарной) нефти в оптимальных условиях (аэрирование, температура 30°C). Процесс биодеструкции сырой нефти осуществляли в двух вариантах:

а) с использованием 100 мл водной суспензий препарата "Динал", содержащей 3 % диаммофоса (титр - $1,28 \times 10^4$ кл/г);

б) с использованием той же суспензии, которую предварительно культивировали в течение 12 часов в присутствии 7 г нефтесубстрата - сырой нефти (титр - $1,38 \times 10^4$ кл/г; подбор условий культивирования согласно примеру 1).

При использовании 1-го варианта через 7 суток смесь нефти и препарата гомогенизировалась, приобрела рыжий оттенок, после отстаивания в стационарных условиях наблюдалось расслоение. Придонный слой - коричневого цвета, состоит из отмерших клеток микроорганизмов препарата и продуктов разложения нефти. Деструкция составила 76-77%. При использовании 2-го варианта аналогичная картина наблюдалась уже через 18 часов. Через 48 часов деструкция составила 98,1%.

Пример 3. Моделирование процесса биодеструкции нефтепродуктов, позволяющее прогнозировать ход биодеструкции в натуральных условиях, осуществляли аналогично предыдущему примеру. Отличия состояли в использовании в качестве нефтепродукта, а соответственно и нефтесубстрата, мазута (150 г) и в добавке к суспензии препарата 5% диаммофоса. Титр биомассы в результате культивирования микроорганизмов препарата в присутствии нефтесубстрата увеличился с $1,28 \times 10^{11}$ кл/г до $1,45 \times 10^{16}$ кл/г. В первом случае препарат переводит мазут в легколетучую жидкость, хорошо смачивающую стенки стеклянной посуды и похожую по консистенции на товарную нефть в течение 8 суток. Во втором случае препарат позволяет осуществить подобный процесс за сутки, а через трое суток обеспечивает полную утилизацию мазута, подтверждающуюся отсутствием углеводородов нефти в осадке и надосадочной жидкости. В стационарных условиях при температуре 14-16°C процесс биодegradации при использовании неподготовленного препарата осуществлялся в течение 3 месяцев, а при использовании предварительно подготовленного (культивирование в присутствии нефтесубстрата) - в течение 27 суток.

Пример 4. В натуральных условиях для очистки двух участков шламового амбара площадью 5 м² каждый с нефтезагрязнением толщиной 0,35 м при общем количестве нефтешлама, включая механические примеси, 3500 кг использовали по 28 л водной суспензии препарата "Динал":

- для участка № 1 - культивированной в аэрируемых условиях в течение 10 часов без

добавления нефтесубстрата (титр биомассы $1,32 \times 10^{10}$ кл/г);

- для участка № 2 - культивированной при тех же условиях с добавлением 3% нефтесубстрата из шламового амбара (титр - $1,93 \times 10^{16}$ кл/г).

Обработку обоих участков осуществляли распыленным способом. Отбор проб нефтешлама производили до обработки препаратом и в процессе его биодegradации. Исходный нефтешлам представлял собой визуально битумоподобную массу плотностью 1,3-1,4 г/см³. На участке № 1 деструкция произошла на 42-44% в течение 27 суток. Разжижение нефтешлама было незначительным. На участке № 2 через сутки после обработки наблюдалось разжижение верхнего слоя нефтешлама толщиной 7 см. Через трое суток - разжижение по всему объему; плотность снизилась до 0,879 г/см³, что близко к плотности сырой нефти. Через 27 суток деструкция нефтешлама составила 74-78%.

Пример 5. В результате аварийного выброса нефти произошло загрязнение двух прудов площадью 0,2 га и 0,5 га. Толщина пленки нефти на поверхности составила 12-20 мм. Суспензию препарата "Динал" готовили в аэрируемых условиях так, что в одном литре содержалось 0,5 г биомассы с титром $2,1 \times 10^9$ кл/г. Этой суспензией обработали пруд № 1 площадью 0,2 га. Для обработки пруда № 2 площадью 0,5 га суспензию препарата культивировали в течение 24 часов с добавлением 15-20% нефтесубстрата (пленка нефти вместе с приповерхностным слоем воды из пруда). В итоге титр увеличился до $1,8 \times 10^{15}$ кл/г. Обработку осуществляли распылительным способом.

На пруде № 1 процесс биодеструкции длился 65 суток. Необходимо отметить, что применяли повторную обработку объекта рабочим раствором препарата. Деструкция углеводородов нефти составила 62-64%. Естественный вид пруд приобрел в течение весенне-летнего периода.

