

На правах рукописи

**ГАЛЬПЕРИНА АЛИНА РАВИЛЬЕВНА**

**РАЗРАБОТКА ПРИЕМОВ БИОРЕМЕДИАЦИИ  
ЗАМАЗУЧЕННЫХ СТОЧНЫХ ВОД**

03.02.08 Экология (биологические науки)

03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Уфа - 2012

Диссертационная работа выполнена на кафедре «Прикладная биология и микробиология» ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный технический университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор  
Сопрунова Ольга Борисовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
Логинов Олег Николаевич

доктор биологических наук, профессор  
Янкевич Марина Ивановна

Ведущая организация: ФГБОУ ВПО «Калмыцкий  
государственный университет»  
(г. Элиста)

Защита состоится «27» января 2012 г. в 14-00 часов на заседании диссертационного совета ДМ 002.136.01 при Институте биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г. Уфа, Проспект Октября, 69, тел/факс: 8(347) 253-62-47, e-mail: ib@anrb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии Уфимского научного центра РАН, с авторефератом – в сети Интернет по адресу <http://ib.anrb.ru/sovnet.html> и на сайте ВАК Минобрнауки РФ

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2012 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук, доцент



Р.В.  
Уразгильдин

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Одними из приоритетных загрязнителей природных и сточных вод являются нефтепродукты – неидентифицированная группа углеводородов нефти, мазута, бензина, керосина, масел и их различных примесей, которые по данным ЮНЕСКО относятся к числу наиболее опасных загрязнителей окружающей природной среды вследствие своей высокой токсичности и широкой распространенности (Оспанова, Халтурин, 2010)

Развитие экономики Астраханской области в последние десятилетия связано с интенсификацией деятельности предприятий нефтедобывающей и нефтеперерабатывающей промышленности, для которых характерно образование значительного количества нефтесодержащих отходов – сточных вод, нефтешламов. В настоящее время на территории Астраханской области имеется более 10 резервуаров-накопителей, содержащих около 350 тыс.т. высокотоксичных нефте- и мазутосодержащих сточных вод. В то же время, на территории области не достаточно предприятий, занимающихся очисткой и утилизацией высокотоксичных сточных вод и рекультивацией накопителей сточных вод.

В связи с этим, необходима разработка действенных мер по разрешению сложившейся ситуации в области экологически безопасного обезвреживания промышленных стоков и отходов предприятий хранения и распределения нефтепродуктов.

Продукты переработки нефти, такие как мазут, битум, асфальт, минеральные масла, получаемые из тяжелых нефтяных фракций, и являющиеся биологически «жесткими» нефтепродуктами (Поконова, 1992; Турковская, 2001), представляют собой особую проблему, как для природной среды, так и для биологического разрушения. Несмотря на то, что исследованиям данного вопроса в последнее время посвящено достаточно много работ (Поконова, 1992; Грищенко, 1997; Крапов, 1998; Сидоров, 1998; Турковская, 2001; Янкевич, 2002; Сопрунова, 2005; Ait-Longomazino, 1991; Roffey, 1991; Phol, 2002) остаются мало изученными вопросы, связанные с разработкой методов детоксикации и очистки сточных вод, содержащих остаточные фракции мазута.

**Целью диссертационной работы** являлась разработка приемов биоремедиации замазученных сточных вод, образующихся при обезвоживании товарного мазута.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить гидрохимические показатели замазученных сточных вод резервуара-накопителя.
2. Выявить гетеротрофные (органотрофные) и фототрофные микроорганизмы сточных вод.
3. Изучить роль циано-бактериальных сообществ (аборигенных, коллекционных) в процессах очистки сточных вод.

4. Смоделировать комплексную многоступенчатую очистку замазученных сточных вод.

**Научная новизна.** Впервые проведены комплексные (гидрохимические, гидробиологические и микробиологические) исследования резервуара-накопителя замазученных сточных вод, образующихся при обезвоживании мазута. Установлено, что в сточной воде резервуара-накопителя, представляющего собой экстремальную водную экосистему, характеризующуюся высоким содержанием органического вещества, нефтяных углеводородов и токсичностью, присутствуют представители различных физиологических групп микроорганизмов (протео-, углевод- и липолитические, автохтонные), осуществляющие процессы трансформации загрязняющих веществ сточных вод.

Из замазученных сточных вод резервуара-накопителя получена накопительная культура циано-бактериального сообщества, эдификаторами которой являются цианобактерии: нитчатые *Oscillatoria Woronichinii* и одноклеточные *Synechocystis salina*.

Для моделирования процессов очистки замазученных сточных вод использованы циано-бактериальные сообщества: коллекционное на основе *Oscillatoria amphibia* и аборигенное на основе *Oscillatoria Woronichinii* и *Synechocystis salina*.

**Практическая значимость.** Полученные результаты гидрохимических и микробиологических исследований замазученных сточных вод вошли в научно-технический отчет «Разработка концепции санации и рекультивации резервуара-накопителя замазученных сточных вод» (договор № 215-2007).

Полученные на основе проведенных комплексных исследований (гидрохимических, гидробиологических, микробиологических, токсикологических) замазученных сточных вод резервуара-накопителя результаты могут служить основой для последующих экологических исследований подобного рода сооружений.

Проведенные экспериментальные исследования по моделированию процессов очистки замазученных сточных вод с использованием альго-бактериальных биоценозов на основе цианобактерий *Oscillatoria Woronichinii*, *Synechocystis salina* и *Oscillatoria amphibia* и высших водных растений валлиснерия спиральная (*Vallisneria spiralis*), элодея канадская (*Elodea canadensis*), ряска малая (*Lemna minor*) являются основой для разработки технологии биоремедиации и рекультивации водоемов-накопителей нефтезагрязненных и замазученных сточных вод предприятий переработки и транспортировки Астраханской области. Выделенное циано-бактериальное сообщество на основе *Oscillatoria Woronichinii*, *Synechocystis salina* помещено в коллекцию кафедры «Прикладная биология и микробиология» Астраханского государственного технического университета и используется в научно-исследовательских и учебных целях.

**Личное участие автора.** Автор провела аналитический обзор литературы, принимала непосредственное участие в исследовании резервуара-

накопителя и постановке лабораторных экспериментов, обработке полученных экспериментальных данных, анализе и обобщении результатов исследований.

**Обоснованность выводов и достоверность результатов работы** обеспечены большим объемом лабораторных экспериментов с применением современных и общепринятых методов. Результаты обработаны статистически.

