

УДК 502.7

DOI: 10.15372/KhUR20170212

## Анализ содержания ионов нитрата и аммония при биоремедиации грунтовой воды, загрязненной нефтепродуктами

И. В. ТРУСЕЙ<sup>1</sup>, Ю. Л. ГУРЕВИЧ<sup>2</sup>, В. П. ЛАДЫГИНА<sup>2</sup>, Ю. П. ЛАНКИН<sup>2</sup>, С. В. ФАДЕЕВ<sup>3</sup><sup>1</sup>Красноярский государственный педагогический университет им. В. П. Астафьева, Красноярск, Россия

E-mail: trusey@list.ru

<sup>2</sup>Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, Красноярск, Россия

E-mail: btchem@mail.ru

<sup>3</sup>ООО «Минусинская гидрогеологическая партия», Минусинск, Россия

E-mail: gidropartiya2009@yandex.ru

(Поступила 09.02.16; после доработки 25.03.16)

### Аннотация

Исследована возможность биоремедиации загрязненной нефтепродуктами грунтовой воды через систему наблюдательных скважин. Активность биоремедиационных процессов оценивали по изменению содержания в воде азота (аммонийного, нитратного и нитритного), численности аэробных и анаэробных микроорганизмов и нефтепродуктов. Рост микроорганизмов стимулировали внесением в грунтовую воду минеральных удобрений в качестве источников N и P. До обработки численность аммонифицирующих и углеводородокисляющих микроорганизмов в воде, отбираемой из скважин на загрязненном участке, не превышала  $10^5$  и  $10^3$ – $10^5$  КОЕ/мл соответственно. В ответ на подпитку лимитирующими рост элементами питания численность аэробных микроорганизмов возросла на 3–4 порядка. Численность аммонифицирующих микроорганизмов увеличилась до  $1.8 \cdot 10^8$  КОЕ/мл, углеводородокисляющих – до  $2.3 \cdot 10^7$  КОЕ/мл. Денитрификаторы до обработки в воде не фиксировались, а после обработки обнаруживались во всех исследуемых скважинах; их численность достигала  $9.5 \cdot 10^4$  КОЕ/мл. С запаздыванием на 2–6 недель в грунтовой воде возрастала концентрация аммонийного азота (свыше 50 мг/л). Анализ динамики химического состава грунтовых вод по данным всех скважин показал, что в активной фазе биодеградации нефтепродуктов происходили согласованные колебания активности процессов нитрификации и денитрификации и, соответственно, концентраций аммония и нитрата. Это же подтвердили прогнозы химического состава грунтовой воды, выполненные с помощью нейронной сети. Содержание нефтепродуктов в грунтовой воде снизилось на 65–97 %.

**Ключевые слова:** грунтовые воды, нефтепродукты, нитрат, аммоний, микроорганизмы, денитрификаторы

### ВВЕДЕНИЕ

Углеводороды нефти относятся к широко распространенным поллютантам поверхностных и подземных экосистем. Этот вид загрязнения характерен для грунтов в районе круп-

ных городов и промышленных объектов. Проведение таких мероприятий по очистке, как рыхление, аэрирование, обработка поверхности сорбентами, микробными препаратами и т. д., в отношении загрязненных грунтов и грунтовых вод сильно ограничено по срав-

нению с почвами. В связи с недостаточной изученностью процессов трансформации вещества в грунтах и практики проведения восстановительных работ, исследования в этой области актуальны.

Среди целого ряда методов восстановления загрязненных природных объектов широкое распространение получили методы биоремедиации, основанные на использовании микроорганизмов. Интенсификация биodeградации органического загрязнения достигается путем внесения в эти объекты элементов питания (как правило, азота и фосфора), лимитирующих развитие микроорганизмов-деструкторов, а также микробных препаратов, в состав которых входят селективно отобранные штаммы. В составе естественной микрофлоры грунтовых вод, загрязненных углеводородами, обнаруживается весь спектр физиологических групп микроорганизмов, способных деградировать углеводороды при низких температурах в аэробных и анаэробных условиях. При этом вклад анаэробных микроорганизмов в деградацию загрязнения весьма значителен (до 60 %) [1], что необходимо учитывать при планировании и проведении биоремедиационных мероприятий. Во многих случаях, когда загрязнение представлено природными соединениями и в составе естественной микрофлоры имеются деструкторы, стимулирование их активности, без внесения микробных препаратов, может быть достаточно эффективным [2]. Это менее затратный, но более доступный и технологичный подход к очистке грунтов.

