

На правах рукописи

Л. А. Нурутдинова

Нуртдинова Лариса Амирхановна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ РЕМЕДИАЦИИ
НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПРИРОДНЫХ ОБЪЕКТОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОПРЕПАРАТА «ЛЕНОЙЛ»**

03.00.23 – биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Уфа – 2005

Работа выполнена в Институте биологии Уфимского научного центра РАН и в ЮганскНИПИнефти в рамках темы «Ферменты и метаболиты почвенных и ризосферных микроорганизмов» (ГР № 01200210612)

Научный руководитель: доктор биологических наук
Логинов Олег Николаевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор
Киреева Наиля Ахняфовна

доктор биологических наук, профессор
Гоготов Иван Николаевич

Ведущая организация: Институт экологии и генетики
микроорганизмов Пермского научного
центра УрО РАН

Защита состоится 27 декабря 2005 г. в 10⁰⁰ часов на заседании Диссертационного Совета КМ 002.136.01 при Институте биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г.Уфа, Проспект Октября, 69.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г.Уфа, Проспект Октября, 69.

Автореферат разослан «26 » ноября 2005 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат биологических наук



R.B.Уразгильдин

2006-4
27398

2250314

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Среди высокотоксичных загрязнителей окружающей среды выделяются нефтепромысловые поллютанты (нефть и продукты ее переработки, нефтяные шламы и т.д.). Наиболее перспективным направлением биоремедиации нефтезагрязненных объектов является применение биологического метода, основанного на использовании биопрепараторов, позволяющих ускорить разложение нефти и нефтепродуктов, не нанося дополнительного ущерба нарушенной экосистеме. На сегодняшний день разработаны и производятся различные биопрепараторы, предназначенные для ремедиации природных объектов от последствий загрязнения нефтью и нефтепродуктами. В Институте биологии Уфимского научного центра РАН разработан и запатентован в Российской Федерации новый высокоэффективный биопрепаратор «Ленойл», созданный на основе консорциума нефтеокисляющих микроорганизмов *Bacillus brevis* и *Arthrobacter spesies* (Пат. RU № 2232806). Исследование применимости биопрепарата «Ленойл» в процессах биологической рекультивации почв, содержащих нефть или нефтепродукты, и очистки водных объектов от нефтяного загрязнения является актуальной проблемой.

Цель исследования. Исследование возможности использования биопрепарата «Ленойл» для ремедиации нефтезагрязненных почв и водных объектов.

Задачи исследования.

1. Определить спектр окислительной активности консорциума микроорганизмов биопрепарата «Ленойл» и чистых культур микроорганизмов, входящих в его состав, в отношении различных классов углеводородов.
2. Определить эффективность использования биопрепарата «Ленойл» для биологической рекультивации почв, загрязненных нефтью.
3. Провести сравнительную оценку эффективности биопрепарата «Ленойл» относительно известных коммерческих биопрепараторов для очистки нефтезагрязненных почв.
4. Разработать технологию биологической рекультивации техногенного отхода – отработанной отбеливающей земли, содержащей нефтепродукты, с использованием биопрепарата «Ленойл».
5. Разработать способ очистки водных поверхностей от нефтяного загрязнения, основанный на использовании биопрепарата «Ленойл».

РОС. НАЦИОНАЛЬНАЯ
БИБЛИОТЕКА
С.Петербург
98 100 183
98 100 183

Научная новизна. Разработан новый способ очистки водных поверхностей от нефтяного загрязнения, основанный на использовании биопрепарата «Ленойл».

Определены величины окислительной активности консорциума микроорганизмов биопрепарата «Ленойл» и чистых культур микроорганизмов, входящих в его состав, по отношению к нефти и продуктам ее переработки, индивидуальным углеводородам и жирам растительного и животного происхождения.

Практическая значимость. Доказана высокая эффективность использования биопрепарата «Ленойл» для биологической рекультивации различных почв и грунтов, загрязненных нефтью, и очистки водных поверхностей от нефтяного загрязнения.

Апробация работы. Основные результаты исследований были представлены на I Международном Конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2002), научно-практической конференции «Теоретические и практические вопросы мониторинга, предупреждения, ликвидации и рекультивации последствий нефтяного загрязнения» (Ханты-Мансийск, 2003), конференции НТО нефтяников и газовиков им. И.М. Губкина «Охрана окружающей среды при освоении углеводородных ресурсов» (Сочи, 2003), XVII Международной научно-технической конференции «Химические реагенты, реактивы и процессы малотоннажной химии» (Уфа, 2004).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе патент Российской Федерации.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, экспериментальной части (3 главы), выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Работа изложена на 99 страницах, содержит 21 таблицу и 3 рисунка. Список использованной литературы включает 151 наименование, из них 120 на русском языке.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность за неоценимую помощь и поддержку при выполнении работы сотрудникам Института биологии УНЦ РАН с.н.с., к.т.н. Н.Н. Силищеву, с.н.с., к.б.н. Т.Ф. Бойко, зав. контрольно-аналитической лабораторией, к.б.н. С.П. Четверикову.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследований являлся биопрепарат «Ленойл». Основу биопрепарата составляет консорциум нефтеокисляющих микроорганизмов *Bacillus brevis* и *Arthrobacter species* ИБ ДТ-5, выделенный в Институте биологии Уфимского научного центра РАН. Промышленное производство биопрепарата «Ленойл» осуществляется на ГУП «Опытный завод Академии наук Республики Башкортостан» в соответствии с техническими условиями ТУ 9291-016-22657427-2002.