**Апробация работы.** Результаты исследований были представлены на Всероссийских и Международных конференциях: «Фундаментальные и прикладные аспекты исследования симбиотических систем» (Саратов, 2007), «Биотехнологические процессы в народном хозяйстве» (Астрахань, 2007), «Биология- наука XXI века», (Пушино, 2007, 2009), «Генетика микроорганизмов и биотехнология» (Москва, 2008), «Биогеохимия в народном хозяйстве: фундаментальные основы ноосферных технологий» (Астрахань, 2008), «Фундаментальные аспекты биологии в решении актуальных экологических проблем» (Астрахань, 2008), «Экология, природные ресурсы и развитие Московского региона» (Москва, 2009), «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, 2009), «Инновационные технологии в управлении, образовании, промышленности «АСТИНТЕХ- 2010» (Астрахань, 2010), «Новейшие технологии освоения месторождений углеводородного сырья и обеспечение безопасности экосистем Каспийского шельфа» (Астрахань, 2010); программе Федерального агентства по делам молодежи «Зворыкинский проект» (Астрахань, 2010), интернет-турнире «Модернизация» Общероссийской общественной организации «Деловая Россия» и Интернет-компании UpSelf (Астрахань, 2010), конкурсе инновационных проектов 3-го Каспийского инновационного форума (Астрахань, 2011) и отмечены дипломом 1-й степени выставки «Образование - инвестиции в успех 2011» (Астрахань, 2011).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 21 работа, в том числе 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 165 страницах. Состоит из введения, 4-х глав (обзор литературы, объекты и методы исследований, характеристика объекта исследований, экспериментальные исследования), заключения, выводов, списка литературы, включающего 180 источников, в том числе 36 зарубежных. Работа иллюстрирована 47 рисунками и 28 таблицами.

## **Глава 1. Особенности процессов самоочищения природных и очистки сточных вод от нефтяных углеводородов (обзор литературы)**

В обзоре литературы проанализированы пути попадания нефтяных углеводородов в водную среду и их влияние на водные экосистемы. Рассмотрено участие всех групп гидробионтов, вовлеченных в процессы самоочищения водных объектов от нефти и нефтепродуктов. Наиболее подробно изложены вопросы, касающиеся интенсификации процессов самоочищения и биологической очистки сточных вод от нефтяных и мазутных загрязнений. Особое внимание уделено применению циано-бактериальных сообществ и высших водных растений.

## **Глава 2. Объекты и методы исследований**

Объектами исследований являлись: 1) замазученные сточные воды резервуара-накопителя нефтебазы, расположенной в Приволжском районе г. Астрахани; 2) аборигенная микрофлора замазученных сточных вод; 3) циано-бактериальные сообщества (ЦБС), выделенные из исследуемых замазученных сточных вод и ЦБС из коллекции кафедры «Прикладная биология и микробиология» АГТУ; 4) модельные лабораторные экосистемы (микрокосмы), созданные на основе замазученных сточных вод.

Исследования гидрохимических, гидробиологических, микробиологических и токсикологических показателей сточных вод резервуара-накопителя и модельные эксперименты осуществлялись в 2007-2010 г.г.

Отбор проб замазученных сточных вод и гидрохимические исследования осуществляли в соответствии с требованиями общепринятых методик (Лурье, Рыбникова, 1974; Унифицированные методы анализа вод СССР, 1978; ГОСТ Р 51592-2000).

Циано-бактериальные сообщества из замазученных сточных вод выделяли методом накопительных культур (Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике, 1975) с использованием среды ВГ-11 (Нетрусов, 2005). Видовую идентификацию цианобактерий проводили с использованием определителя (Голлербах, 1953).

Выделение аборигенных микроорганизмов из замазученных сточных вод, микроорганизмов-спутников цианобактерий, эпифитной микрофлоры высших водных растений осуществляли методом Коха на твердые питательные среды (Теппер, 2004): сапротрофов - мясо-пептонный агар (МПА); сахарозолитиков - агар Чапека; автохтонной микрофлоры - агар на основе сточной воды; глюкозолитиков - глюкозо-аммонийную среду (Нетрусов, 2005). Выделение органотрофных бактерий осуществляли на *среде I* следующего состава (г/л) (Митыпова, 2007):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ –0,2;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ –0,1;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ –0,5;  $\text{KCl}$ –0,2; дрожжевой экстракт–0,05, раствор микроэлементов по Витману – 1мл/л, агар - 20. В качестве субстратов вносили (%): для протеолитиков – пептон (1,5); амилолитиков – крахмал

(1,5); целлюлолитиков – полоску фильтровальной бумаги (1,0); липолитиков – твин-40 (1,5); бродильщиков – глюкозу (1,5); сульфатредуцирующих бактерий (г/л) -  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ –3,0;  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ –0,05; лактат, ацетат в концентрации 3 г/л.

Моделирование процессов очистки проводили с использованием замазученных сточных вод в 2-х вариантах: 1) двухступенчатая (фильтрация и внесение ЦБС, иммобилизованных на инертном носителе); 2) комплексная (фильтрация; принудительное аэрирование; внесение ЦБС, иммобилизованных на инертном носителе; внесение высших водных растений).

Концентрацию суммарных нефтяных углеводородов (СНУ) определяли флуорометрическим методом с использованием анализатора жидкости «Флюорат – 2» (ПНД Ф 14.1:2:4.128-98).

Концентрацию полиароматических углеводородов (ПАУ) определяли с использованием газового хроматографа GC-17A SHIMADZU (Другов, Родин, 2000).

Определение токсичности замазученных сточных вод и воды модельных экосистем проводили по следующим методикам: 1) определение токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний (Жмур, 2001); 2) методика биотестирования по проращиванию семян (СанПиН 2.1.7.573-96). Установление класса опасности сточных вод осуществляли на основе острого краткосрочного опыта с использованием 2-х тест-объектов различных систематических групп (Приказ МПР РФ № 511 от 15 июня 2001): *Daphnia magna* Straus, *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb.

Статистическую обработку данных микробиологических, химических и токсикологических исследований проводили с помощью программы STATISTICA 6,0; программы Microsoft Excel Office XP.

### **Глава 3. Экологическая характеристика объекта исследований**

Исследуемые замазученные сточные воды образуются в процессе обезвоживания мазута и включают отходы эмульсий и смесей нефтепродуктов, в том числе воду, загрязненную нефтепродуктами, подсланевые и подтоварные воды. Накапливаются замазученные сточные воды в резервуаре-накопителе, который представляет собой искусственную емкость округлой формы (диаметром около 35 м), выложенную из кирпича в 50-х гг. 20 в. максимальной глубиной 4-6 м, расположенном на территории нефтебазы в Приволжском районе г. Астрахани.

При определении гидрохимических показателей установлено, что для замазученных сточных вод поверхностного горизонта (0,5 м) резервуара-накопителя отмечается превышение ПДК для воды поверхностных водоемов: хлорид-ионы ( $674 \text{ мг/дм}^3$ ) в 1,9 раза; сульфат-ионы ( $920 \text{ мг/дм}^3$ ) в 1,8 раза; нефтяные углеводороды ( $76,4\text{-}82,9 \text{ мг/дм}^3$ ) в 276 раз; бенз(а)пирен ( $0,0000326 \text{ мг/дм}^3$ ) в 32,6 раза. Отмечено превышение нормативов (СанПиН 2.1.5.980-00)

по окраске вод в 128 раз; ХПК (1440 мг О/дм<sup>3</sup>) - 96 раз; а также низкое (в 25 раз ниже нормы) содержание растворенного кислорода (0,16 мг/ дм<sup>3</sup>).

Определение токсичности замазученных сточных вод с использованием в качестве тест-объекта *Daphnia magna Straus* показало, что исследуемая сточная вода обладает ярко выраженным токсическим эффектом (0,51%-ная концентрация (разбавление в 196 раз) вызывает гибель 50% тест-объектов за 96 часов экспозиции (ЛКР<sub>50-96</sub>); 0,031%-ная концентрация (разбавление в 3225 раз) вызывает гибель не более 10% тест-объектов за 96 часов экспозиции (БКР<sub>10-96</sub>) и не может быть сброшена в открытые водоемы, т.к. представляет серьезную угрозу для гидробионтов.

