УДК 579.66

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ ПСИХРОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ В ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ

[1]Хасенова Э.Ж., [2]Молдагулова Н.Б., [1]Бердимуратова К.Т., [1]Аюпова А.Ж., [1]Курманбаев А.А.

[1]РГП «Национальный центр биотехнологии», Астана;
[2]ТОО «Экостандарт.kz», Астана, e-mail: elmira_alta@mail.ru

Исследована эффективность применения биологического препарата «Энойл» на основе нефтеокисляющих психротрофных микроорганизмов в процессе очистки почвы, загрязненной нефтепродуктами в полевых условиях. Испытания биопрепарата по очистке почв, загрязненных нефтепродуктами, проводили на базе Восточного филиала ТОО «Топливно-энергетический комплекс – Казахстан» в г. Тараз. В качестве нефтеокисляющих бактерий препарат содержит штаммы бактерий: Rhodococcus erythropolis ДН-1, Bacillus amyloliquefaciens И-15 и Serratia marcescens H_3K. В течение 4 месяцев комплексная биоремедиация почвы с использованием препарата на завершающем этапе очистки привела к уменьшению содержания углеводородов на 82,0%. Таким образом, по результатам проведенных испытаний препарата «Энойл» можно сделать вывод о том, что данный препарат может эффективно нейтрализовать нефтепродукты в почве.

Ключевые слова: нефтяное загрязнение, биопрепарат, углеводородокисляющие микроорганизмы, биоремедиация

STUDY OF THE EFFICIENCY OF APPLICATION THE BIOPREPARATE BASED ON OIL-OXIDIZING PSYCHRO-TROPHIC MICROORGANISMS FOR FIELD SOIL BIOREMEDIATION

[1]Khasenova E.Zh., [2]Moldagulova N.B., [1]Berdimuratova K.T., [1]Ayupova A.Zh., [1]Kurmanbaev A.A.

[1]RSE «National Center of Biotechnology», Astana;
[2]LLC «Ecostandart.kz», Astana, e-mail: elmira_alta@mail.ru

The effectiveness of using biological preparation «Enoil» based on oil-oxidizing psychrotrophic microorganisms in the process of cleaning the field soil contaminated with oil products in the area of the fuel and energy warehouse was investigated. Tests of the biopreparation for the cleaning of soils contaminated with petroleum products were carried out on the basis of the East branch of LLP «Fuel and Energy Complex – Kazakhstan» in Taraz. The preparation contains the following oil-oxidizing bacteria: Rhodococcus erythropolis DN-1, Bacillus amyloliquefaciens I-15 and Serratia marcescens H3K. Within 3 months, the complex bioremediation of the soil using the preparation at the final stage of purification resulted in the decrease of the hydrocarbon content by 82,0%. Thus, according to the results of tests conducted by the preparation «Enoil», it can be concluded that this preparation can effectively neutralize oil products in the soil.

Keywords: oil pollution, biopreparation, hydrocarbon oxidizing microorganisms, bioremediation

Разработка средств очистки почвы от нефтяных углеводородов является активно развивающимся направлением экологии и биотехнологии. На современном уровне развития нефтегазового комплекса не представляется возможным полностью исключить его негативное воздействие на окружающую среду. Проблема очистки окружающей среды от нефтяного загрязнения приобретает все большую остроту в связи с ограниченностью возможностей, а иногда и экологического вреда применяемых для этих целей механических и физико-химических способов очистки [1, 2]. Решение проблемы защиты окружающей среды, в первую очередь почв, состоит в активизации потенциала самоочищения почв и интродукции активных штаммов микроорганизмов – деструкторов нефти в виде биопрепаратов. В настоящее время наиболее перспективным методом для очистки нефтезагрязненных почв, как в экономическом, так и в экологическом плане, является биотехнологический метод, основанный на использовании различных групп микроорганизмов, отличающихся повышенной способностью к биодеградации компонентов нефти и нефтепродуктов [3, 4]. Способность к утилизации ксенобиотики обеспечивается наличием у микроорганизмов специфических ферментных систем, осуществляющих катаболизм таких соединений.

Искусственное внесение (интродукция) чистых или смешанных культур УОМ в загрязненную среду и создание благоприятных условий для их развития позволяет

сократить сроки биоремедиации в пять и более раз [5].

Целью исследования являлась оценка эффективности применения биологического препарата «Энойл» на основе психротрофных нефтеокисляющих микроорганизмов в процессе деградации нефтепродуктов в почве в полевых условиях.

