

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В BIOTEХНОЛОГИЯХ  
ОЧИСТКИ ПОВЕРХНОСТНОГО СТОКА С АВТОСТРАД

А.В. КАСАТКИН, О.В. СЕЛИЦКАЯ

(Кафедра микробиологии)

Предложен метод очистки поверхностного стока с проезжей части автомобильных дорог, предусматривающий наличие в водоочистном сооружении биологического модуля, состоящего из сорбента (цеолит) и микроорганизмов-деструкторов нефтепродуктов (*Pseudomonas putida* шт. 91-96). В результате модельного эксперимента было установлено, что цеолит задерживает в среднем 90% нефтепродуктов из образца сточной воды, причем нанесение биопрепарата на цеолит не оказывает значительного влияния на его поглотительную способность. Внесение бактерий *Pseudomonas putida* шт. 91-96 в биологический фильтр позволяет восстанавливать сорбционные свойства цеолита, увеличивая тем самым интервалы обслуживания очистного сооружения, что приводит к общему снижению затрат, а также повышает качество и надежность очистки сточных вод. Установлено, что бактерии *Pseudomonas putida* шт. 91-96 достаточно устойчивы к противогололедному реагенту. Содержание хлористого кальция в среде до 3% по массе не оказывает ингибирующего воздействия на данные микроорганизмы.

Значительный рост автопарка в последние годы привел к увеличению нагрузки на существующую транспортную систему и существенному ухудшению экологической ситуации в целом.

Основные загрязняющие вещества в сточных водах с автомобильных дорог — это взвеси, которые образуются при износе автомобиля и дорожного покрытия, а также за счет нанесенного грунта; тяжелые металлы, основными источниками которых являются фрикционные накладки тормозных колодок, дисков сцепления, шины; нефтепродукты. Нефтепродукты в поверхностном стоке с автострэд представляют собой смесь из горюче-смазочных материалов, которые попадают в сточные воды и почву вследствие негерметичности узлов и агрегатов. Исследования показывают, что содержание загрязняющих веществ в сточных водах с автомобильных дорог и в почве придорожной полосы порой очень высокое, существенно превышает са-

нитарно-гигиенические нормативы. Химический анализ снега, взятого с обочин дорог, выявил наличие нефтепродуктов в концентрациях, превышающих ПДК в 486-1125 раз [2,5].

Для очистки поверхностных вод с дорог и мостов обычно применяются фильтры с засыпкой из кварцевого песка и отстойники. Эффективность данных сооружений недостаточна. Более совершенными очистными сооружениями следует признать конструкцию в виде последовательно соединенных емкостей: первичного отстойника, основного отстойника и сорбционного фильтра. Однако подобные сооружения не обеспечивают достаточной степени очистки сточных вод на первых ступенях, что значительно повышает нагрузку на сорбент. В результате происходит существенное снижение эффективности работы всего очистного сооружения, часто требуется и замена адсорбента. Более эффективным следует признать очистное сооружение, состоящее из последовательно

соединенных емкостей первичного отстойника, основного отстойника с ловушкой нефтепродуктов, отводящей верхний слой воды, в котором сконцентрирована большая часть нефтепродуктов, в биологический фильтр, и сорбционного фильтра. Биологический фильтр представляет собой емкость, заполненную каким-либо сорбентом, на который наносят культуру микроорганизма.

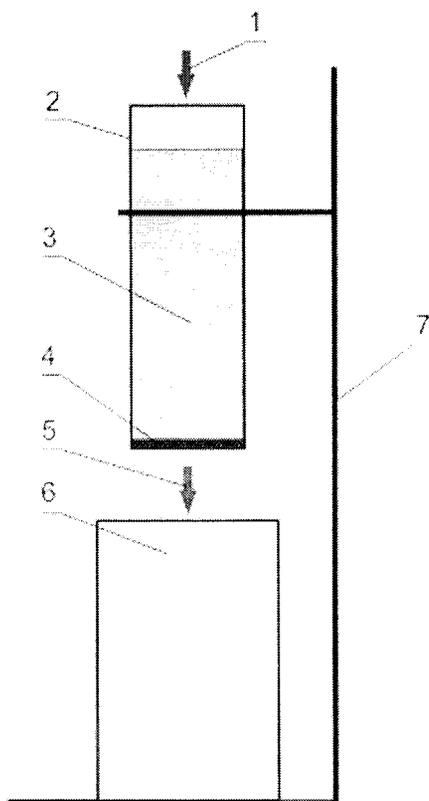
Однако вопросы повышения эффективности очистки вод от нефтепродуктов с помощью биофильтров остаются недостаточно изученными.

