

УДК 579.66

РАЗРАБОТКА БИОПРЕПАРАТА «KAZBIOREM» ДЛЯ ОЧИСТКИ ПОЧВЫ ОТ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

**Хасенова Э.Ж., Аюпова А.Ж., Бердимуратова К.Т., Сарсенова А.С.,
Баякенов Д.А., Нагызбеккызы Э., Молдагулова Н.Б.**
ТОО «Экостандарт.kz», Астана, e-mail: elmira_alta@mail.ru

В данной статье приводятся результаты научных исследований по разработке технологии получения биологического препарата «KazBioRem» на основе органического носителя, предназначенного для очистки почвы от нефти и нефтепродуктов. Приведены данные по приготовлению препарата методом твердофазной ферментации. В качестве нефтеокисляющих бактерий в составе биопрепарата содержится ассоциация углеводородокисляющих микроорганизмов *Rhodococcus erythreus* AT7 и *Dietzia maris* 22K. Получен высокоэффективный биопрепарат – нефтеструктор, для производства которого нет необходимости использовать промышленные ферментеры. Титр полученного биопрепарата в конечном продукте составляет до 12,00 lg КОЕ/г. Изучена нефтеокисляющая активность биопрепарата на нефтезагрязненной почве месторождений Западного Казахстана. В результате проведенных модельных экспериментов по оценке нефтеокисляющей активности препарата выявлено, что степень деградации биопрепаратом в нефтезагрязненной почве месторождения Жанаталап достигает до 88,23% и месторождения Каламкас до 97,36%. Биопрепарат производится по «ноу-хау» технологии, преимуществом которой является исключение необходимости процесса наращивания микроорганизмов в промышленных ферментерах. Предлагаемый препарат можно перевозить на дальние расстояния любым видом транспорта. Разработанный биологический препарат «KazBioRem» предназначен для биоремедиации нефтезагрязненной почвы.

Ключевые слова: нефтезагрязненная почва, биопрепарат, углеводородокисляющие микроорганизмы, биоремедиация

DEVELOPMENT OF «KAZBIOREM» BIOLOGICAL PREPARATION FOR SOIL CLEANING FROM OIL AND OIL PRODUCTS

**Khasenova E.Zh., Ayupova A.Zh., Berdymuratova K.T., Sarsenova A.S.,
Bayakenov D.A., Nagyzbekkzy E., Moldagulova N.B.**
LLC «Ecostandart.kz», Astana, e-mail: elmira_alta@mail.ru

This article presents the results of scientific research on the development of technology for obtaining the biological preparation «KazBioRem» on the basis of an organic carrier intended for soil purification from oil and petroleum products. Data on the preparation of the preparation by the solid-phase fermentation method are given. As an oil-oxidizing bacteria, the biopreparation contains an association of hydrocarbon oxidizing microorganisms *Rhodococcus erythreus* AT7 and *Dietzia maris* 22K. A highly effective biopreparation has been obtained – an oil destructor for the production of which there is no need to use industrial fermenters. The titer of the obtained biopreparation in the final product is up to 12.00 lg CFU / g. The oil-oxidizing activity of the biopreparation on oil-contaminated soil of the deposits of Western Kazakhstan was studied. As a result of the model experiments conducted to assess the oil-oxidizing activity of the drug, it was revealed that the degree of destruction by the biological preparation in the oil-contaminated soil of the Zhanatalap deposit reaches up to 88.23% and the Kalamkas field up to 97.36%. The biopreparation is made according to the know-how of the technology, the advantage of which is the elimination of the necessity of the process of building up microorganisms in industrial fermenters. The proposed drug can be transported over long distances by any mode of transport. The developed biological preparation «KazBioRem» is intended for bioremediation of oil contaminated soil.

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

На сегодняшний день нефтяное загрязнение является экологической проблемой мирового масштаба. В Казахстане в настоящее время насчитывается более 200 тыс. га нефтезагрязненных почв. В природе саморазложение нефти занимает очень длительное время, при ее разливе поверхность воды и почвы быстро покрывается плотным слоем нефтяной пленки, которая препятствует доступу воздуха и света.

Нефтяное загрязнение приводит к нарушению почвенного покрова и растительности. Территории, загрязненные нефтью, выводятся из природного фонда как непригодные и токсичные и являются потен-

циально опасными для жизнедеятельности человека из-за риска попадания вредных веществ в подземные и поверхностные воды с атмосферными осадками, а также в организм человека через воздух [1–3].

В настоящее время наиболее перспективным методом для очистки нефтезагрязненных почв как в экономическом так и в экологическом плане является биотехнологический подход, основанный на использовании различных групп микроорганизмов, обладающих повышенной способностью к биodeградации нефти и продуктов её переработки. Среди всего спектра методов устранения последствий углеводо-

родных загрязнений биологические методы справедливо признаны в мире наиболее безопасными для окружающей среды и экономически целесообразными.

Наиболее привлекательным и перспективным способом восстановления нефтезагрязненных территорий является микробиологический, основанный на использовании углеводородоокисляющих микроорганизмов, способных утилизировать углеводороды в процессе своей жизнедеятельности. Метод достаточно эффективен и не требует больших финансовых расходов.