В работе использовались как промышленные образцы биопрепарата «Ленойл», так и полученные в лабораторных условиях. Биомассу консорциума бактерий *Bacillus brevis* и *Arthrobacter species* ИБ ДТ-5 получали культивированием на жидкой среде Раймонда (Егоров, 1976) следующего состава, г/л: Na_2CO_3 – 0,1; CaCl_2 – 0,01; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; NaH_2PO_4 – 1,5; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; NH_4NO_3 – 2,0; дрожжевой автолизат – 1,0; источником углерода служило дизельное топливо – 1%; вода дистиллированная – до 1 л.

Окислительную активность консорциума в целом, а также микроорганизмов, входящих в его состав, определяли по конечному продукту окисления, т.е. по выделению углекислого газа.

Культивирование микроорганизмов проводили в колбах объемом 500 мл. В качестве питательной среды использовали 250 мл среды Диановой-Ворошиловой для углеводородокисляющих бактерий с добавлением 1% (2,5 мл) источника углерода и 5 мл трехсуточной культуры консорциума (или чистой культуры микроорганизмов, входящих в состав консорциума) с содержанием клеток $1,0 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. С помощью дозатора-компрессора со скоростью 520 мл/мин в герметично закрытые колбы подавали стерильный атмосферный воздух. Аэрируемый воздух, прошедший через колбу с микроорганизмами, окисляющим нефтепродукты, улавливали поглотителем углекислого газа, в качестве которого использовали 200 мл 0,1 н. NaOH . Из колб с поглотителем посухоточно отбирали аликвоту 10 мл и оттитровывали 0,1 н. HCl . Окислительную активность определяли по количеству образованного углекислого газа, оттитрованного кислотой.

В экспериментах при тех же условиях был использован контрольный образец – с реактивами, нефтепродуктами, но без микроорганизмов. Длительность эксперимента составляла 3 суток.

В лабораторном модельном эксперименте изучали процессы биодеградации нефти и возможность биологической рекультивации чернозема выщелоченного: гумус по Тюрину – 8,40%, азот (валовой) – 0,60%, P_2O_5 (по Чирикову) – 4,39 мг/100 г почвы, Нr (по Каппену) – 9,30 мг·экв/100 г почвы, поглощенный кальций и магний (по Каппену-Гильковицу) 28,5 и 8,2 мг·экв/100 г почвы, соответственно, рН солевой 5,85, рН водный 6,46, С:N – 8, загрязненного сырой нефтью Арланского месторождения (плотность 883-891 кг/м³), содержание воды (мас.%) – 1-4; солей (мг/л) – до 4000; серы (мас.%) – 2,3; парафина (мас.%) – 3; смол (мас.%) – 35,5; асфальтенов (мас.%) – 6-11; H_2S – 3,5 и торфа Сингапайского (даные «Юграпромторф»): влажность (%) – 55; зольность (%) – до 33; степень разложения (%) – до 45; рН – 4,4; гуминовых кислот (мас.%) – 31, загрязненного сырой нефтью Правдинского месторождения (АО «Юганскнефтегаз») (плотность 871-891 кг/м³), содержание: воды (мас.%) 0,5-5; солей (мг/л) – до 600; серы (мас.%) – 1,3; парафина (мас.%) – 3,3; смол (мас.%) – 8,5; асфальтенов (мас.%) – 5-9; H_2S (мг/л) – 1,7.

В сосуды с 10 кг тщательно перемешанных чернозема или торфа вносили нефть из расчета 10, 20, 30 мас.% и биопрепараты с титром 2,0·10⁶ КОЕ/мл.

Для создания оптимальных условий жизнедеятельности микроорганизмов вносили азотно-фосфорные минеральные удобрения (из расчета 0,25 г/кг почвы или торфа). Образцы инкубировали при комнатной температуре 20⁰С±2⁰С в течение 60 суток. Влажность в сосудах в течение всего срока опыта поддерживали на уровне 60% полной влагоемкости.

Численность основных групп микроорганизмов, участвующих в биотрансформации нефти и нефтепродуктов, определяли посевом почвенной суспензии на элективных питательных средах. Численность углеводородокисляющих микроорганизмов учитывали на минеральной среде Цука-муры с нефтью в качестве единственного источника углерода (Сэги, 1983), бактерий, усваивающих органический азот – на мясо-пептонном агаре (Звягинцев, 1980).

Содержание нефтепродуктов определяли весовым методом после экстракции углеводородов из навески почвы или торфа гексаном на аппарате Сокслета (Богомолов, 1984) или спектрофотометрическим методом (Груздякова, 1993). Структурный состав нефтепродуктов определяли методом газовой хроматографии с масс-селективным электродом (Хмельницкий, Бродский, 1990). Анализ почвенных экстрактов проводили на хромато-масс-спектрометрической системе, включающей газовый хроматограф НР-5890 и масс-селективный детектор НР-6890.

Для наблюдения за процессом биодеградации образцы анализировали через 15, 30, 45 и 60 суток.