В грунтах скорость переноса свободного кислорода ограничена, поэтому в зависимости от концентрации органических загрязнений, проницаемости грунта, скорости фильтрации грунтовых вод и активности микроорганизмов в зонах аэрации и насыщения происходит пространственное распределение областей аэробных и анаэробных процессов биоремедиации [3]. В зависимости от окислительно-восстановительного потенциала среды, в анаэробной области бактерии используют в качестве акцепторов электронов нитрат, железо (III), сульфат и уголекислоту для разложения органических соединений в процессах нитрификации, железо- и сульфатредукции, метаногенеза соответственно [2, 4]. Таким обра-

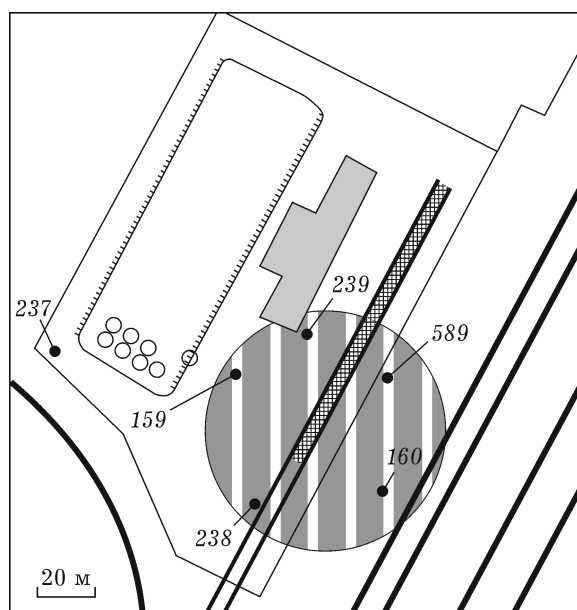
зом, химический состав грунтовых вод и активность различных физиологических групп микроорганизмов взаимосвязаны [5]. Очистка грунтов и грунтовых вод во всем объеме загрязненной подземной среды может идти при условии активного роста всех групп микроорганизмов, аэробных и анаэробных.

Окисление органических соединений аэробными микроорганизмами сопряжено со снижением концентрации растворенного кислорода и высвобождением связанного азота в растворимую форму (аммонийную). Появление аммония стимулирует рост нитрифицирующих бактерий, которые окисляют его до нитрата. Последний при низкой концентрации кислорода инициирует рост денитрификаторов, которые понижают потенциал среды и способствуют образованию зон роста железо- и сульфатовосстанавливающих бактерий. Интенсивность разложения загрязнений в этих взаимосвязанных процессах низкая из-за разбалансированности питания микрофлоры (соотношения  $C_{org}$ , N и P). По изменению химического состава грунтовых вод и численности различных физиологических групп микроорганизмов можно судить об их активности [6, 7]. Результаты этого анализа могут служить основанием для проведения тех или иных мероприятий по восстановлению загрязненных объектов.

Цель работы – исследовать возможность биоремедиации грунтовой воды, загрязненной нефтепродуктами, путем внесения через систему наблюдательных скважин питательных элементов (азот- и фосфорсодержащих удобрений) и стимулирования развития аборигенной микрофлоры.

#### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили подземные воды мазутного хозяйства ТЭЦ, загрязненные нефтепродуктами (смесь мазута, дизельного топлива и технологических масел). Грунт сложен гравийно-галечными, супесчаными породами, на поверхности которых имеется техногенный слой (0,5 м). Уровень грунтовых вод в течение года колеблется от 4 до 7 м. Температура в зимний период составляет 4 °С, в летний – 7–9 °С. По химическому



Масштаб 1:2000

Рис. 1. Расположение скважин на территории мазутного хозяйства ТЭЦ.