Биотестирование по проращиванию семян редиса показало, что средняя длина корней растений в опыте составила 41% по отношению к контролю, что свидетельствует о явном ингибирующем действии на растения и отсутствии возможности сброса исследуемых стоков на сельскохозяйственные поля орошения.

При биотестировании с использованием в качестве тест-объекта *Daphnia magna Straus* установлено, что замазученные сточные воды относятся к сильнозагрязненным, класс опасности – второй (высокоопасные отходы), что предполагает отсутствие возможности их сброса, как в водоемы, так и на сельскохозяйственные поля орошения.

Микробиота замазученных сточных вод резервуара-накопителя представлена, как гетеротрофными, так и автотрофными (цианобактерии) организмами. Среди гетеротрофов в сточных вод выявлены (рис.1) представители различных физиологических групп. Отмечено, что распределение численности физиологических групп микроорганизмов в поверхностном (0,5 м) и срединном (3,0 м) горизонтах сходно: максимальную численность (до 10<sup>5</sup> КОЕ/мл) составляют протео-, амило-, сахарозо-, глюкозолитические и сульфатредуцирующие микроорганизмы.

При прямом микроскопировании проб замазученных сточных вод обнаружены единичные клетки одноклеточных (*Synechocystis salina*) и нитчатых (*Oscillatoria Woronichinii*, *Phormidium dimorphum*) цианобактерий.

Выделение цианобактерий из сточных вод методом накопительной культуры на среде ВГ-11 при постоянном освещении 300-500 лк при температуре 20-25°С проводили до появления характерных признаков роста цианобактерий (наличие рыхлых обрастаний темно-зеленого цвета), эдификаторы накопительной культуры представлены нитчатыми (*Oscillatoria Woronichinii*) и одноклеточными (*Synechocystis salina*) цианобактериями; отмечено присутствие *Phormidium dimorphum*. Среди микроорганизмов-спутников в гликокаликсе цианобактерий присутствуют микроорганизмы различных физиологических групп (рис. 2).



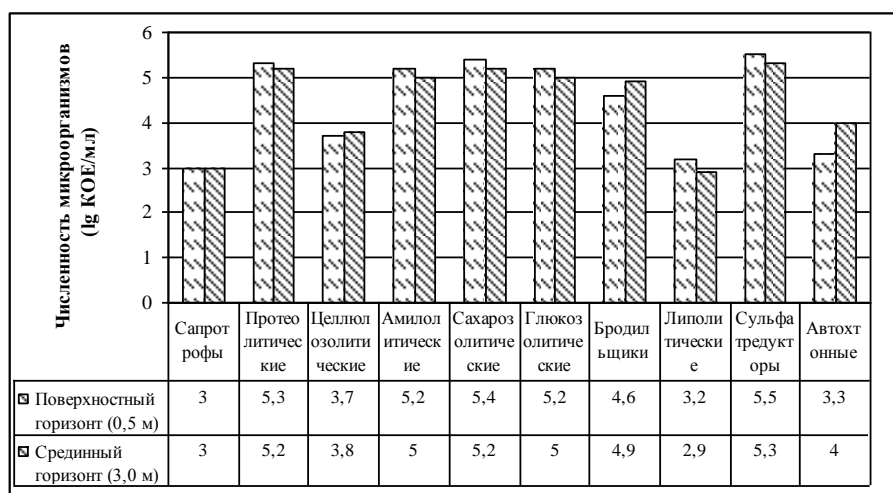


Рис. 1. Физиологические группы микроорганизмов в сточной воде резервуара-накопителя.

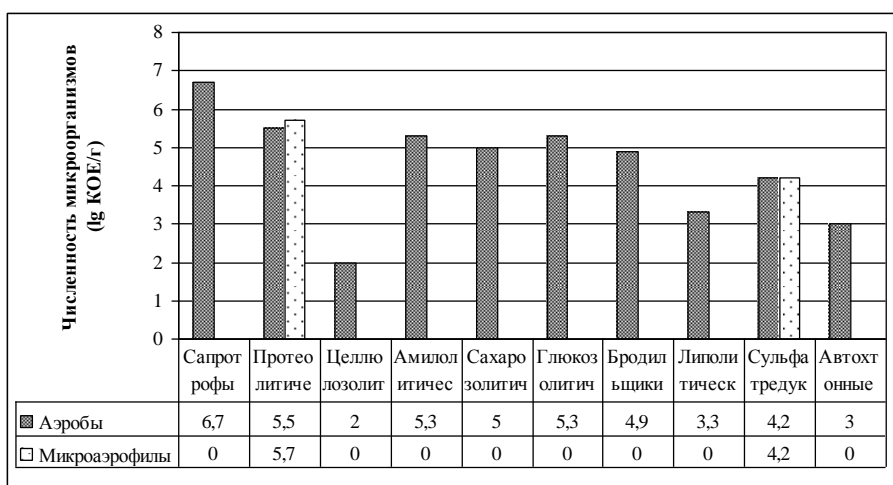


Рис 2. Физиологические группы микроорганизмов-ассоциантов накопительной культуры ЦБС.

Преобладающими по численности (до  $10^5$ - $10^6$  КОЕ/г) являются сапротрофы, протео-, амило-, глюкозо- и сахарозолитические; минимальной численностью (до  $10^2$ - $10^3$  КОЕ/г) - липолитические, автохтонные и целлюлозолитические микроорганизмы.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют рассматривать резервуар-накопитель замазученных сточных вод как экстремальную водную экосистему, характеризующуюся высоким содержанием органического вещества, нефтяных углеводов и токсичностью. Наличие в замазученных сточных водах как автотрофных, так и гетеротрофных микроорганизмов, усваивающих легко гидролизующиеся полимеры, олигомеры (пептон, крахмал, сахароза) и мономеры (глюкоза), гидролизующих более сложные соединения (белки, жиры, целлюлозу и автохтонное органическое вещество), говорит о высокой самоочищающей способности альго- и микрофлоры и возможности применения биологических способов интенсификации очистки исследуемых сточных вод.

#### **Глава 4. Моделирование процессов очистки замазученных сточных вод**

Подбор субстрата для иммобилизации ЦБС (аборигенного на основе *Synechocystis salina*, *Oscillatoria Woronichinii* и коллекционного на основе *Oscillatoria amphibia*), проведенный среди инертных носителей (пеноизол, пенопласт, поролон и стекловолокно) показал, что наиболее подходящим для закрепления, роста и развития цианобактерий является поролон. Установлено, что максимально интенсивно в микроэкосистемах на основе замазученной сточной воды иммобилизованные на поролоне ЦБС (аборигенное на основе *Synechocystis salina*, *Oscillatoria Woronichinii* и коллекционное на основе *Oscillatoria amphibia*) способствуют максимальному обесцвечиванию сточных вод (увеличение светопропускаемости до 65%, при светопропускаемости исходных замазученных сточных вод – 0,23 %), которые и были отобраны для дальнейших исследований.