Производственные испытания различных вариантов предложенной технологии биологической рекультивации отработанной отбеливающей земли осуществлены в 2003–2004 гг. на отвалах ОАО «Орскнефтеоргсинтез». На выбранных участках общей площадью 20000 м² (2003 г.) и 15000 м² (2004 г.) слоем 50 см была отсыпана отработанная отбеливающая земля, по краям устроена обваловка. С целью увеличения содержания в грунте доступного кислорода был применен оксигенный реагент – 3%-ная перекись водорода в количестве 1,3 л/м². С мая месяца четырежды за сезон участки обрабатывали биопрепаратором «Ленойл» с титром живых клеток микроорганизмов 10⁸ КОЕ/мл из расчета 10 литров на 1 м² поверхности. Для активизации микробного разложения углеводородов грунт ежемесячно рыхлили, поливали, вносили минеральные удобрения. Поскольку утилизация полиароматических соединений микроорганизмами может идти за счет процесса соокисления с органическими веществами (Pothuluri et al., 1992), в качестве удобрений были также использованы органические отходы – меласса и автолизат отработанных пивных дрожжей (0,05 кг/м²).

Лабораторные эксперименты по оценке эффективности способа очистки воды от нефтяного загрязнения заключались в следующем. В резервуар, представляющий собой стеклянный сосуд прямоугольной формы объемом 10 л, наливали водопроводную воду в объеме 6 л, сырую нефть Правдинского месторождения (или товарное дизельное топливо) в объеме 0,5 л и суспензию микроорганизмов биопрепарата «Ленойл» с титром 1,2·10⁸ КОЕ/мл в объеме 200 мл. Аэрация в резервуаре обеспечивалась лабораторным перистальтическим насосом, при

этом входной патрубок насоса для принудительного забора воды находится ниже уровня нефтяной пленки, а выходной патрубок с резиновой трубкой, снабженной перфорированными отверстиями для распределения откачиваемой из резервуара воды, – над поверхностью нефтяной пленки. Эксперименты проводили при температуре 20°С.

Статистическую обработку результатов проводили, используя t-критерий Стьюдента на 5% уровне значимости. Данные, полученные в опытах, были обработаны на персональном компьютере с помощью программы Excel-2002.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. ИССЛЕДОВАНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ БИОПРЕПАРАТА «ЛЕНОЙЛ»

Целью исследований являлось изучение спектра окислительной способности в отношении нефти и продуктов ее переработки, а также жиров растительного и животного происхождения как под воздействием биопрепарата «Ленойл», так и под воздействием составляющих этот консорциум микроорганизмов в отдельности.

В работе использовали промышленный образец биопрепарата «Ленойл», соответствующий ТУ 9291-016-22657427-2002, полученный при культивировании консорциума микроорганизмов *Bacillus brevis* и *Arthrobacter species* ИБ ДТ-5 в ферментере объемом 6 м³.

Результаты определения окислительной активности консорциума микроорганизмов биопрепарата «Ленойл», а также индивидуальных штаммов бактерий *Bacillus brevis* ИБ ДТ 5-1 и *Arthrobacter species* ИБ ДТ 5-3, входящих в состав консорциума, по отношению к индивидуальным углеводородам парафинового ряда (гептан, декан, ундекан, додекан), нафтеновым углеводородам (циклогексан), ароматическим углеводородам (бензол, толуол, о-ксилол, нафталин), нефти и нефтяным фракциям (дизельное топливо, базовое смазочное масло, парафин, церизин), к некоторым окисленным углеводородам (изопропиловый спирт, гексадеканол, фенол) и жирам растительного и животного происхождения приведены в табл. 1. Как следует из

Таблица 1

Окислительная активность микроорганизмов консорциума «Ленойл»

Субстрат	Окислительная активность, мг СО ₂ /г субстрата		
	<i>Arthrobacter sp</i>	<i>Bacillus brevis</i>	«Ленойл»
Гептан	77	113	170
Декан	33	104	140
Ундекан	94	161	175
Додекан	116	153	181
Парафин	11	127	177
Церизин	14	18	21
Гексадеканол	91	215	219
Фенол	36	30	43
Циклогексан	99	90	110
Бензол	85	69	96
Толуол	93	81	89
o-Ксиол	76	92	100
Нафталин	88	53	92
Изопропиловый спирт	62	71	89
Нефть	84	112	144
Дизельное топливо	60	138	163
Смазочное масло	99	104	120
Жир говяжий	148	173	176
Жир свиной	63	172	170
Масло растительное	104	116	128

представленных данных, окислительной способностью по отношению к углеводородам различного химического строения обладают в определенной степени оба штамма бактерий. Величина окислительной активности консорциума микроорганизмов превосходит аналогичный показатель для изолированных чистых культур штаммов бактерий, входящих в состав консорциума. При этом и окислительная активность штамма *Bacillus brevis* отличается более высоким значением, чем у штамма *Arthrobacter sp.*, и является, очевидно, определяющей величиной для всего консорциума в целом. Исключение составляют углеводороды циклической структуры (бензол, толуол, нафталин, циклогексан) – в этих случаях окислительная активность штамма *Arthrobacter sp.* является превалирующей величиной, превышающей по своему значению аналогичный показатель для *Bacillus brevis*.