составу подземные воды относятся к типу сульфатно-гидрокарбонатных и гидрокарбонатных натриево-калиевых и смешанного катионного состава с минерализацией 0.37–1.5 г/л. Тип подземных вод может изменяться в сторону гидрокарбонатно-сульфатных. На участке мазутного хозяйства кислотность грунтовых вод варьирует в пределах pH 6.6–8.5. Грунты имеют низкую влажность (2–7 %), причем с ростом глубины она уменьшается.

Пробы грунтовой воды для анализа отбирали из наблюдательных скважин (рис. 1). Скважины № 159, 160, 238, 239 и 589 приурочены к области с высоким уровнем загрязнения (выделена штриховкой); содержание нефтепродуктов в грунтовой воде на начальном этапе достигало 350–400 мг/л воды. Скважина № 237 находится на границе загрязненного участка, а скважины № 161 и 240 – за его пределами.

С 2005 по 2008 гг. на территории мазутного хозяйства ТЭЦ авторы совместно с Минусинской гидрогеологической партией провели опытные испытания возможности стимулирования микрофлоры и биовосстановления геологической среды, загрязненной нефтепродуктами. Через наблюдательные скважины в грунты вносили биогенные элементы (в форме азотных и фосфорных удобрений) в относительно небольших количествах, чтобы ис-

ключить их миграцию за пределы загрязненного участка. Для обработки грунтов выбрали скважины № 237 и 159. Скважина № 237 расположена на границе линзы нефтепродуктов в загрязненном грунте и выше по течению грунтовых вод относительно скважины № 159, которая находится в центральной части проблемного участка. Удаление от нижней границы пятна и небольшая скорость движения грунтовой воды (0.17–0.27 м/сут в районе скважины № 159) минимизировали риски для подземных вод вне опытного участка.

Активность биоремедиационных процессов оценивали по изменению химического состава грунтовой воды, численности аэробных и анаэробных микроорганизмов и по содержанию нефтепродуктов в воде. Пробы грунтовой воды для химического и микробиологического анализа отбирали после промывания скважин. Химический анализ грунтовой воды проведен по стандартным методикам на “Фотометре КФК-3”, предел допускаемого значения основной абсолютной погрешности 0.5 % [8, 9]. Содержание нефтепродуктов в воде определяли флуориметрическим способом (“Флуорат-02-2М”), ошибка измерения для исследуемых диапазонов составляет 25 %. Пробы для микробиологического анализа хранили при низкой температуре (не выше 10 °С). Для учета численности аэробных микроорганизмов использовали метод предельных разведений с высевом на агаризованную среду [10]. Численность денитрификаторов определяли с использованием таблиц Мак-Креди ( $P_{0.95}$ ). Денитрификаторы выделяли на среде следующего состава: пептонный агар (1.35 %),  $KNO_3$  (0.5 %) и индикатор (бромтимолблау). Учет численности микроорганизмов осуществляли при температуре 20 °С.

Обработку микробиологических данных проводили с использованием статистики Пуассона [10] и статистического пакета анализа Excel 2007. Для анализа большого объема данных гидрохимического состава грунтовых вод использовали нейронную сеть, реализованную в виде пакета расширения Microsoft Excel [11, 12]. Сеть обучалась на основе алгоритма двойственного функционирования для выявления динамики изменения содержания в воде аммонийного, нитритного и нитратного азота, характерной для процесса денитрификации.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 приведены данные по содержанию азота в пробах грунтовой воды, отобранных из скважин до проведения биоремедиационных работ. Видно, что содержание аммонийного азота намного выше в воде загрязненного участка (скважины № 159, 239, 589), чем за его пределами (скважины № 161, 240). Наличие трех форм минерального азота и их соотношение свидетельствуют о том, что в подземной среде идут процессы нитрификации и денитрификации, но интенсивность их низкая. В грунтовых водах вне пятна загрязнения (скважины № 161, 240) концентрация растворенного кислорода достаточна для окисления органических соединений, в том числе углеводов, при низких концентрациях, и аммония нитрифицирующими бактериями. В этих условиях нитрификация обеспечивает низкую концентрацию аммония, который окисляется до нитрата. Поскольку скорость поступления кислорода в подземную среду ограничена, то в загрязненной воде окисление органических соединений аэробами, в том числе углеводородокисляющими, приводит к исчерпанию растворенного кислорода. Процесс нитрификации идет на убыль и сопровождается накоплением нитрита (скважины № 159, 239 и 589), который ингибирует вторую фазу нитрификации (окисление его в нитрат). Донорами электронов для денитрифицирующих бактерий служат органические соединения, но в силу низкой концентрации нитрата их биодegradации не происходит.