#### **Экспериментальные исследования по изучению роли циано-бактериальных сообществ в процессах очистки замазученных сточных вод**

Изучение роли циано-бактериальных сообществ в активизации процессов очистки замазученных сточных вод проводили в модельных экспериментах, для чего в стеклянные аквариумы (30 л) вносили по 10 л предварительно отфильтрованных через песчаный фильтр исследуемых сточных вод и циано-бактериальные сообщества, иммобилизованные на поролоне: микроэкосистема 3 - накопительная культура аборигенного ЦБС на основе *Oscillatoria Woronichinii* и *Synechocystis salina*, выделенного из накопителя сточных вод; микроэкосистема 2 - коллекционное ЦБС на основе *Oscillatoria amphibia*. Контроль – микроэкосистема 1 с отфильтрованной через песчаный фильтр сточной водой. Продолжительность эксперимента - 35 суток, контрольные точки – 10-е, 20-е и 35-е сутки

Для замазученных сточных вод, используемых в эксперименте отмечены высокие показатели бихроматной ( $1440 \text{ мг O/дм}^3$ ) и перманганатной ( $276 \text{ мг O/дм}^3$ ) окисляемости; содержания растворенного органического вещества ( $852 \text{ мг/дм}^3$ ) и суммарных нефтяных углеводородов ( $82,9 \text{ мг/дм}^3$ ). Превышение предельно допустимой концентрации по суммарным нефтяным углеводородам составляет 276 ПДК, по бенз(а)пирену – 32 ПДК.

В ходе экспериментальных исследований отмечена убыль суммарных нефтяных углеводородов на всех этапах очистки и во всех вариантах модельных экосистем. В целом, по окончании эксперимента убыль составила (%): в контроле (микроэкосистема 1) - 92,7; при внесении аборигенного сообщества на основе *Oscillatoria Woronichinii* и *Synechocystis salina* (микроэкосистема 3) – 94,2; коллекционного сообщества на основе *Oscillatoria amphibia* (микроэкосистема 2) – 95,7.

Установлено, что соотношение пирогенных полиаренов (пирен и банз(а)пирен) к полиаренам биогеохимического фона (фенантрен и хризен)

(Немировская, 2000) в воде микроэкосистем с внесением коллекционного ЦБС по окончании экспозиции составляет 0,46, что значительно ниже 1, и свидетельствует о способности сообщества на основе *Oscillatoria amphibia* максимально снижать антропогенное влияние ПАУ.

Сопоставление содержания «мягких» и «жестких» органических загрязнений по определению химического потребления кислорода перманганатным и бихроматным методами (Лурье, Рыбникова, 1974) показало, что, по окончании эксперимента максимальное снижение данного соотношения (1:2,4) характерно для микроэкосистем с внесением коллекционного ЦБС на основе *Oscillatoria amphibia* при более интенсивном снижении бихроматной окисляемости (85 %). Максимальное снижение содержания растворенного органического вещества (РОВ) отмечено также во 2-й микроэкосистеме – 74%; тогда как в 3-й микроэкосистеме – 66% и в воде контрольной микроэкосистемы – 57%.

Кроме этого, отмечено интенсивное обесцвечивание сточных вод при внесении циано-бактериальных сообществ: в микроэкосистеме 3 (*Oscillatoria Woronichinii* и *Synechocystis salina*) – на 86 %, в микроэкосистеме 2 (*Oscillatoria amphibia*) – 85% -, тогда как в контроле – 36%.

При изучении микробного состава воды по окончании эксперимента во всех микроэкосистемах установлено снижение численности органотрофов (протео-, целлюлозо- и амилитических), связанное, вероятно, с уменьшением содержания органического вещества: снижение ХПК на 24-85%, СЧУ – 92,7-95,7% и РОВ – 74-57%. Для автохтонных микроорганизмов, имеющих большее сродство к субстрату сточных вод, по окончании эксперимента характерно увеличение их численности на 2 порядка в микроэкосистемах с внесением циано-бактериальных сообществ (рис. 3).

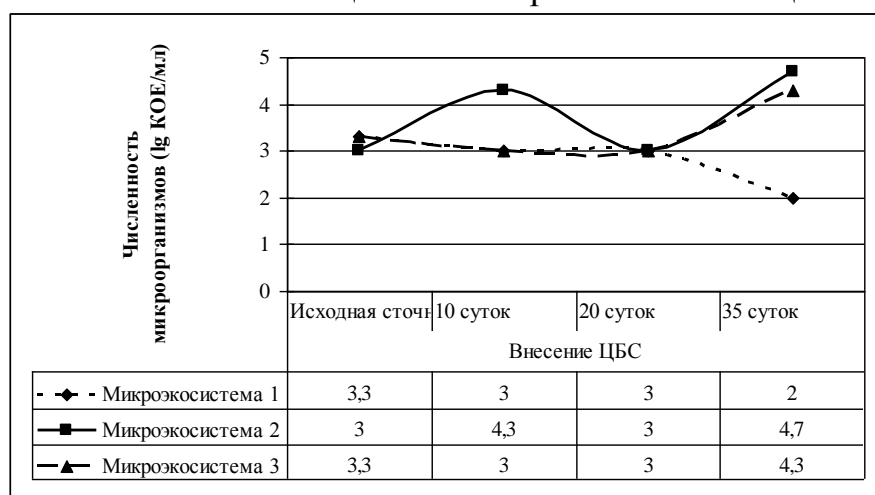


Рис. 3. Динамика численности автохтонных микроорганизмов в воде экспериментальных модельных экосистем.

Биотестирование воды модельных экосистем по окончании экспозиции по проращению семян редиса (СанПиН 2.1.7.573-96) показало, что вода в контроле (микроэкосистема 1) оказывает ингибирующее действие на семена редиса, а вода микроэкосистем с внесенными ЦБС не угнетает роста тест-объектов.

Таким образом, наиболее эффективным в процессах очистки (снижение содержания суммарных нефтяных углеводородов до 95,7%) является коллекционное циано-бактериальное сообщество, эдификатором которого является *Oscillatoria amphibia*. В то же время, следует отметить, что наибольшую эффективность в обесцвечивании сточных вод (83%) проявило аборигенное сообщество, выделенное из сточных вод резервуара-накопителя.

### **Моделирование комплексной очистки замазученных сточных вод**

Для определения возможных приемов комплексной очистки замазученных сточных вод поставлен модельный эксперимент, включающий следующие этапы: 1) фильтрацию через песчаный фильтр; 2) принудительное аэрирование; 3) внесение циано-бактериальных сообществ, иммобилизованных на инертном носителе; 4) внесение высшей водной растительности. Для постановки модельных экосистем использовали стеклянные аквариумы, куда вносили по 15 л пропущенной через песчаный фильтр сточной воды. Принудительное аэрирование осуществляли с использованием компрессора (Air – 2001, Китай) в течение 10 сут. Затем в аквариумы вносили циано-бактериальные сообщества (20 г), иммобилизованные на инертном носителе (поролон): накопительную культуру аборигенного ЦБС на основе *Oscillatoria Woronichinii* и *Synechocystis salina*, выделенного из сточных вод накопителя (микроэкосистема 3) и коллекционное ЦБС на основе *Oscillatoria amphibia* (микроэкосистема 2). Экспонирование микроэкосистем с циано-бактериальными сообществами продолжалось в течение 40 сут. Затем циано-бактериальные сообщества были удалены и в микроэкосистемы вносили высшие водные растения (ВВР): валлиснерия спиральная (*Vallisneria spiralis*); элодея канадская (*Elodea canadensis*); ряска малая (*Lemna minor*). Экспонирование микроэкосистем с ВВР продолжалось в течение 30 сут.