На пруде № 2 уже через сутки наблюдалось преобразование нефтяной пленки в бурую пенообразную массу. В течение 15 суток поверхность и береговая линия (включая водную растительность) полностью очистилась от нефтепродуктов. Деструкция углеводородов нефти составила 83-85%. В донных отложениях остаточных углеводородов нефти не наблюдалось. В течение 20 суток водоем приобрел свой естественный вид, визуально и по результатам проб никаких отклонений от нормы не наблюдалось.

Пример 6. На нефтешламовом амбаре площадью около 10 м был проведен эксперимент по переносу препарата, предварительно экспонированного на нефтесубстрате части загрязненного участка на его оставшуюся часть. Для этого поверхность амбара была разделена на три участка площадью 2 м², 6 м и 2 м каждый. На один из участков площадью 2 м² было нанесено 12 л суспензии препарата, полученной общепринятым методом. Через двое суток верхний, уже частично разжиженный слой нефтесубстрата этого участка, был перенесен на участок площадью 6 м². Одновременно с этим на оставшийся участок площадью 2 м² было нанесено 12 л суспензии аналогичного препарата. Через 27 суток деструкция углеводородов нефти на этом участке составила 45-47%. В то же время деструкция на участке площадью 6 м² была равной 78-80%.

Описанный вариант способа особенно пригоден для ликвидации масштабных почвенных нефтезагрязнений с одинаковым или близким фракционным составом углеводородов по всей площади загрязнения. Время экспонирования составляет при этом как правило от 1 до 4 суток, поскольку после этого в большинстве случаев начинается снижение активности углеводородоокисляющих микроорганизмов и при переносе препарата с этой части углеводородоокисляющих микроорганизмов и при переносе препарата с той части участка, где осуществляется экспонирование (в течение которого происходит культивирование углеводородоокисляющих микроорганизмов препарата на нефтесубстрате), на весь участок требуемого эффекта не достигается.

Пример 1. Для очистки почвенного загрязнения площадью 2 м² аналогичного аварийному выбросу нефти со сверхвысокой степенью загрязнения (5 кг нефти на 1 м²) его разделили на 2 участка площадью по 1 м² каждый. Участки обработали распылительным нанесением раствора препарата с добавлением семян тест-культур:

- участок № 1 - раствором с титром $1,32 \times 10^{11}$ кл/г;

- участок № 2 - раствором с титром $1,57 \times 10^{16}$ кл/г, увеличенным в результате культивирования микроорганизмов препарата в присутствии нефтесубстрата данного загрязнения.

Отбор проб почвы для анализа осуществлялся с интервалом в 7 суток на протяжении 30 суток. По истечении этого времени на участке № 1 наблюдалась слабая растительность, деструкция нефти составила 65-70%. На участке № 2 в течение первых 7 суток деструкция осуществилась на 63-67%. На 14-е сутки появились всходы тест-культуры, на 30 суток наблюдался рост тест-культуры с характерными признаками роста на экологически здоровой почве, богатой органическими удобрениями. Деструкция углеводородов нефти составила 87-89%.

Таким образом, предлагаемый способ обеспечивает более полную очистку водоемов и почв от нефтяных загрязнений и способствует при этом нормализации микро- и макрофлоры загрязненного участка, то есть является экологически корректным. Экономический эффект от использования способа значительно превышает затраты на культивирование микроорганизмов препарата перед его нанесением на нефтесубстрат.

Общий титр биомассы (кл/г)

Доля неф- тесубстра- та, мас. %	Время культивирования, час						
	0	4	8	12	16	20	24
0	$1,5 \times 10^9$	2×10^{10}	$3,5 \times 10^{11}$	8×10^{11}	$9,5 \times 10^{11}$	$7,5 \times 10^{10}$	4×10^{10}
2	$1,5 \times 10^9$	3×10^{12}	2×10^{14}	5×10^{15}	6×10^{15}	6×10^{15}	1×10^{15}
5	$1,5 \times 10^9$	$8,5 \times 10^{12}$	4×10^{14}	2×10^{16}	9×10^{15}	7×10^{15}	3×10^{14}
7	$1,5 \times 10^9$	2×10^{11}	4×10^{12}	8×10^{11}	$7,5 \times 10^{10}$	3×10^{10}	5×10^9
10	$1,5 \times 10^9$	3×10^{10}	2×10^9	7×10^9	5×10^8	7×10^7	8×10^5
20	$1,5 \times 10^9$	Угнетение роста					
30	$1,5 \times 10^9$	Угнетение роста					