Материалы и методы исследования

Методика отбора почвенных образцов на химический анализ. Отбор проб почвы для определения содержания нефти проводили на выбранной площадке, на глубине 20–25 см. Отбирали 5 проб, взятых по методу «конверта» (по углам площадки и в центре), освобождали от различных включений и перемешивали. Затем методом квартования отбирали 1,0–1,5 кг почвы в полиэтиленовый мешок. Пробу упаковывали, маркировали.

Подготовка проб почвы к гравиметрическому анализу. Образцы отобранных почв высушивали до воздушно-сухого состояния. После высушивания пробу пересеивали через сито с размером отверстий 1 мм. Просеянную пробу почвы помещали на лист чистой бумаги, перемешивали и распределяли ровным слоем, толщиной около 0,5 см, делили на квадраты площадью 3×3 см и из каждого квадрата брали шпателем небольшое количество почвы, захватывая ее на всю глубину слоя, примерно около 5 г. Высушенные воздушно-сухие образцы почвы размельчали в агатовой ступке до пудрообразного состояния и хранили в пакетах из вощеной бумаги.

Определение содержания нефти в почве проводили гравиметрическим методом [6]. Сущность весового метода заключается в экстракции эмульгированных и растворенных нефтепродуктов из почвы хлороформом. Навеску помещали в колбу емкостью 150–250 мл, заливали хлороформом до влажного состояния. Затем несколько раз проводили экстракцию хлороформом до получения в последних порциях бесцветного экстракта. Полученную хлороформенную вытяжку выпаривали на водяной бане или в вытяжном шкафу. После испарения осадок хлороформа переносили в колонку, заполненную послойно стекловатой (1 см). В колонку добавляли 3–5 см^3 гексана. Под носик колонки помещали заранее взвешенный стакан вместимостью 50 см^3.

Оставшийся в стакане после испарения хлороформа осадок растворяли в 5–10 см^3 гексана и проводили фильтрацию. Гексан испаряли при комнатной температуре. Стакан с оставшейся взвесью взвешивали до получения постоянной массы. Содержание нефтепродуктов (мг/кг) вычисляли по формуле

$$X = A/B \times 1000, \quad (1)$$

где A – количество нефтепродуктов, мг;
B – навеска почвы, г;
1000 – коэффициент перерасчета на кг почвы.

Результаты исследования и их обсуждение

Биоремедиационные работы по очистке почв, загрязненных нефтепродуктами, проводили с использованием разработанного нами ранее биологического препарата «Энойл», предназначенного для биодеградации нефтепродуктов при низких температурах. Препарат представляет концентрированную биомассу, полученную на основе микробной ассоциации с титром клеток 11,0 lgКОЕ/см^3. В качестве нефтеокисляющих бактерий препарат содержит штаммы бактерий, выделенных из нефтезагрязненных почв Западного Казахстана и сточных вод: *Rhodococcus erythropolis* ДН-1, *Bacillus amyloliquefaciens* И-15 и *Serratia marcescens* H_3К. На базе испытательной лаборатории ТОО «Нутритест» Казахской академии питания проведены токсиколого-гигиенические исследования штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов. По результатам исследований штаммы, входящие в состав биопрепарата, не патогенны, не токсичны и не токсигенны.

Испытания биопрепарата по очистке почв, загрязненных нефтепродуктами, проводили на базе Восточного филиала ТОО «Топливно-энергетический комплекс – Казахстан» в г. Тараз.

«Топливно-энергетический комплекс – Казахстан» – крупная сеть топливных баз в Казахстане, оказывающая услуги по хранению и перевалке дизельного топлива, бензина, мазута, печного топлива, сыпучих грузов, а также по реализации и хранению масел и смазок. Постановка полевого опыта включала несколько этапов:

1) оценка степени загрязненности нефтепродуктами выбранных участков,
2) обработка препаратом,
3) проведение контрольных замеров на содержание остаточных нефтепродуктов в почве.

Для закладки полевого опыта по биоремедиации нефтезагрязненной почвы был проведен осмотр территории и замерена площадь и глубина загрязнения. Экспериментальная площадка была разделена на 2 участка, подвергающихся регулярным и разовым розливам нефтепродуктов. Проводили отбор и подготовку образцов для проведения химического анализа с целью определения содержания нефтепродуктов. Перед началом проведения работ почву перекапывали на глубину 10–15 см. На одном из участков, загрязненных нефтепродуктами, вынимали почвенный грунт глубиной более 1,5 м.