Для создания эффективного биопрепарата необходимо подобрать активные штаммы микроорганизмов с высокой нефтеокисляющей активностью. Готовая форма биопрепарата имеет важное значение для сохранения эффективности биопрепарата в течение длительного времени, а также для удобства их транспортировки [4–6].

Эффективность биоремедиации нефтезагрязненных почв напрямую зависит от наличия в среде активных штаммов-деструкторов нефти и способа проведения биоремедиационных работ. Правильный выбор биопрепаратов-деструкторов нефти и правильное проведение очистных работ являются залогом успешного проведения биоремедиационных работ.

Целью исследования являлась разработка биологического препарата с высоким титром жизнеспособных клеток и длительным сроком хранения, обеспечивающего эффективную очистку почвы и воды от нефти и нефтепродуктов.

Материалы и методы исследования

Подготовка проб почвы к гравиметрическому анализу. Образцы отобранных почв высушивали до воздушно-сухого состояния. После высушивания пробу пересевали 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 вошеной бумаги.

Определение содержания нефти в почве проводили гравиметрическим методом. 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 сте-

кловатой (1 см). В колонку добавляли 3–5 см³ гексана. Под носик колонки помещали заранее взвешенный стакан вместимостью 50 см³.

Оставшийся в стакане после испарения хлороформа осадок растворяли в 5–10 см³ 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 [7].

Результаты исследования и их обсуждение

Для получения препарата культуры нефтеокисляющих бактерий выращивали на органическом носителе методом твердофазной ферментации. В качестве органического носителя были выбраны отруби, так как это богатый источник питания для бактериальных клеток, а также недорогое и доступное сырье.

Необходимо отметить, что твердофазное культивирование микроорганизмов предотвращает взаимное ингибирование клеток продуктами их метаболизма. Благодаря указанным новым свойствам объекта происходит значительное увеличение биологической активности препарата в отношении углеводов [3].

Биологический препарат состоит из сообщества микроорганизмов-нефеструктуров *Rhodococcus erythreus* AT7 и *Dietzia maris* 22K, выделенных из природных источников. Штаммы обладают высокой окислительной активностью по отношению к нефти и нефтепродуктам.

Штамм *Rhodococcus erythreus* AT7 выделен из нефтезагрязненной почвы месторождения Алибекмола Актюбинской области. Аэроб. При микроскопическом исследовании выявлены подвижные грамположительные палочки, с размером 2–3 мкм с округленными концами, которые расположены одиночно и в скоплениях, отмечается рост на жидких и агаризованных средах. Оптимальная температура роста – 28 °С, длительность культивирования – 24–48 ч. Способен к росту на средах, содержащих источники углерода. Хорошо расщепляет фруктозу, сорбит, манит, инозит, слабее глюкозу, сахарозу, мальтозу, сукцинат, цитрат и бензоат, активно разлагает тирозин. Макроскопически колонии микроорганизма круглые, непрозрачные, слизистые, плоские, края ровные, окраска кремовато-розовая.

Микроморфология штамма представлена палочковидными, грамположительными клетками, споры отсутствуют. Штамм не

токсичен и не патогенен. Штамм бактерий *Rhodococcus erythreus* AT7 депонирован в Республиканской коллекции микроорганизмов МОН РК под номером В-РКМ-0769.

Штамм *Dietzia maris* 22К выделен из нефтезагрязненной почвы месторождения Кумколь Кызылординской области. Штамм представляет собой неподвижные кокки, грамположительные, спор не образуют. На питательном агаре культура образует круглые, выпуклые, оранжевого цвета колонии диаметром 2–3 мм. Край колоний ровный, пигмент в среду не выделяет. Факультативный аэроб. Штамм не токсичен и не патогенен.

Физиолого-биохимические признаки. В качестве источника углерода использует глюкозу, сахарозу, арабинозу, ксилозу. Крахмал не гидролизует, желатину не разжижает. Сероводород и индол не образует. Нитраты восстанавливает до нитритов. Каталаза положительна, оксидаза отрицательна.

Штамм характеризуется высокой способностью к утилизации нефти и нефтепродуктов. Штамм бактерий *Dietzia maris* 22К депонирован в Республиканской коллекции микроорганизмов МОН РК под номером В-РКМ-0768.

Приготовление биологического препарата. Для приготовления препарата стартерную культуру готовили методом глубинного культивирования в течение 24 ч при температуре 28 °С. Готовые питательные среды после стерилизации инокулировали культурами микроорганизмов *Rhodococcus erythreus* AT7 и *Dietzia maris* 22К в концентрации 10^9 кл/см³ на 1,0 дм³ питательной среды. Глубинное культивирование штаммов проводили отдельно, инкубировали в течение 24–48 ч при температуре 28 °С в термостате. После культивирования наработанные культуральные жидкости объединяли. Титр клеток в полученной культуральной жидкости составлял 8,0–9,0 lgKOE/см³.