Общая продолжительность эксперимента составила 80 суток. Контролем служила модельная экосистема с отфильтрованной через песчаный фильтр сточной водой (микроэкосистема 1).

Замазученные сточные воды резервуара-накопителя, используемые в эксперименте, характеризуются высокими показателями бихроматной (2520 мг O/дм<sup>3</sup>) и перманганатной (362 мг O/дм<sup>3</sup>) окисляемости; содержания растворенного органического вещества (728 мг/дм<sup>3</sup>); суммарных нефтяных углеводородов (76,4 мг/дм<sup>3</sup>). Превышение предельно допустимой концентрации по суммарным нефтяным углеводородам составляет 255 ПДК, по бенз(а)пирену – 32 ПДК.

В ходе экспериментальных исследований отмечена убыль суммарных нефтяных углеводородов на всех этапах очистки и во всех вариантах модельных экосистем: в контроле (микроэкосистема 1) – 82,0%; в микроэкосистеме 2 – 91,3%; в микроэкосистеме 3 – 91,9%.

Убыль общего содержания ПАУ в микроэкосистеме 2 составила 94,0%; микроэкосистеме 3 – 89,9%; микроэкосистеме 1 (контроль) – 0,2%. Это

свидетельствует о том, что последовательное внесение ЦБС на основе нитчатых цианобактерий *Oscillatoria amphibia* и ВВР (валлиснерия спиральная, элодея канадская, ряска малая) (микроэкосистема 2) способствует максимальной интенсификации процессов очистки сточных вод от полиароматических углеводородов.

При этом, установлено, что в микроэкосистемах с ЦБС и ВВР процесс разложения органических веществ происходит в целом интенсивнее, максимальное снижение перманганатной и бихроматной окисляемости отмечено в микроэкосистеме 2 – 77 и 74 % (соответственно); в микроэкосистеме 3 – 66 и 77 % (соответственно); контрольной микроэкосистеме 1 - 61% и 75 % (соответственно). Снижение содержания РОВ составило: микроэкосистема 2 – 66%, микроэкосистема 3 – 55% и контроль – 38%.

Максимальное снижение оптической плотности сточных вод в экспериментальных исследованиях отмечено при внесении циано-бактериальных сообществ - в микроэкосистеме 2 на 71%; в микроэкосистеме 3 – 68%; контрольной микроэкосистеме 1 - 8% (рис. 4).

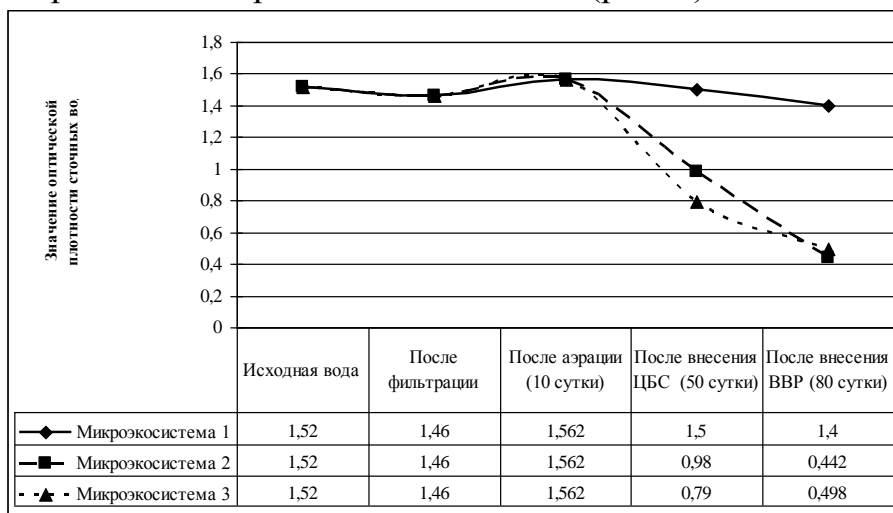
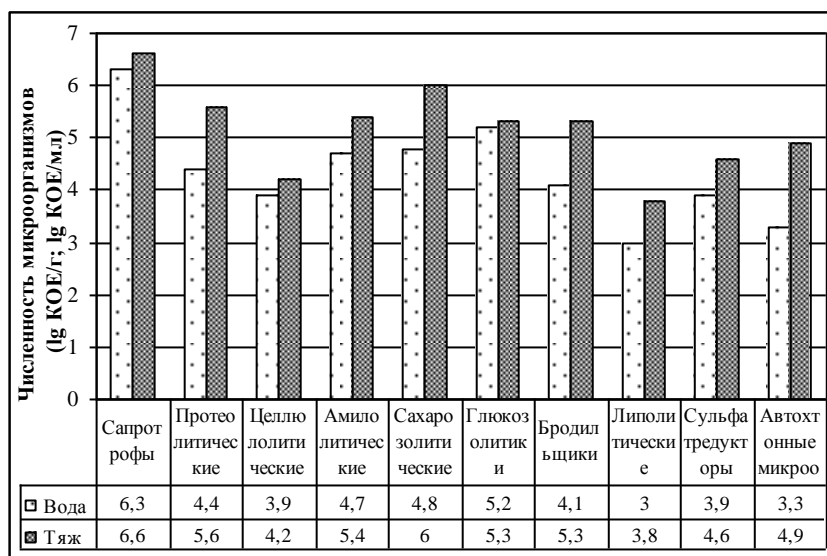


Рис. 4. Динамика оптической плотности воды экспериментальных экосистем.

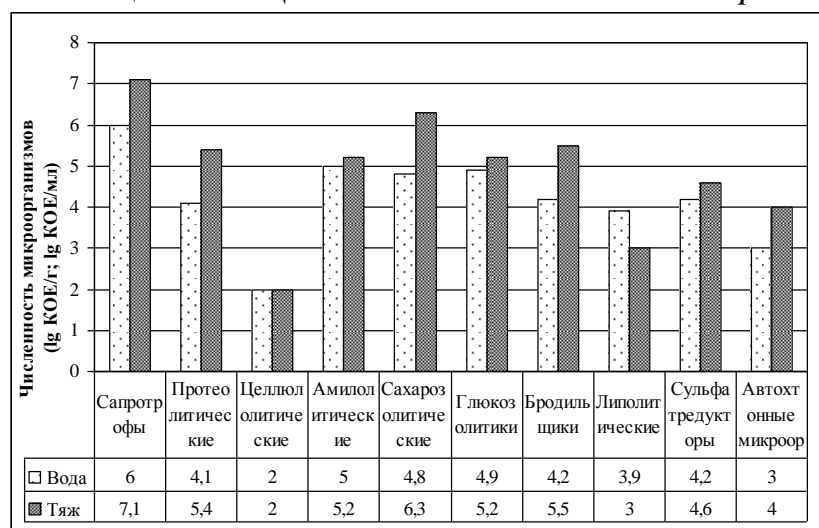
Изучение видового состава циано-бактериальных сообществ при экспонировании модельных экосистем со сточной водой показало, что в иммобилизованных на поролоне сообществах, как во 2-ой, так и в 3-ей экосистемах доминирующие виды цианобактерий аналогичны видам во вносимых на первоначальном этапе сообществах: в микроэкосистеме 2 - *Oscillatoria amphibia*, в микроэкосистеме 3 - нитчатые *Oscillatoria Woronichinii* и одноклеточные *Sinechocystis salina*. В то же время, на поверхности стенок сосудов в 3-ей микроэкосистеме сформировались скудные обрастания, эдификаторами которых являлись нитчатые цианобактерии *Phormidium dimorphum*, единичные клетки которых присутствовали в составе замазученных сточных вод.