Окисление микроорганизмами различных углеводородов связывается с наличием у них ферментной оксигеназной системы, позволяющей им включать молекулярный кислород непосредственно в углеводород, образуя при этом окисленные соединения (Голубовская, 1978). В связи с этим можно предположить, что ферментативные системы микроорганизмов, входящих в состав консорциума, содержат оксигеназы; при этом оксигеназная система штамма *Bacillus brevis* более специфична для линейных углеводородов (рис. 1, б), а оксигеназная система штамма *Arthrobacter sp.* – для циклических углеводородов (рис. 1, а, в).

При биохимическом окислении таких субстратов, как нефть и нефтяные фракции, содержащих в своем составе сложные смеси углеводородов различных классов, окислительная активность консорциума микроорганизмов значительно превосходит эту характеристику для каждого из штаммов микроорганизмов, входящих в его состав (рис. 1, г).

Биопрепарат «Ленойл» и микроорганизмы, входящие в его состав, способны окислять и различные жиры животного и растительного происхождения (табл. 1).

Таким образом, показано, что биопрепарат «Ленойл» обладает способностью к окислению широкого спектра углеводородов как в консорциуме, так и его составляющими, причем наибольшие величины окислительной активности приходятся на консорциум. Результаты исследований

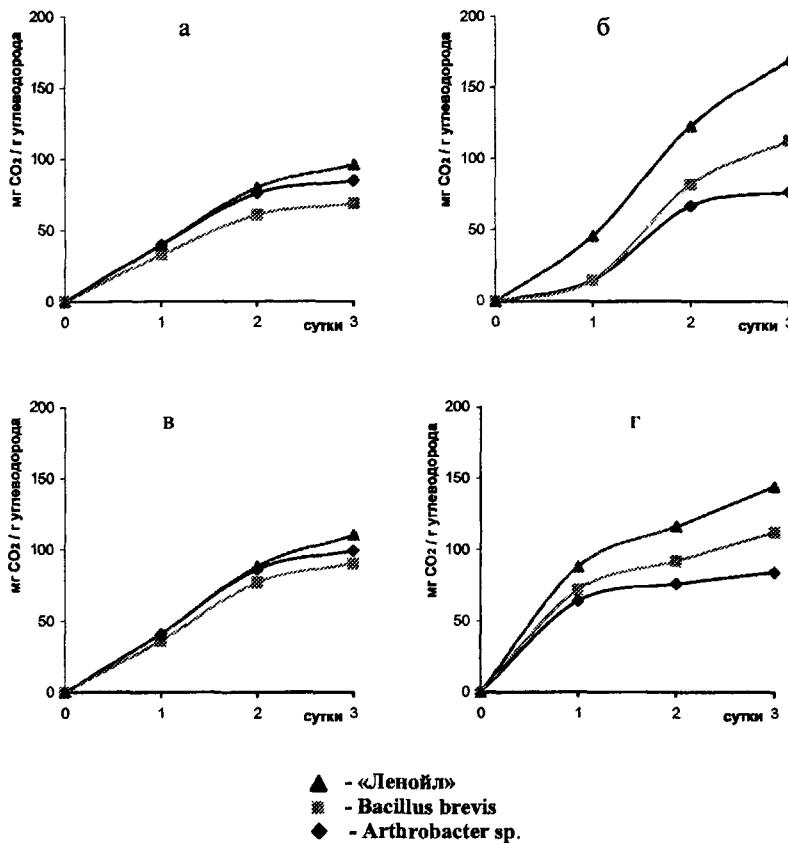


Рис. 1. Динамика окисления отдельных классов углеводородов микроорганизмами консорциума «Ленойл»:

- а) ароматических углеводородов
- б) парафиновых углеводородов
- в) нафтеновых углеводородов
- г) нефти и смазочных масел

подтверждают данные о том, что бактериальные ассоциации, в отличие от биопрепаратов, содержащих отдельные штаммы, более эффективно утилизируют нефть и нефтепродукты.

2. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ БИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ, ГРУНТОВ И ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЬЮ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОПРЕПАРАТА «ЛЕНОЙЛ»

В модельном эксперименте проведена сравнительная оценка эффективности биопрепарата «Ленойл» относительно других коммерческих биопрепаратов для очистки нефтезагрязненных почв. В качестве последних использованы «Деворойл» – консорциум нефтеокисляющих микроорганизмов pp. *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и *Yarovvia*, «Дестройл» – чистая культура нефтеокисляющих микроорганизмов р. *Acinetobacter* и «Бацис-пепцин» – биопрепарат на основе штамма *Bacillus* sp. 739.

Анализ микрофлоры чернозема выщелоченного, проведенный перед загрязнением почвы нефтью, показал, что доля аборигенных углеводородокисляющих микроорганизмов в составе микробиоценоза невелика и характеризуется величиной $2 \cdot 10^3$ КОЕ/г почвы. Численность гетеротрофных микроорганизмов в почве до внесения биопрепаратов составляла $697 \cdot 10^6$ КОЕ/г. Внесение нефти привело к существенному уменьшению численности гетеротрофных микроорганизмов во всех вариантах эксперимента в первые 15 суток инкубации. В целом динамика изменений гетеротрофных бактерий характеризовалась постепенным восстановлением их численности к концу инкубации до уровня, определенного в чистой почве. Если при 10% загрязнении применение «Деворойла», «Ленойла» и «Дестройла» способствовало процессу восстановления численности гетеротрофных бактерий, то при 20% уровне нефтяного загрязнения аналогичная картина наблюдается только при использовании «Деворойла» и «Ленойла». При максимальной концентрации загрязнителя ни один из применяемых препаратов не обеспечивал восстановления численности гетеротрофных микроорганизмов.