С целью восстановления биопрепарата в полевых условиях использовали емкости вместимостью 200 литров, которые заполнялись водопроводной водой с питательной средой. В питательную среду вносили дизельное топливо в качестве источника углерода и энергии и концентрированный биопрепарат с титром клеток 10^{10} КОЕ/мл. Смесь перемешивали до однородной консистенции, подачу воздуха осуществля-

ли с помощью компрессора. Биопрепарат восстанавливали в течение 48 часов, при постоянном перемешивании при температуре ~ 25–28 °С (рис. 1). Конечный объем полученного рабочего раствора составил приблизительно 600 л.

Полученный объем биопрепарата разводили водой в соотношении 1:4. Непосредственно после приготовления рабочего раствора биопрепарата проводили обработку почвы загрязненной нефтепродуктами из расчета 5 л разведенного препарата с титром клеток 10^9 lgКОЕ/г на 1 $м^3$ обрабатываемой поверхности. Почву увлажняли, перемешивали.

Для оптимизации соотношения углерода (С) и азота (N), нарушенного вследствие загрязнения углеводородами, в почву вносили минеральное удобрение нитроаммофоску в соотношении 100:10, что оказывает благоприятное влияние для нормального роста и развития нефтеокисляющих микроорганизмов в загрязненной среде.

После обработки биопрепаратом проводили рыхление и увлажнение почвы. В качестве контроля использовали почву, загрязненную нефтепродуктами без внесения препарата. Препарат вносили на загрязненные участки в таком количестве, чтобы численность УОМ составила не менее 10^6 клеток/г почвы. Через 4 месяца отбирали пробы почв для анализа нефтеокисляющей активности биопрепарата.

При анализе почвенных проб было выявлено, что на исследуемых участках загрязнение нефтепродуктами составило: участок № 1 – 1,93 г/кг, участок № 2 – 3,54 г/кг.

Изучение динамики деструкции углеводородов на загрязненных участках показало, что через 4 месяца после начала эксперимента уровень деструкции нефти препаратом «Энойл» на первом участке составил 76,2 %, а на втором – 82 %. Результаты исследований приведены в таблице и на рис. 2.

1 сутки *2 сутки* *5 сутки*

Рис. 1. Восстановление биопрепарата

до *после*

Рис. 2. Участок, загрязненный нефтепродуктами до и после обработки биопрепаратом

Уровень деструкции нефтепродуктов в почве после внесения биопрепарата

Наименование пробы	Содержание нефтепродуктов в почве, г/кг		Степень утилизации нефтепродуктов в почве после обработки препаратом, %
	Исходное загрязнение	через 4 месяца	
Участок 1	1,93 ± 0,23	0,46 ± 0,16	76,2%
Участок 2	3,54 ± 0,20	0,64 ± 0,04	82%

Данные таблицы показывают высокую эффективность биопрепарата как деструктора нефтепродуктов в почве. Степень утилизации нефтепродуктов при низких температурах после обработки нефтезагрязненной почвы биопрепаратом составила от 76,2% до 82%.

Заключение

Таким образом, по результатам проведенных испытаний препарата «Энойл» можно сделать вывод о том, что данный препарат может эффективно нейтрализовать нефтепродукты в почве. В течение 4 месяцев комплексная биоремедиация почвы с использованием препарата на завершающем этапе очистки привела к уменьшению содержания углеводородов на 82,0%. Применение препарата позволяет ускорить процесс естественной регенерации загрязненных территорий.

Список литературы

1. Белоусова Н.И., Шкидченко А.Н. Деструкция нефтепродуктов различной степени конденсации микроорганизмами при пониженных температурах // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – № 3. – С. 312–316.

2. Boronin A.M., Filonov A.E., Kosheleval L.A., Shkidchenko A.N., Gafarov A.B., Sokolov S.L., Puntus I.F., Grishchenkov V.G., Dmitriev V.V., Arinbasarov M.U. Bioremediation of land oil spills: diversity of microorganisms degrading oil hydrocarbons // 2002 WIT Press, Ashurst Lodge, Southampton, SO40 7AA, UK. – 2002. – 9 p. available on https://www.witpress.com/Secure/elibrary/papers/OIL02/OIL02015FU.pdf.

3. Кобзев Е.Н., Петрикевич С.Б., Шкидченко А.Н. Исследование устойчивости ассоциации микроорганизмов – нефтедеструкторов в открытой системе // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т. 37, № 4. – С. 413–417.

4. Артемьева Т.И. Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. – М.: Наука, 1988. – 254 с.

5. Ногина Т.М., Думанская Т.У., Хоменко Л.А., Подгорский В.С. Микробиол. журнал, 2012. – Т. 74, № 6. – С. 29–32.

6. ПНД Ф 16.1.41-04 Методические указания по выполнению измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах почв гравиметрическим методом. – М., 2004. – 6 с.