В загрязненной нефтепродуктами воде доступного микроорганизмам органического уг-

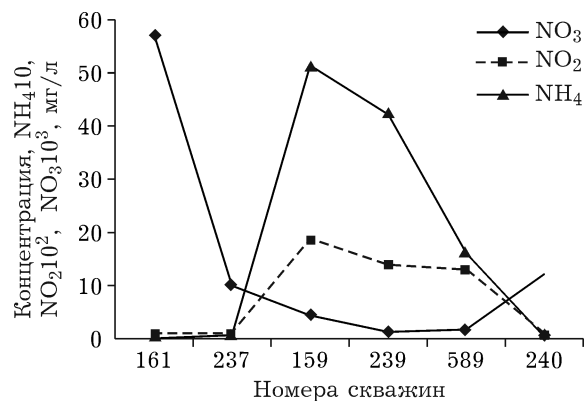


Рис. 2. Содержание аммонийной, нитритной и нитратной форм азота в грунтовой воде до внесения минеральных удобрений.

лерода намного больше, чем азота и фосфора. Известно, что в нефти содержится примерно 1–2 % азота [13], в основном в тяжелых фракциях. При биодegradации нефтепродукты могут служить источником азота для микроорганизмов. Источников дополнительного поступления фосфора в загрязненные нефтепродуктами воды, кроме фонового содержания в чистых грунтовых водах, нет. Исходя из анализа баланса питания микроорганизмов, для стимулирования их роста в загрязненную воду вносили дополнительные источники азотного и фосфорного питания. Удобрения вносили по схеме, представленной в табл. 1.

Исходя из анализа исходных данных (см. рис. 2) и закономерностей трансформации в грунтах кислорода, углерода и биогенных элементов, акцент в подпитке сделан на фосфор, поскольку его концентрация в грунтовой воде имела выраженную тенденцию снижения в направлении потока воды и составляла менее

ТАБЛИЦА 1

Схема внесения удобрений в скважины

Дата внесения	Удобрение	Количество, кг		
		Номер скважины		
		159	237	238
Июль 2005 г.	Нитроаммофоска	15.5	3.0	–
	Сульфат аммония	11.0	2.0	–
Сентябрь 2005 г.	Нитроаммофоска	6.0	–	–
	Сульфат аммония	4.5	–	–
Август–сентябрь 2006 г.	Нитроаммофоска	3.75	–	3.75
	Аммофос	1.5	–	1.5

0.1 мг/л. Это лимитирующая концентрация для роста микроорганизмов. Контрольные измерения, выполненные через 1 мес. после внесения удобрений в скважины, не обнаружили превышения предельных норм содержания аммонийного и нитратного азота в грунтовой воде.

Проведенная обработка повлияла на численность естественных микроорганизмов. Предварительный микробиологический анализ показал, что в водах загрязненного нефтепродуктами грунта присутствуют аэробные (аммонифицирующие, углеводородокисляющие) и анаэробные (денитрификаторы, сульфатредукторы, железоредукторы) микроорганизмы. Численность аммонификаторов колебалась в пределах  $10^5$ – $10^6$  КОЕ/мл, углеводородокисляющих –  $10^4$ – $10^5$  КОЕ/мл [14]. Численность денитрификаторов относительно других групп микроорганизмов на 2–3 порядка выше ( $10^3$ – $10^5$  КОЕ/мл), чем других анаэробов, что указывает на их доминирующую роль при анаэробной деградации органических соединений в данной экосистеме.