Чтобы установить скорость регенерации микроорганизмами *Pseudomonas putida* шт. 91-96 сорбционной загрузки биологического модуля от сорбированных нефтепродуктов и эффективность очистки биологическим модулем поверхностных вод, были проведены модельные опыты, основными целями которых было: установить степень адгезии микроорганизмов *Pseudomonas putida* шт. 91-96 на цеолите; установить эффективность очистки воды от нефтепродуктов биологическим модулем; определить необходимое время для полной регенерации сорбционной загрузки биологического модуля от нефтепродуктов микроорганизмами *Pseudomonas putida* шт. 91-96; определить устойчивость микроорганизмов *Pseudomonas putida* шт. 91-96 к противогололедному реагенту (хлористый кальций).

### Объекты и методы исследований

В экспериментах использовали бактерии *Pseudomonas putida* шт. 91-96 из коллекции кафедры микробиологии РГАУ — МСХА имени К.А.Тимирязева.

Для проведения эксперимента была сконструирована лабораторная модель биологического фильтра очистного сооружения (рис.1). Он представлял собой колонку, заполненную цеолитом (фракции 1-3 мм) в качестве филь-



**Рис. 1.** Схема экспериментальной установки: 1 — жидкая культура *Pseudomonas putida* шт. 91-96 со средой МПБ; 2 — корпус фильтра; 3 — цеолит; 4 — геотекстиль TS 20 компании Polyfelt Ges.m.b.H; 5 — профильтрованная жидкая культура *Pseudomonas putida* шт. 91-96 со средой МПБ; 6 — емкость для сбора; 7 — кронштейн фильтра

рующей засыпки. Объем засыпки составил 250 мл.

Цеолит, засыпанный в цилиндр, проливался дистиллированной водой до его насыщения. Затем в одну колонку вносили бактерии *Pseudomonas putida* шт. 91-96 (проливали через колонку 300 мл 48-часовой бульонной культуры бактерий с титром 2,310<sup>8</sup> КОЕ/мл). В контрольную колонку вносили аналогичный объем мясопептонного бульона. Через обе колонки пропускали смесь воды с нефтепродуктами (5 об-

разцов моторных масел, трансмиссионного масла и дизельного топлива), которая имитировала сточные воды. Концентрация нефтепродуктов в воде составила 310 мг/л. Через каждую колонку фильтровали 1 л воды. Отфильтрованную воду собирали и определяли в ней содержание нефтепродуктов. Фильтрующие колонки выдерживали в течение 30 дней при температуре 18-22°C. Содержания нефтепродуктов в цеолите в опытном и контрольном вариантах определяли сразу после фильтрации воды с нефтепродуктами (1 сут), а также на 7, 14 и 30-е сут, для чего засыпку высыпали, отбирали пробы, а затем помещали обратно в цилиндр. Определение содержания нефтепродуктов в воде и адсорбенте проводили флуориметрическим методом. Численность *Pseudomonas putida* в исходной культуре и цеолите определяли методом посева на МПА с последующей идентификацией выросших колоний [3].

Эффективность воздействия микроорганизмов рассчитывали по остаточному содержанию нефтепродуктов.

В качестве противогололедного реагента был выбран реагент на основе хлористого кальция производства компании ООО «Антилед» с характеристиками,

соответствующими ГОСТ 450-77. Данный реагент является основным противогололедным реагентом в Москве.

Готовили плотную питательную среду (МПА), перед стерилизацией добавляли вышеназванные соли кальция в питательную среду в количестве: 0; 0,5; 1; 2; 3; 6 и 10% по массе. Посев чистой культуры бактерий производили глубинно методом предельных разведений. В каждую чашку вносили 1 мл суспензии микроорганизмов *Pseudomonas putida* шт. 91-96, содержащий примерно одинаковое количество бактериальных клеток (КОЕ). После инкубации в термостате в течение 7 сут подсчитывали количество колоний на чашке и определяли КОЕ в мл суспензии.

### Результаты и их обсуждение

В результате эксперимента было установлено (табл.1), что цеолитовый фильтр задерживает в среднем 90% нефтепродуктов из образца сточной воды, причем внесение биопрепарата не оказывает значительного влияния на поглотительную способность сорбента.

Данные о концентрации нефтепродуктов в биологическом фильтре и контроле приведены в табл. 2, из которой видно, что начальная концентрация в

Т а б л и ц а 1

**Концентрация нефтепродуктов (НП) в образцах воды**

Проба	Концентрация НП, мг/л	Эффективность очистки воды от НП, %
Начальная концентрация НП в воде	310±78	—
Концентрация НП в воде после фильтрации через цеолитовый фильтр с <i>Pseudomonas putida</i>	29,2±7,3	90,6
Концентрация НП в воде после фильтрации через цеолитовый фильтр без <i>Pseudomonas putida</i>	28±7,0	90,9