Доля углеводородокисляющей микрофлоры возрастила на протяжении всего эксперимента, причем при 10% уровне загрязнения увеличи-

чение численности было существенным в варианте с использованием «Деворойла», «Ленойла» и «Дестройла». Высокие дозы нефти оказывали более выраженное токсическое влияние как на интродуцированные, так и аборигенные углеводородокисляющие микроорганизмы. Тем не менее к концу инкубации в вариантах с применением «Деворойла» и «Ленойла» численность углеводородокисляющей микрофлоры при 10 и 20% уровне загрязнения была сопоставима с величиной, характеризующей общую численность гетеротрофных микроорганизмов. Очевидно, возрастание доли углеводородокисляющих микроорганизмов происходило, с одной стороны, за счет микроорганизмов, входящих в состав препаратов, а с другой стороны, за счет переориентации метabolизма ряда аборигенных микроорганизмов на утилизацию углеводородов нефти. В варианте с внесением «Бациспекции» также наблюдалось возрастание количества углеводородокисляющих микроорганизмов, однако их численность оставалась на более низком уровне, чем при использовании других биопрепаратов. При загрязнении максимальной дозой поллютанта количество углеводородокисляющих микроорганизмов во всех исследуемых вариантах эксперимента находилось на более низком уровне.

Изучение динамики численности гетеротрофных микроорганизмов в торфе, величина которых до внесения биопрепаратов составляла $446 \cdot 10^6$ КОЕ/г, показало, что загрязнение нефтью привело к значительному снижению их количества во всех вариантах опыта. Возрастание активности гетеротрофных микроорганизмов отмечено к 60 суткам инкубации при 10% уровне загрязнения торфа в варианте с «Деворойлом» и «Ленойлом». Следует отметить, что в отличие от загрязненной почвы, в торфе лишь биопрепарат «Ленойл» при 20% уровне загрязнения снимал токсическое действие поллютанта. Внесение «Ленойла» в этом варианте эксперимента привело к увеличению численности гетеротрофов почти вдвое от их количества в незагрязненном торфе.

Для биопрепаратов, содержащих нефтеокисляющие бактерии, характерно существенное увеличение к концу эксперимента количества углеводородокисляющих микроорганизмов. Наибольшая численность углеводородокисляющих микроорганизмов была зарегистрирована при 10% уровне загрязнения торфа в варианте с биопрепаратором «Ленойл».

Таблица 2

Скорость деградации нефти в почве при различных уровнях загрязнения

Степень загрязнения, %	«Деворойл»	«Ленойл»				«Дестройл»				«Бациспецин»							
		сутки		сутки		сутки		сутки		сутки		сутки		сутки			
		15	30	45	60	15	30	45	60	15	30	45	60	15	30	45	60
Остаточное содержание нефти, г/кг	10	37,6	29,1	26,1	19,4	42,4	31,2	21,0	14,7	45,9	28,3	27,4	27,1	71,2	58,4	43,2	36,7
	20	135	110	90,6	76,4	138	99,7	89,4	59,7	141	109	97,5	87,2	168	137	110	104
	30	261	224	198	176	269	216	187	156	263	249	235	220	288	259	229	205
Скорость биодеградации, (г/кг/сутки)	10	4,16	0,57	0,2	0,45	3,8	0,75	0,68	0,42	3,6	1,17	0,06	0,02	1,9	0,85	1,01	0,43
	20	4,33	1,67	1,29	0,95	4,13	2,55	0,69	1,98	3,93	2,13	0,77	0,69	2,13	2,07	1,8	0,4
	30	2,6	2,46	1,73	1,47	2,07	3,53	1,93	2,07	2,47	0,93	0,93	1,0	0,8	1,93	2,06	1,6

Таблица 3

Скорость деградации нефти в торфе при различных уровнях загрязнения

Степень загрязнения, %	«Деворойл»	«Ленойл»				«Дестройл»				«Бациспецин»							
		сутки		сутки		сутки		сутки		сутки		сутки		сутки			
		15	30	45	60	15	30	45	60	15	30	45	60	15	30	45	60
Остаточное содержание нефти, г/кг	10	39,6	30,7	28,0	20,4	46,8	23,2	19,9	15,7	44,6	28,1	28,0	27,0	76,2,	64,5	51,7	42,2
	20	146	98,6	89,4	81,2	158	101	88,4	66,2	158	110	96,2	82,2	187	170	148	124
	30	261	231	210	198	275	220	191	165	264	253	239	229	291	267	239	210
Скорость биодеградации (г/кг/сутки)	10	4,0	0,59	0,18	0,51	3,54	1,57	0,22	0,28	3,69	1,10	0,007	0,07	1,59	0,78	0,85	0,63
	20	3,60	3,16	0,61	0,55	2,80	3,80	0,84	1,48	2,80	3,20	0,92	0,93	0,87	1,13	1,47	1,60
	30	2,60	2,00	1,40	0,80	1,67	3,67	1,93	1,73	2,40	0,73	0,93	0,67	0,60	1,60	1,87	1,93

В табл. 2 представлены результаты определения хода деградации нефти в черноземе выщелоченном. Максимальная скорость утилизации углеводородов была отмечена в первые 15 суток эксперимента во всех вариантах опыта. Исключение составили вариант при загрязнении высокой дозой нефти (30%) и использовании препаратов «Ленойл» и «Бациспедин», в первом случае максимум утилизации приходился на 30-е сутки, во втором – на 45-е сутки. Динамика скорости деградации углеводородов несколько различалась в разных вариантах опыта и зависела как от концентрации нефти, так и от вида препарата.