Анализ численности исследуемых групп микроорганизмов в модельных экосистемах показал, что с внесением ЦБС отмечается превалирование

численности микроорганизмов в тяжах цианобактерий (рис. 5) в сравнении с водной фракцией модельных экосистем.



коллекционное ЦБС на основе *Oscillatoria amphibia*



аборигенное ЦБС на основе *Oscillatoria Woronichinii* и *Synechocystis salina*

Рис. 5. Физиологические группы микроорганизмов в экспериментальных экосистемах.

Данное явление, отмеченное ранее (Держинская, 1992, 1993; Сопрунова, 1998, 2005), показывает, что специфическое строение цианобактерий (нитчатое строение, наличие полисахаридного чехла) способствует иммобилизации микроорганизмов как внутри тяжей, так и вокруг них, что позволяет циано-бактериальным сообществам создавать зоны повышенной активности деградации различных загрязнений.

Кроме этого установлено, что численность микроорганизмов-спутников, присутствующих в сформировавшихся в замазученных сточных водах ЦБС, отличается от показателей численности накопительных культур, используемых в эксперименте (рис. 6).

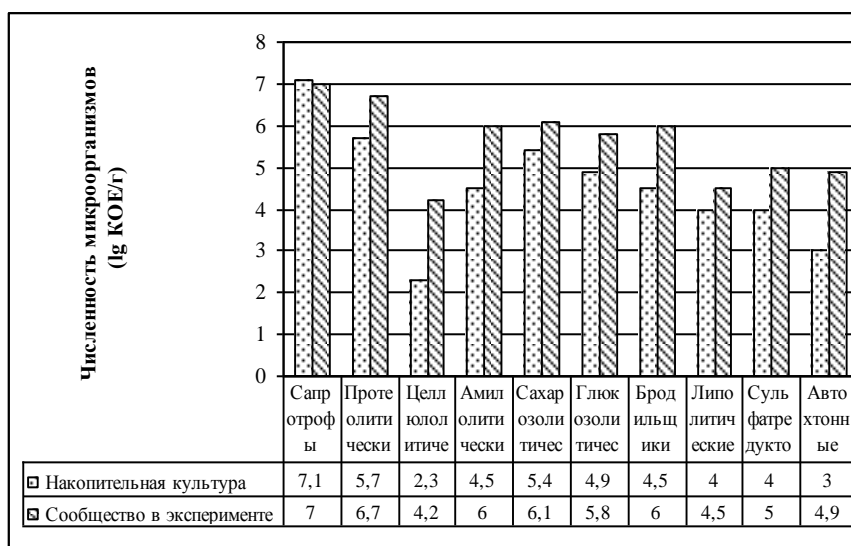
Эти особенности согласуются с данными, полученными ранее при исследовании процессов деструкции труднорастворимых соединений в сточных водах целлюлозно-бумажной промышленности (Держинская, 1992,

1993), газо-химического комплекса (Сопрунова, 1998). Это доказывает, что при вселении биоценозов на основе цианобактерий в сточные воды различных производств в каждом из них формируется своеобразный состав ассоциантов, направленный на деградацию загрязнений различного рода (Держинская, 1993).

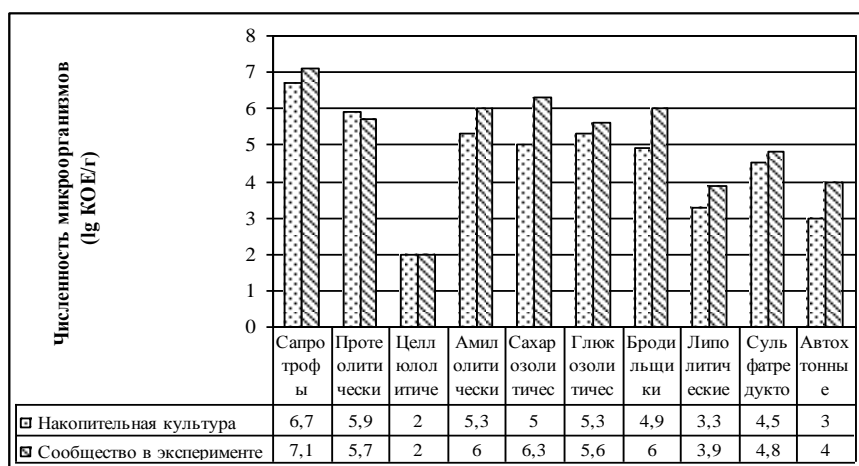
При сопоставлении численности исследуемых групп микроорганизмов, присутствующих в воде и в перифитоне ВВР установлено, что в микроэкосистемах 2 и 3 микроорганизмы перифитона растений также превышают численность микроорганизмов в воде (рис. 7). При этом, для автохтонной микрофлоры, присутствующей в перифитоне, характерно превышение численности на 2 порядка в сравнении с водой модельных экосистем.

Биотестирование воды в микроэкосистемах по окончании экспозиции с использованием *Daphnia magna Straus* показало, что при внесении коллекционного ЦБС на основе *Oscillatoria amphibia* и ВВР происходит снижение класса опасности сточных вод со второго (высокоопасные отходы) до четвертого (малоопасные отходы).

Таким образом, на основании проведенных экспериментальных исследований выявлено, что последовательное внесение в замазученные сточные воды коллекционного ЦБС на основе *Oscillatoria amphibia* и ВВР способствует существенному снижению содержания нефтяных углеводов, органического вещества и токсичности.