Т а б л и ц а 2

**Концентрация нефтепродуктов (НП) в образцах цеолита, мг/г**

Проба	Начальная	7-е сут	14-е сут	30-е сут
Концентрация НП в цеолите (фильтр с МБП)	1,19±0,29	1,10±0,28	0,82±0,21	0,024±0,011
Концентрация НП в цеолите (фильтр без МБП)	1,18±0,29	1,16±0,29	1,08±0,27	0,145±0,065
Фоновая концентрация НП в чистом цеолите			0,022±0,010	

цеолите биологического фильтра снизилась за 7 сут приблизительно на 7,6% (1,7% в контрольном образце), за 14 сут — на 31% (8,4% в контрольном образце), а за 30 сут содержание нефтепродуктов в цеолите биологического фильтра снизилось до фонового уровня, в то время как в контрольном образце концентрация превышала фоновую в 6,6 раза.

Для того чтобы выяснить причину достаточно высокой скорости биоразложения в контрольном образце, был проведен анализ численности микроорганизмов в цеолите биологического фильтра и контрольном образце (табл.3).

Было установлено, что интродуцированные бактерии не только хорошо приживаются в цеолитовой засыпке фильтра, но и активно размножаются.

Данные, полученные в результате микробиологического исследования сорбционной загрузки контрольного образца, позволяют сделать вывод, что биоразложение нефтепродуктов в контрольном образце происходило за счет присутствующих в цеолите аборигенных микроорганизмов, идентификация которых позволила отнести их к роду *Pseudomonas*.

Достаточно невысокий титр бактерий *Pseudomonas putida* шт. 91-96 в цеолите биологического фильтра на 30-е сут эксперимента говорит о том, что наиболее доступный источник углерода был израсходован ранее, вследствие чего численность микроорганизмов снизилась.

Полученные данные говорят о том, что природный цеолит хорошо подходит в качестве носителя микробиологического препарата, а также обеспе-

чивает высокую эффективность очистки вод от нефтепродуктов (90,4-90,9%). Кроме того, внесение нефтеокисляющих бактерий *Pseudomonas putida* шт. 91-96 в биологический фильтр позволяет восстанавливать сорбционные свойства цеолита, увеличивая тем самым интервалы обслуживания очистного сооружения, что приводит к общему снижению затрат, а также повышает качество и надежность очистки сточных вод. Использование хлорида кальция и хлорида натрия в зимний период для борьбы с обледенением проезжей части ведет к тому, что эти соединения частично аккумулируются в кюветах и после придорожной полосы, а с началом таяния снега попадают в сточные воды.

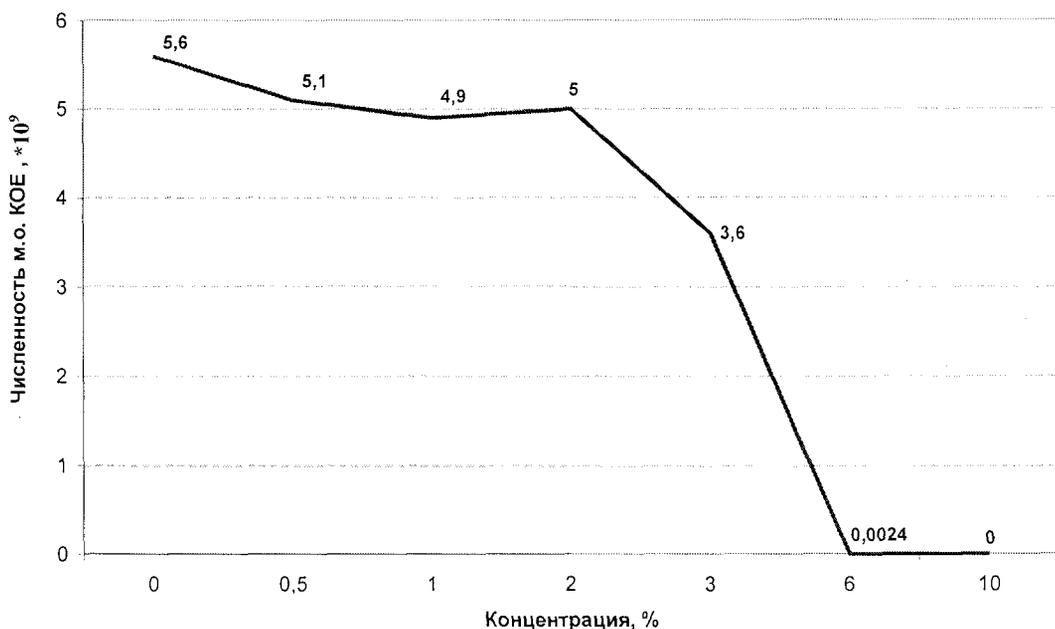
Поскольку повышение концентрации солей вызывает ингибирование развития бактерий, а поле определенного предела приводит к их гибели, для эффективного функционирования очистного сооружения с биологическим фильтром было необходимо оценить устойчивость бактерий *Pseudomonas putida* шт. 91-96 к противоположному реагенту. Результаты модельного эксперимента представлены на рис. 2.