Наибольшая скорость деградации нефти в торфе, так же как и в почве, наблюдалась через 15 суток инкубации для всех биопрепаратов (табл. 3). Следует отметить, что только «Бациспедин» обеспечивал возрастаение скорости деградации в течение всего срока наблюдений при среднем и максимальном уровнях загрязнения торфа.

По эффективности разложения нефти при 10 и 20% уровнях загрязнения как в черноземе выщелоченном, так и в торфе препараты располагаются в одинаковом порядке: «Ленойл», «Деворойл», «Дестройл», «Бациспедин». При 30% загрязнении чернозема выщелоченного по уменьшению эффективности разложения нефти препараты располагаются следующим образом: «Ленойл», «Бациспедин», «Дестройл», «Деворойл»; а в торфе – «Ленойл», «Деворойл», «Бациспедин», «Дестройл».

Таким образом, исследования, проведенные в модельных условиях, показали, что биопрепараты, содержащие ассоциации микроорганизмов («Деворойл», «Ленойл»), способны адаптироваться к высоким дозам нефти и эффективно утилизировать субстрат независимо от типа почв и особенностей загрязнителя. Биопрепараты – монокультуры («Бациспедин», «Дестройл»), очевидно, целесообразно использовать при концентрациях поллютантов не более 10%.

Производственные испытания различных вариантов технологии биологической рекультивации отработанной отбеливающей земли с использованием биопрепарата «Ленойл» осуществлены в 2003–2004 гг. на отвалах ОАО «Орскнефтеоргсинтез».

Проведение комплекса рекультивационных мероприятий, предусмотренных различными вариантами технологии биологической очистки отработанной отбеливающей земли, позволило значительно снизить оста-

точное содержание углеводородов в грунте. Применение в 2003 году биопрепарата «Ленойл» на фоне минеральных удобрений снизило остаточное содержание углеводородов в грунте за четыре месяца на менее загрязненных участках в 3,5 раза и в 3,9 раз по сравнению с началом летнего сезона (табл. 4). Применение биопрепарата «Ленойл» показало хорошие результаты и в процессе рекультивации относительно сильно загрязненного грунта (содержание углеводородов около 25 мас.%), позволив снизить их концентрацию в 1,8 раз.

Дополнительное внесение на рекультивируемый участок активного ила позволило ускорить процесс разложения нефтепродуктов в начальный период. В первые месяцы вегетационного сезона темпы удаления нефтепродуктов из отработанной отбеливающей земли, смешанной с активным илом, были выше, чем на участках, обработанных только биопрепаратором «Ленойл», возможно, потому, что взаимодействие микроорганизмов активного ила с углеводородами в грунте началось раньше, а их большое разнообразие позволяло быстрее утилизировать промежуточные продукты разложения.

Для активизации процессов окисления углеводородов в загрязненной отбеливающей земле, содержащей их более 20 мас.%, в схему рекультивационных мероприятий 2004 года было введено применение оксигенного реагента – перекиси водорода и увеличена частота внесения биопрепарата для поддержания более высокого титра углеводородокисляющих микроорганизмов в грунте. Последний вариант технологии биологической рекультивации отбеливающей земли продемонстрировал в 2004 году достаточно высокую эффективность. За вегетационный сезон разложению подверглось 60,9 мас.% содержащихся в грунте нефтепродуктов, тогда как в 2003 году (до использования оксигенных соединений) удавалось достигнуть только 44,5 мас.% их деструкции.

Наибольшая скорость разложения углеводородов в отбеливающей земле наблюдалась в процессе проведения производственных испытаний в конце лета – начале осени. В этот же период в рекультивируемой отбеливающей земле была зарегистрирована максимальная численность углеводородокисляющих микроорганизмов (порядка 10^9 КОЕ/г). В течение летнего периода численность микроорганизмов этой группы составляла

Таблица 4

**Динамика разложения нефтепродуктов в грунте рекультивируемых участков 2003 года
(ОАО «Орскнефтеоргсинтез»)**

Даты отбора проб	Участки								
	№ 1 («Ленойл»)			№ 2 («Ленойл»)			№ 3 («Ленойл» и активный ил)		
	Содержание, г/кг	Степень деструкции, мас. %	Скорость деструкции, г/кг·сутки	Содержание, г/кг	Степень деструкции, мас. %	Скорость деструкции, г/кг·сутки	Содержание, г/кг	Степень деструкции, мас. %	Скорость деструкции, г/кг·сутки
18.06.03	189,5±16,5	1,3	0,07	247,4±19,8	1,0	0,07	183,2±27,5	3,6	0,2
19.08.03	127,6±20,6	33,5	1,0	159,4±15,4	36,2	1,5	75,8±4,3	60,1	1,8
13.09.03	78,5±4,4	59,1	2,0	143,9±10,7	42,4	0,6	52,1±3,3	72,6	0,9
17.10.03	52,9±2,8	72,4	0,8	138,7±19,8	44,5	0,2	46,9±7,2	75,3	0,2

порядка 10^7 КОЕ/г, что достаточно для активного протекания процесса деструкции углеводородов в грунте.