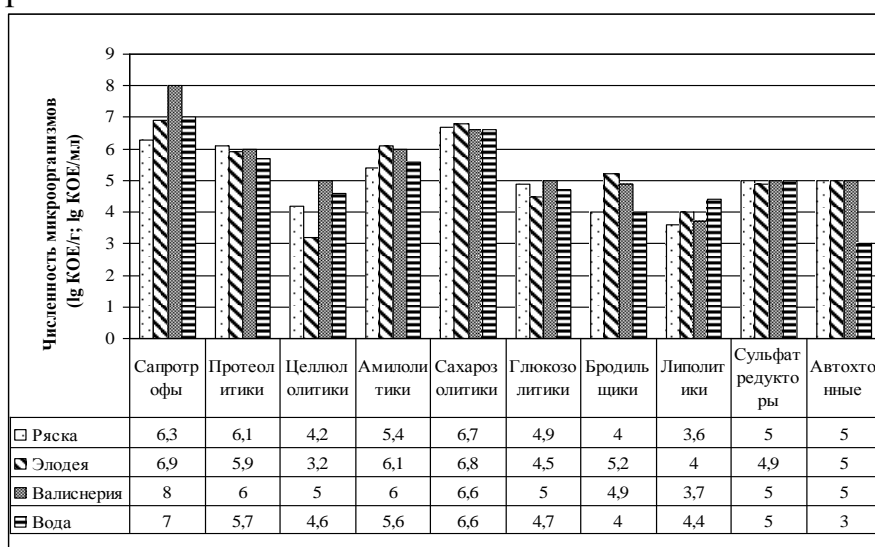


коллекционное ЦБС на основе *Oscillatoria amphibia* (микроэкосистема 2)

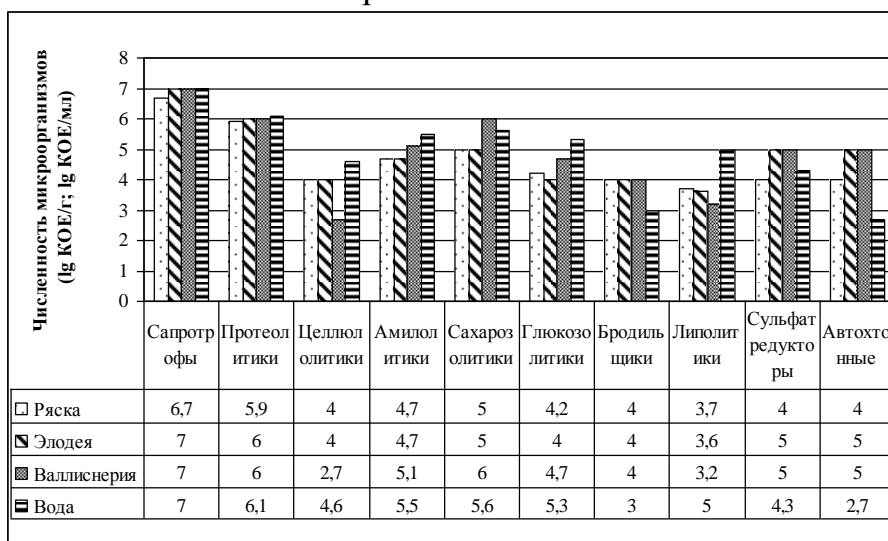


аборигенное ЦБС на основе *Oscillatoria Woronichinii* и *Synechocystis salina* (микроэкосистема 3)

Рис. 6. Физиологические группы микроорганизмов-спутников цианобактерий.



микроэкосистема 2



микроэкосистема 3

Рис. 7. Физиологические группы микроорганизмов в микроэкосистемах после экспонирования высших водных растений.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В условиях современного развития промышленности деятельность многочисленных предприятий по хранению и распределению нефтепродуктов приводит к образованию большого количества сточных вод и нефтезагрязненных жидких отходов, характеризующихся разнообразием и сложностью состава. При их очистке наряду с индустриальными методами следует использовать и биологические способы, т.к. процессы самоочищения загрязненных водоемов и очистка стоков имеют преимущественно биологическую основу (Винберг, 1966 и др.; Кравец, 1974; 1976) и способствуют биологическому оздоровлению окружающей среды.

При изучении эффективности двухступенчатой (фильтрация → внесение ЦБС, иммобилизованных на инертном носителе) и комплексной (фильтрация → принудительное аэрирование → внесение ЦБС, иммобилизованных на инертном носителе → внесение ВВР) очистки замазученных сточных вод в модельных экспериментальных исследованиях установлено интенсивное снижение содержания суммарных нефтяных углеводов, полиароматических углеводов, растворенного органического вещества, химического потребления кислорода, как при внесении биологических агентов очистки (ЦБС и ВВР), так и при участии аборигенного микробиоценоза сточных вод. При этом, отмечено, что в процессе фильтрации происходит снижение содержания нефтяных углеводов на 49,4-60%, что связано с удалением из сточных вод нерастворимой фракции нефтяных углеводов. В процессе аэрации сточных вод, сопровождающейся насыщением воды кислородом, отмечено снижение содержания нефтяных углеводов на 20-25%. Дальнейшее снижение концентрации нефтяных углеводов в экспериментальных микроэкосистемах за счет деятельности аборигенного микробиоценоза составило 8,5-43,3%. Несмотря на то, что внесение ЦБС и ВВР активизирует деградацию нефтяных углеводов лишь на 3,0-4,1% и 3,5% соответственно, основным преимуществом как ЦБС, так и ВВР является интенсивное обесцвечивание сточных вод (снижение оптической плотности на 50-63% по сравнению с контролем) и уменьшение токсичности (снижение класса опасности отходов со второго до четвертого).

Отмечено, что сточные воды, очищенные двухступенчатым методом способны стимулировать рост растений, и могут быть сброшены на поля фильтрации. Очистка комплексным методом приводит к уменьшению острой токсичности сточных вод и снижению класса опасности сточных вод, но при этом очищенные воды угнетают рост растений. Таким образом, очищенные многоступенчатым методом стоки могут быть сброшены в водоем при соответствующем (1:7,4) разбавлении.

В целом, использование в качестве агентов очистки представителей фототрофных организмов (цианобактерий, высших водных растений) способствует повышению эффективности детоксикации и биоремедиации (биологическому оздоровлению) очищаемых стоков, и в зависимости от

способа дальнейшего размещения очищенных стоков (сброс на рельеф или в водоем) можно рекомендовать как двухступенчатую, так и комплексную очистку в качестве основы для разработки методов биологической очистки замазученных сточных вод.

## ВЫВОДЫ

1. Определение гидрохимических параметров замазученных сточных вод резервуара-накопителя показало присутствие в них высокого содержания тяжелоокисляемых органических веществ: нефтяных углеводородов - 76,4-82,9 мг/дм<sup>3</sup>, ПАУ - 1610,9 нг/д<sup>3</sup>; ХПК – 276-1440 мг О<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>; высокая оптическая плотность – 2,08 и токсичность (II класс опасности отходов).

2. В составе замазученных сточных вод преобладают аборигенные гетеротрофные микроорганизмы (КОЕ/мл): липолитики (1,5\*10<sup>3</sup>), амилолитики (1,7\*10<sup>5</sup>), протеолитики (2,2\*10<sup>5</sup>), сахарозолитики (2,4\*10<sup>5</sup>), сульфатредукторы (1,4\*10<sup>5</sup>), глюкозолитики (1,5\*10<sup>5</sup>), бродильщики (4,6\*10<sup>4</sup>), целлюлолитики (5,0\*10<sup>3</sup>), сапротрофы (3,0\*10<sup>3</sup>), олиготрофы (2,0\*10<sup>3</sup>).

3. Фототрофные организмы замазученных сточных вод представлены единичными клетками *Oscillatoria*, *Sinechocystis*, *Phormidium*. Методом накопительной культуры из замазученных сточных вод выделено альго-бактериальное сообщество, эдификаторами которого являются цианобактерии родов *Oscillatoria*, *Sinechocystis*.