Численность микроорганизмов *Pseudomonas putida* шт. 91-96 снижается на 3 порядка только при внесении в среду по массе 6% противогололедного реагента, кроме того, при этой концентрации колонии мелкие, нетипичные, пигментация отсутствует. Внесение 3% хлорида кальция хотя и не вызывает гибели бактерий (численность не снижается), но подавляет рост, так как колонии на питательной среде появились позже на 4 дня, а также отсутствовала их пигментация.

Таблица 3

**Численность бактерий в сорбционной засыпке биологического фильтра и в контроле через 1 мес (КОЕ/габс.сух.в-ва)**

Проба	Общая численность	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas putida</i> шт. 91-96
Цеолит с внесенными бактериями	$1,10 \cdot 10^7$	$7,78 \cdot 10^6$	$4,78 \cdot 10^6$
Цеолит без внесения бактерий	$6,15 \cdot 10^6$	$2,41 \cdot 10^5$	Не обн.



**Рис. 2.** Изменение численности микроорганизмов в зависимости от концентрации противогололедного реагента

Результаты исследования говорят о том, что бактерии *Pseudomonas putida* шт. 91-96 достаточно устойчивы к противогололедному реагенту. Так, содержание антигололедного реагента в среде до 3% по массе не оказывает ингибирующего воздействия на данные микроорганизмы. При содержании 4% можно считать, что воздействие становится ингибирующим, при содержании противогололедного реагента 6% наблюдается явное угнетение роста микроорганизмов, а при 10% противогололедного реагента в среде рост бактерий *Pseudomonas putida* шт. 91-96 отсутствует. Однако цеолит имеет низкую сорбционную емкость по отношению к противогололедному реагенту — 2,3 мг/г. На основании этого можно утверждать, что концентрация  $\text{CaCl}_2$  в сорбенте за время эксплуатации очистного сооружения не достигнет уровня, оказывающего ингибирующее действие на микроорганизмы.

На основании полученных данных можно сказать, что метод очистки сто-

ка с проезжей части автомобильных дорог с применением биологического модуля достаточно эффективен. Кроме того, внесение бактерий *Pseudomonas putida* шт. 91-96 в биологический фильтр позволяет восстанавливать сорбционные свойства цеолита, увеличивая тем самым интервалы обслуживания очистного сооружения, что приводит к общему снижению затрат, а также повышает качество и надежность очистки сточных вод.

### Выводы

1. Установлена высокая степень адгезии микроорганизмов *Pseudomonas putida* шт. 91-96 на природном цеолите.
2. Показано, что природный цеолит хорошо подходит в качестве носителя микробиологического препарата, а также обеспечивает высокую эффективность очистки вод от нефтепродуктов (90,4-90,9%).
3. Бактерии *Pseudomonas putida* шт. 91-96 достаточно устойчивы к противогололедному реагенту. Содержание ан-

тигололедного реагента в среде до 3% по массе не оказывает ингибирующего воздействия на данные микроорганизмы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ 450-77. Кальций хлористый технический. Технические требования. —
2. Государственный доклад «О состоянии и охране окружающей среды РФ в 2004 г.». —
3. Методы почвенной микро-

биологии и биохимии / Под ред Д.Г. Звягинцева. М.:Изд-во МГУ, 1991. — 4. ПНДФ 14.1:2:4:128-98. Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах природной, питьевой и сточной воды флуориметрическим методом на анализаторе жидкости «Флюорат-02». М., 1988. — 5. Подольский В.П., Артюхов В.Г., Турбин В.С., Канищев А.Н. Автотранспортное загрязнение придорожных территорий. Воронеж: Изд-во ВГУ, 1999.

#### SUMMARY

The method of a motorway surface flow cleaning was offered, suggesting the presence of a biological module in water treating facility, consisting of sorbent (zeolite) and microorganisms-oil products destructors (*Pseudomonas putida* s. 91-96). As a result of a model experiment it was determined that zeolite detains on average 90% of oil products from waste-water sample, application of biological preparation on zeolite has no influence on its absorbing capacity. Putting bacteria *Pseudomonas putida* s. 91-96 in biological filter allows to restore sorption properties of zeolite, thereby increasing intervals of sewage disposal plant service that often leads to the total reduction of costs as well as increase in quality and reliability of sewage cleaning. It was determined that bacteria *Pseudomonas putida* s. 91-96 are resistant enough to ice protection reagent. Calcium chloride concentration in environment less than 3% mass fraction doesn't have abscopal influence on these microorganisms.