Наиболее интенсивная обработка проведена в скважине № 159. Именно в пробах грунтовых вод из этой скважины отмечался наи-

большой прирост численности всех групп микроорганизмов: аммонифицирующих, углеводородокисляющих, денитрификаторов (табл. 2). Уже через 2 мес. после восстановительных мероприятий численность аммонификаторов увеличилась на порядок – с  $1.45 \cdot 10^5$  до  $20.5 \cdot 10^5$  КОЕ/мл; углеводородокисляющих – на 1–2 порядка. Через 3 мес. численность аммонификаторов в воде была выше на два порядка, а весной 2006 г. – на три порядка выше по сравнению с начальной величиной. При этом отмечалось изменение численности микроорганизмов также в пробах грунтовых вод из скважин, в которые не вносили минеральные удобрения. Например, в воде скважины № 239 численность аммонификаторов выросла на два порядка. Это указывает на постепенное распространение вносимых биогенных элементов с током воды.

Что касается процессов анаэробной деградации, то на начальном этапе исследования (до обработки) денитрификаторы в грунтовой воде не фиксировались. Как отмечалось ранее (см. рис. 2), в грунтовой воде исчерпались нитрат-ионы, и их концентрация была недостаточной для поддержания процессов денитрификации. Внесение нитрата с удобре-

ТАБЛИЦА 2

Численность аэробных и анаэробных микроорганизмов в воде скважин

Физиологическая группа микроорганизмов	Номер скважины	Даты отбора проб					
		2005 г.		2006 г.		2007 г.	
		Июнь	Октябрь	Май	Октябрь	Март	Сентябрь
<b>Аэробные</b>		$n \cdot 10^5$ КОЕ/дм <sup>3</sup>					
Аммонификаторы	159	15±0.05	21±6.5	1790±904	208±133	0.23±0.04	–
	237	0.1±0.04	380±22	6.7±2.7	12.2±10.2	0.18±0.06	0.24±0.02
	239	0.34±0.02	–	3.4±1.9	171±98	0.6±0.2	0.1±0.03
	589	0.5±0.05	–	1.1±0.96	0.8±0.5	0.22±0.16	0.1±0.04
Углеводородокисляющие	159	1.26±0.25	31.6±18	231±140	141±90	0.16±0.09	–
	237	0.044±0.02	31.6±18	3.4±1.4	102±89	0.17±0.07	0.13±0.07
	239	0.082±0.02	–	1.42±0.69	15.5±6.5	0.16±0.12	0.37±0.09
	589	0.028±0.004	–	0.24±0.14	0.43±0.3	0.0021±0.002	0.005±0.003
<b>Анаэробные</b>		$n \cdot 10^4$ КОЕ/дм <sup>3</sup>					
Денитрификаторы	159	Н. о.	4.5	0.007	9.5	–	–
	237	Н. о.	20	0.02	0.15	0.02	0.25
	239	Н. о.	–	Н. о.	0.006	0.35	1.1
	589	Н. о.	–	Н. о.	0.004	0.75	0.007

Примечания. 1. Н. о. – не обнаружено. 2. Прочерк – не определяли.

ниями стимулировало развитие денитрификаторов (см. табл. 2). Сразу после первого внесения нитратных удобрений анаэробы фиксировались в пробах грунтовых вод из скважин № 159 и 237, в которые непосредственно вносили биогенные элементы питания. Через 1 год после второй обработки денитрификаторы обнаруживались во всех исследуемых скважинах загрязненного участка.

Проведенная обработка одновременно сказалась на химическом составе воды. Показатели химического состава грунтовых вод (концентрация аммония, сульфата, щелочность и др.) могут служить индикаторами биодеградации нефтепродуктов в анаэробных условиях [15]. В частности, через 2–3 мес. после внесения удобрений в грунтовой воде значительно увеличилась концентрация аммония (более 50 мг/л). Поскольку эти изменения произошли спустя длительное время, причиной повышенных концентраций аммония нельзя считать азотсодержащие удобрения, внесенные в скважины № 159 и 237. Повышение концентрации аммония в грунтовых водах свидетельствует о биологических процессах деградации нефтепродуктов.