4. При изучении роли циано-бактериальных сообществ в очистке замазученных сточных вод установлено, что наибольшей эффективностью обладает циано-бактериальное сообщество на основе *Oscillatoria amphibia*, что проявляется в снижении содержания нефтяных углеводородов в целом на 95,7%; окисляемости перманганатной – 69% и бихроматной – 85%; содержания РОВ – 74%.

5. При моделировании многоступенчатой очистки замазученных сточных вод (фильтрация→принудительное аэрирование→внесение циано-бактериальных сообществ, иммобилизованных на инертном носителе→внесение высшей водной растительности), выявлено, что наиболее эффективным является использование циано-бактериального сообщества на основе *Oscillatoria amphibia* и высших водных растений валлиснерии спиральной (*Vallisneria spiralis*), элодеи канадской (*Elodea canadensis*), ряски малой (*Lemna minor*), способствующее снижению содержания нефтяных углеводородов в целом на 91,3%, ПАУ – 94% и РОВ – 66%; перманганатной окисляемости – 77%; оптической плотности сточных вод – 71%, класса опасности отходов со II (высокоопасные) до IV (малоопасные).

6. Установлено, что внесение циано-бактериальных сообществ и высшей водной растительности в замазученные сточные воды способствует увеличению в гликокаликсе цианобактерий и в перифитоне ВВР в сравнении с водной средой на 2 порядка численности автохтонных (аборигенных)

микроорганизмов, имеющих большее сродство к субстрату сточных вод, что создает зоны повышенной активности деградации загрязняющих соединений замасоченных сточных вод.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Сопрунова О.Б., Сайфутдинова (Гальперина) А.Р. Нефтяное загрязнение морских вод и альго-бактериальные сообщества // Южно-Российский вестник геологии, географии и глобальной энергии: Изд-во АГУ, 2003, №3. - с.198-199.

2. Сопрунова О.Б., Сайфутдинова (Гальперина) А.Р. Экспериментальное изучение процессов деструкции нефти альго-бактериальными сообществами // Экология и научно-технический прогресс: Матер. 2-ой межд. научно-практ конф. – Пермь, 2003.- с.209-210.

3. Сайфутдинова (Гальперина) А.Р. Сообщества нефтеокисляющих микроорганизмов вод Северного Каспия // Сборник научных статей «Наука: Поиск 2003», Астрахань, 2003, выпуск 1. – с.205 – 207.

4. Сайфутдинова (Гальперина) А.Р. Альго-бактериальные сообщества в процессах самоочищения водной среды от нефтепродуктов // Тезисы докладов X Всероссийской студенческой научной конференции «Экология и проблемы защиты окружающей среды», Красноярск, 2003. – с.80 – 81.

5. Сопрунова О.Б., Сайфутдинова (Гальперина) А.Р. Бактериальный и грибной компоненты цианобактериальных ценозов, сформировавшихся в присутствии нефти и нефтепродуктов // Материалы международной научно-практической конференции «Проблемы и перспективы реабилитации техногенных экосистем», Астрахань, 2005. – с.211-214.

6. Сайфутдинова (Гальперина) А.Р. Ассоцианты сообществ на основе цианобактерий, развивающихся в присутствии нефти // Сборник научных студенческих работ Второго Всероссийского конкурса студенческих работ, посвященный 200-летию Московского общества испытателей природы, Москва, 2005. – с.426-428.

7. Сайфутдинова (Гальперина) А.Р. Некоторые аспекты получения чистых культур цианобактерий Материалы международной конференции, посвященной 75-летию Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова «Грибы и водоросли в биоценозах», Москва, 2006. – с.131-132.

7. Сайфутдинова (Гальперина) А.Р. Перспективные направления разработки биологических методов очистки экосистемы Северного Каспия от нефтяных углеводородов // Материалы Всероссийской конференции аспирантов и студентов по приоритетному направлению «Рациональное природопользование», Ярославль, 2006. – с.285-289.

8. Сопрунова О.Б., Сайфутдинова (Гальперина) А.Р. Цианобактериальные сообщества в условиях моделирования нефтяного загрязнения // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты исследования симбиотических систем», Саратов, 2007. – с.31.

9. Гальперина А.Р. Циано-бактериальные сообщества в практике охраны водных экосистем от нефтяных углеводородов // Тезисы 11-й Пущинской международной школы-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века», Пущино, 2007. - с.113.

**10. Сопрунова О.Б., Гальперина А.Р. Особенности аборигенной микрофлоры замазученных сточных вод // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе, 2008, №5. - с.33-35.**

11. Сопрунова О.Б., Гальперина А.Р. Аборигенная микрофлора замазученных сточных вод в практике охраны водных экосистем от нефтяных углеводородов // Тезисы российской школы-конференция «Генетика микроорганизмов и биотехнология», посвященная 40-летию института ГосНИИгенетика, Москва – Пущино, 2008. – с.120-121.

12. Сопрунова О.Б., Гальперина А.Р. Аборигенная микрофлора замазученных сточных вод // Тезисы 12-й Пущинской международной школы-конференции молодых ученых «Биология — наука XXI века», Пущино, 2008. – с.200.

13. Сопрунова О.Б., Гальперина А.Р. Биогеохимические функции микроорганизмов в водных техногенных экосистемах // Материалы 6-й международной биогеохимической школы «Биогеохимия в народном хозяйстве: фундаментальные основы ноосферных технологий», Астрахань, 2008. – с.77-78.

14. Сопрунова О.Б., Гальперина А.Р. Роль аборигенной микрофлоры в биодegradации нефтяных углеводородов в водных техногенных экосистемах // Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со Дня рождения К.В. Горбунова «Фундаментальные аспекты биологии в решении актуальных экологических проблем», Астрахань, 2008. – с.39-43.

16. Сопрунова О.Б., Гальперина А.Р. Перспективные направления эффективной очистки токсичных сточных вод // Бюллетень Московского общества испытателей природы, отдел биологический, том 114, вып. 3; Приложение 1, часть 1, Москва, 2009. – с.183-186.

17. Гальперина А.Р. Аборигенная микрофлора как перспективный объект экологических биотехнологий // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов», Москва, 2009. – с.213.

18. Сопрунова О.Б., Гальперина А.Р. Разработка технологии биоремедиации замазученных сточных вод // Материалы Международной научной конференции Инновационные технологии в управлении, образовании, промышленности «АСТИНТЕХ – 2010», Астрахань, 2010. – с.102-104.

19. Сопрунова О.Б., Гальперина А.Р., Нгуен Виет Тиен Перспективы аборигенной микрофлоры в детоксикации и очистке нефтесодержащих отходов // Материалы 1-й научно-практической конференции «Новейшие

технологии освоения месторождений углеводородного сырья и обеспечение безопасности экосистем Каспийского шельфа», Астрахань: Изд-во АГТУ, 2010. – с.184.

**20. Гальперина А.Р. Разработка приемов биоремедиации сточных вод с остаточной замазученностью // Юг России: экология, развитие, 2010. - № 4. – с.109-112.**

**21. Гальперина А.Р. Аборигенные микроорганизмы замазученных сточных вод как основа экологических биотехнологий // «Известия Самарского научного центра Российской академии наук», 2011. Т.13, № 5(3). – с. 132-135.**