Таким образом, результаты производственных испытаний свидетельствуют о том, что комплексная технология с применением биопрепарата «Ленойл», минеральных удобрений, оксигенных реагентов и агротехнических мероприятий может с успехом применяться для рекультивации сильно загрязненных грунтов или грунтов, содержащих труднодоступные углеводороды. Причем использование в процессе ее реализации отходов других производств – мелассы, автолизата отработанных пивных дрожжей и избыточного активного ила биологических очистных сооружений позволяет повысить ее эффективность.

Серьезной проблемой, особенно для нефтедобывающих регионов Западной Сибири, остается нефтяное загрязнение водных поверхностей озер, болот и других водных источников, находящихся на территории производственной деятельности предприятий по добыче и транспорту нефти. Эффективность существующих биотехнологических способов ликвидации нефтяного загрязнения в условиях непроточных и неаэрируемых водоемов при высокой степени нефтяного загрязнения является весьма низкой.

Разработан и запатентован в Российской Федерации новый способ очистки водной поверхности от нефти и нефтепродуктов, сущностью которого является внесение в загрязненную воду бактериальной культуры, представляющей собой консорциум микроорганизмов *Bacillus brevis* и *Arthrobacter species* ИБ ДТ-5 с общим титром не менее 10^8 КОЕ/мл (Патент RU № 2241032). Аэрация в водоеме, загрязненном нефтью или нефтепродуктами, для поддержания жизнедеятельности аэробных микроорганизмов-нефтедеструкторов осуществляется принудительным забором нефтезагрязненной воды и распределением ее методом дождевания по поверхности водного объекта.

Результаты проведенных лабораторных экспериментов свидетельствовали о высокой эффективности нового способа: так, в эксперименте длительностью 6 суток степень очистки воды от сырой нефти составила 98,5 мас.%, а от дизельного топлива – 99,6 мас.%.

В 2002 году биопрепарат «Ленойл» был испытан для очистки водного объекта от нефтяного загрязнения на территории Ханты-Мансийского

округа в таежной зоне. Полигон был заложен на верховом болоте, расположенному на территории НГДУ «Правдинскнефть» К-29, обрабатываемая площадь – 3517 м². Мониторинг осуществлялся Научно-исследовательским институтом экологии и рационального использования природных ресурсов (г. Тюмень). Исходное содержание нефтяных углеводородов на полигоне составило 272,42 г/кг для верхнего горизонта (0-5 см) и 57,68 г/кг для нижнего (5-20 см).

Наряду с биопрепаратом «Ленойл» в испытаниях использованы известные биопрепараты «Дизойл» (ООО «Салют-Технолоджис-вест») и «Деградойлас с МД» (ООО «Сервисэкология»). По оценке специалистов НИИ экологии и рационального использования природных ресурсов, для участка, где был использован биопрепарат «Ленойл», характерным является общее повышение численности микроорганизмов на два порядка по сравнению с фоном, что указывает на интенсификацию процесса разложения нефти. При этом коэффициент биодеградации составил через 3 месяца после обработки биопрепаратором величину, равную 1,76 (для сравнения: коэффициент биодеградации для биопрепарата «Дизойл» составил 1,34, для биопрепарата «Деградойлас с МД» – 0,61 и в контроле, т.е. без использования биопрепаратов – 0,56).

Полученные результаты позволяют рекомендовать препарат «Ленойл» для биологической ремедиации водных объектов от нефтяного загрязнения.

ВЫВОДЫ

1. Определена величина окислительной активности консорциума микроорганизмов биопрепарата «Ленойл» и чистых культур микроорганизмов, входящих в его состав, по отношению к нефти, различным нефтепродуктам, а также к жирам растительного и животного происхождения. Показано, что биопрепарат «Ленойл» обладает способностью к окислению широкого спектра углеводородов как в консорциуме, так и его составляющими, причем наибольшие величины окислительной активности приходятся на консорциум.

2. В модельных экспериментах доказана эффективность использования биопрепарата «Ленойл» для биологической рекультивации почв (выщелоченный чернозем, торф), загрязненных нефтью. Степень биодеградации нефти в почве и торфе при 10%-ном уровне загрязнения составляет за 60 суток соответственно 85,3% и 84,3%.

3. В модельных экспериментах проведена сравнительная оценка эффективности биопрепарата «Ленойл» относительно известных коммерческих биопрепараторов для очистки нефтезагрязненных почв. Показано, что биопрепарат «Ленойл» превосходит по эффективности такие известные биопрепараторы, как «Деворойл», «Бациспекин» и «Дестройл», способен адаптироваться к высоким дозам нефти и эффективно утилизировать субстрат независимо от типа почв и особенностей загрязнителя.

4. Разработана и апробирована в производственных испытаниях в ОАО «Орскнефтеоргсинтез» технология биологической рекультивации отработанной отбеливающей земли, содержащей нефтепродукты, с использованием консорциума нефтеокисляющих микроорганизмов *Bacillus brevis* и *Arthrobacter species* ИБ ДТ-5 в составе биопрепарата «Ленойл».