На рис. 3 показана динамика содержания аммонийного и нитратного ионов в скважине № 589. Видно, что она носит противофазный характер и позволяет предположить, что в грунтовой воде в районе скважины № 589 протекают интенсивные процессы нитрификации и денитрификации. Подобная картина наблюдалась и для скважины № 239.

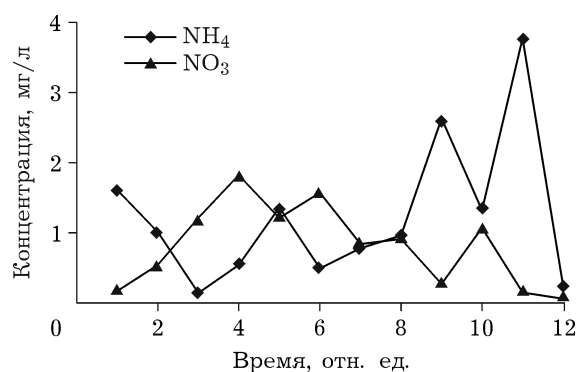


Рис. 3. Динамика концентраций аммония и нитрата в грунтовой воде из скв. № 589 (период с апреля 2004 по октябрь 2010 гг.).

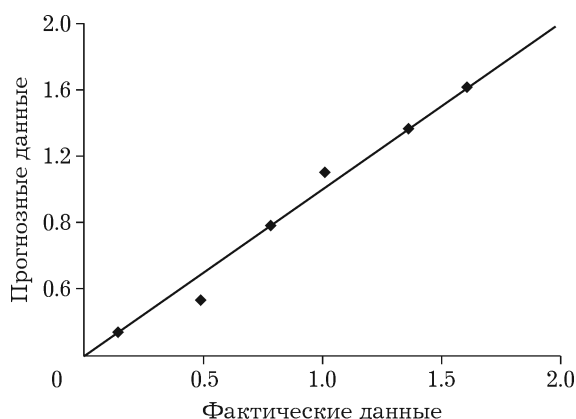


Рис. 4. Результаты обучения нейросети для прогнозирования концентраций аммония/нитрата в подземной воде (по данным скв. № 589, 2004–2007 гг.).

Для подтверждения этого предположения данные о составе грунтовых вод частично использовали для обучения нейронной сети распознаванию динамики концентраций аммонийной и нитратной форм азота, характерной для этих процессов (рис. 4).

Соответствие прогнозов нейросети фактическим данным (см. рис. 4) свидетельствует о высокой активности нитрификации и денитрификации и их определяющей роли для концентрации аммония, нитрита и нитрата в грунтовой воде скважин № 589 и 239.

Таким образом, хотя в скважину № 589 не вносили биогенные элементы, в воде интенсифицировались процессы нитрификации и денитрификации. Этот вывод подтверждают и результаты обучения нейронной сети. Вы-

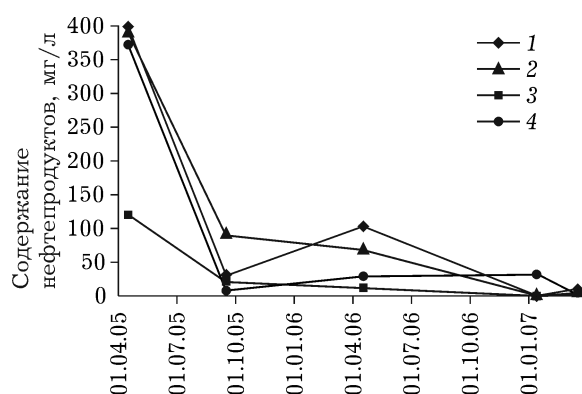


Рис. 5. Динамика снижения концентрации нефтепродуктов в грунтовой воде мазутного хозяйства. Номера скважин: 159 (1), 238 (2), 239 (3), 589 (4).

сокое качество обучения, обусловленное наличием устойчивых закономерностей, продемонстрировано на рис. 4. Следовательно, в околоскважинном пространстве идут процессы нитрификации и денитрификации. Отклонения от выявленной согласованности нитрификации и денитрификации означают, что в грунтовых водах этих скважин нарушается баланс между углеродным, азотным и фосфорным питанием микрофлоры. Доминируют факторы среды, которые нарушают эту взаимосвязь, и прежде всего, концентрация растворенного кислорода, фосфор и нитратный азот.

Эффективность повышения интенсивности биоремедиации загрязненных грунтовых вод путем внесения биогенных элементов показана на рис. 5. Содержание нефтепродуктов в грунтовой воде всех исследованных скважин снизилось с 350–400 до 1.5–10 мг/л. Визуально фиксировалось исчезновение пленки нефтепродуктов на поверхности воды.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате стимулирования активности микрофлоры загрязненной грунтовой воды в течение трех лет наблюдалось устойчивое снижение концентрации нефтепродуктов в воде на всем проблемном участке. Таким образом, определение ведущих факторов изменения содержания в грунтовых водах всех форм азота позволяет выбрать наиболее важные для восстановления всего объекта скважины и вариант их обработки. Показано, что эффективные процессы биоремедиации грунтовых вод, загрязненных органическими соединениями, могут быть интенсифицированы путем стимули-

рования естественной микрофлоры без использования коммерческих микробных препаратов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Водяницкий Ю. Н. // Почвоведение. 2011. № 11. С. 1364–1374.
- 2 Margesin R., Schinner F., Marx J.-C., Gerday C. Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology / Eds.: R. Margesin, F. Schinner, J.-C. Marx, C. Gerday. Berlin: Springer, 2008.
- 3 Трусей И. В., Озерский А. Ю., Ладыгина В. П., Гуревич Ю. Л. // Сиб. экол. журн. 2009. Т. 16, № 1. С. 29–35.
- 4 Крайнов С. П., Рыженко Б. Н., Швецов В. М. Геохимия подземных вод. Теоретические, прикладные и экологические аспекты / Отв. ред. Н. П. Лаверов. М.: Наука, 2004. 677 с.
- 5 Franzmann P., Robertson W., Zappia L., Davis G. // Biodegradation. 2002. P. 65–78.
- 6 Кондакова Г. В. Бактериальные процессы трансформации соединений углерода и азота в термальных минерализованных подземных водах с различной степенью контаминации: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: Москва, 2001. 28 с.
- 7 Максимович Н. Г., Хмурчик В. Т. // Вестн. Перм. ун-та. 2012. Вып. 3 (16). С. 47–55.
- 8 Методические рекомендации по выявлению, обследованию, паспортизации и оценке экологической опасности очагов загрязнения геологической среды нефтепродуктами. М.: ГИДЭК, 2002 г.
- 9 Гольдберг В. М., Мелькановицкая С. Г., Лукьянчиков В. М. Методические рекомендации по выявлению и оценке загрязнения подземных вод. М.: ВСЕГИНГЕО, 1988.
- 10 Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхардта и др. М.: Мир, 1983. 536 с.
- 11 Okhonin V., Okhonin S., Ils A., Plegemres M. // Neural Network World. 2001. Vol. 11, No. 2. P. 145–151.
- 12 Lankin Yu. P., Lobova T. I., Popova L. Yu. // Optical Memory and Neural Networks. 2006. Vol. 15, No. 2. P. 65–73.
- 13 Яновская С. С., Сагаченко Т. А. // Изв. Томск. политехн. ун-та. 2009. № 3. С. 132–136.
- 14 Ladygina V. P., Trusey I. V., Gurevich Y. L. // The 2nd Int. Conf. on Bioinformatics and Biomedical Engineering (iCBBE 2008), May 16–18, 2008, Shanghai, China. Vol. V: Environmental Pollution and Public Health (2). URL: <http://www.icbbe.org> (дата обращения: 21.01.2016).
- 15 Eriksson S., Ankner T., Abrahamsson K., Sjoling Esa. // Geomicrobiol. J. 2006. Vol. 23. P. 45–58.