5. Разработан и запатентован в Российской Федерации новый способ очистки водных поверхностей от нефтяного загрязнения, заключающийся во внесении в загрязненную воду бактериальной культуры, представляющей собой консорциум микроорганизмов *Bacillus brevis* и *Arthrobacter species* ИБ ДТ-5 с общим титром не менее 10^8 КОЕ/мл, и принудительной аэрации водного объекта.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

- 1. Логинов О.Н., Бойко Т.Ф., Артемова С.А. Данилова Е.А., Галимзянова Н.Ф., Яковлев В.Н., Нуртдинова Л.А.** Эффективные микроорганизмы-нефтедеструкторы для биологической рекультивации почв //Материалы I Международного конгресса «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (14–18 октября 2002 г., Москва). М., 2002. – С. 294.
- Loginov O.N., Boyko T.F., Artemova S.A., Danilova E.A., Galimzyanova N.F., Yakovlev V.N., Nurtdinova L.A.** Effective microorganisms-oil destructors for biological recultivation of soil //1-st International Congress «Biotechnology – state of the art prospects of development». October, 14–18.2002. M., 2002. – P. 295.
- 2. Бойко Т.Ф., Галимзянова Н.Ф., Нуртдинова Л.А., Силищев Н.Н., Логинов О.Н** Опыт промышленного использования биопрепарата «Ленойл» для очистки верхового болота от загрязнения //Тезисы докладов научно-практической конференции «Теоретические и практические вопросы мониторинга, предупреждения, ликвидации и рекультивации последствий нефтяного загрязнения» (18–20 ноября 2003 г., г.Ханты-Мансийск), С. 23.
- 3. Яковлев В.Н., Нуртдинова Л.А., Бормашова Н.Г., Галеева Г.Р., Логинов О.Н.** Применение биотехнологических методов для рекультивации нефтезагрязненных поверхностей // Тезисы докладов конференции НТО нефтяников и газовиков им. И.М. Губкина «Охрана окружающей среды при освоении углеводородных ресурсов» (30 сентября – 5 октября, г.Сочи). – М., 2003. – С. 22.
- 4. Логинов О.Н., Нуртдинова Л.А., Бойко Т.Ф., Четвериков С.П., Силищев Н.Н.** Оценка эффективности нового биопрепарата «Ленойл» для биоремедиации нефтезагрязненных почв //Биотехнология. – 2004. – № 1. – С. 77-82.
- 5. Логинов О.Н., Четвериков С.П., Гусаков В.Н., Нуртдинова Л.А., Силищев Н.Н.** Окислительная активность микроорганизмов биопрепарата «Ленойл» //Башкирский химический журнал. – 2004. – Т. 11, № 2. – С. 55-57.
- 6. Логинов О.Н., Нуртдинова Л.А., Бойко Т.Ф., Силищев Н.Н., Гайсина Х.А., Яковлев В.Н.** Новые микроорганизмы биодеструкторы для ре-

культивации нефтезагрязненных поверхностей //Интервал. – 2004. – № 1 (60). – С. 39–42.

7. Пат. 2241032 Российская Федерация, 7 С 12 Н 1/20. Способ очистки водных поверхностей от нефтяного загрязнения /О.Н.Логинов, Н.Н.Силищев, Л.А.Нуртдинова, В.Н.Яковлев. Заявлено 03.12.2002; опубл. 27.11.2004. Бюл. 33.

8. Нуртдинова Л.А., Четвериков С.П., Силищев Н.Н., Логинов О.Н. Окисление растительных и животных жиров микроорганизмами биопрепарата «Ленойл» //Материалы XVII Международной научно-технической конференции «Химические реагенты, реактивы и процессы малотоннажной химии» (12–14 ноября 2004 г., Уфа). Уфа: Гос. изд-во научн-техн. лит-ры «Реактив», – 2004. – С. 60–61.

9. Бакаева М.Д., Биккинина А.Г., Нуртдинова Л.А., Бойко Т.Ф., Галимзянова Н.Ф., Силищев Н.Н., Усманов М.А., Логинов О.Н. Опыт рекультивации загрязненной углеводородами отработанной отбеливающей глины с применением биопрепарата «Ленойл» //Башкирский химический журнал. – 2005. – Т. 12, № 3. – С. 126–128.

10. Логинов О.Н., Биккинина А.Г., Силищев Н.Н., Бойко Т.Ф., Галимзянова Н.Ф., Нуртдинова Л.А. «Способ рекультивации отбеливающей земли, загрязненной нефтепродуктами» //Заявка на изобретение № 2005130840/13 (034576) от 04.10.2005 г.

А. Шу -

Подписано в печать 24.11.05.
Формат 60 x 84 1/₁₆. Бумага офсетная.
Гарнитура «Таймс». Печать офсетная.
Усл.печ.л. 1.39. Уч.-изд.л. 1,40.
Тираж 100 экз. Тип. зак.№ 93.

Отпечатано на оборудовании издательства «Гилем».
450077, г.Уфа, Кирова, 15.
Тел.: (3472) 73-05-93, 72-36-82

№ 24559

РНБ Русский фонд

2006-4
27398