Культуральную жидкость смешивали с питательной смеси, изготовленную на пшеничных отрубях с добавлением питательных элементов (глюкоза, пивная дробина, питательный бульон, минеральные соли). Перемешивали до получения однородной влажной кашеобразной массы, фор-

мировали биопрепарат таблетированной формы, осуществляли поверхностное твердофазное культивирование в течение 2–3 суток при температуре 28–30 °С. В данном случае в технологии производства препарата исключен процесс наработки микробной биомассы в промышленных ферментерах, что в свою очередь облегчает работу.

Жизнеспособность клеток микроорганизмов определяли методом предельных разведений по Коху. Титр полученного биопрепарата в конечном продукте составляет до 12,00 lg KOE/г. Хранение препаратов можно осуществлять при комнатной температуре (в течение 7 дней), что намного облегчает процесс перевозки препаратов и удешевляет стоимость его хранения.

Изучение нефтеокисляющей активности препарата в нефтезагрязненной почве месторождения Жанаталап Западной Казахстана. Препарат перед постановкой эксперимента восстанавливали на течение 2 суток. Расчет внесения биопрепарата представлен в табл. 1.

На 200 мл восстановленного препарата вносили 150 г нефтезагрязненной почвы месторождений Жанаталап со степенью загрязнения 5,3 %. Аналогично проводили очистку нефтезагрязненной почвы месторождения Каламкас.

Степень загрязнения нефтью составляет 2,44 %. Почву тщательно перемешивали. Пробы почв, обработанных биопрепаратом, отбирали через 3 и 7 суток.

Остаточное содержание нефти определяли методом гравиметрии. Результаты деструкции нефти в нефтезагрязненных почвах приведены в табл. 2 и на рисунке.

На рисунке визуально наблюдается снижение содержания нефтепродуктов в нефтезагрязненной почве месторождения Жанаталап после обработки биологическим препаратом в сравнении с контрольным вариантом на 7 сутки.

В результате проведенных модельных экспериментов по очистке нефтезагрязненной почвы выявлено, что степень деструкции биопрепаратом в почве Жанаталап достигает до 88,23 % на 7 сутки, в почве Каламкас до 97,36 %.

Таблица 1

Расчет внесения биопрепарата при реактивации

Приготовление маточного раствора	Количество маточного раствора, мл	Объем питательной среды, мл	Титр клеток после внесения препарата, lgKOE/см ³	Титр клеток после реактивации, lgKOE/см ³
1 г препарата на 1000 мл питательной среды	100	1000	8,02 ± 0,11	9,34 ± 0,17
	10	1000	7,14 ± 0,14	9,37 ± 0,18
	1	1000	6,98 ± 0,13	9,46 ± 0,19



1 – контроль

2 – почва после обработки биопрепаратом

Деструкция нефтезагрязненной почвы месторождения Жанаталап биопрепаратом «KazBioRem»

Таблица 2
Деструкция нефти биопрепаратом
в нефтезагрязненных почвах

Наименование	Деструкция нефти, %			
	Почва Жанаталап		Почва Каламкас	
	3 сут.	7 сут.	3 сут.	7 сут.
Биопрепарат «KazBioRem»	81,9	88,23	96,69	97,36
Контроль	8,83	9,31	4,49	6,42

Таким образом, получен высокоэффективный биопрепарат – нефтеструктор, для производства которого нет необходимости использовать промышленные ферментеры.

Достоинством предлагаемой технологии является то, что исключается необходимость использования промышленных ферментеров для наработки препарата, также не требуется дополнительной расфасовки готового препарата, что удешевляет технологию получения препарата в целом.

Закключение

Таким образом, получен высокоэффективный биологический препарат на основе штаммов-нефтеструкторов *Rhodococcus erythreus* AT7 и *Dietzia maris* 22K с высоким титром клеток без культивирования на промышленных ферментерах.

Биопрепарат производится по «ноу-хау» технологии, преимуществом которой является исключение необходимости процесса наращивания микроорганизмов

в промышленных ферментерах. Предлагаемый препарат можно перевозить на дальние расстояния любым видом транспорта. Также преимуществом данного способа является возможность проведения биоремедиационных работ непосредственно на местах разливов.

Разработанный биологический препарат «KazBioRem» предназначен для биоремедиации нефтезагрязненной почвы.

Список литературы

1. Артемьева Т.И. Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М.: Наука, 1988. 254 с.
2. Панасюгин А.С., Цыганов А.Р., Павловский Н.Д., Ломоносов В.А. Оценка эффективности рекультивации почв, загрязненных нефтепродуктами, препаратом «Destroil» // Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной Академии. 2016. № 2. С. 48–50.
3. Саксон В.М., Кузнецов С.А., Кретов А.В., Хромых Д.П., Бойкова И.В., Новикова И.И., Конев Ю.Е. Способ получения биопрепарата для очистки объектов окружающей среды от нефти и нефтепродуктов. Патент РФ В09С1/10, С02F3/34, № 2116145. 27.07.1998.
4. Назарько М.Д., Шурай К.Н., Лобанов В.Г., Щербakov В.Г., Александрова А.В. Бидеградация нефтезагрязнений черноземов Краснодарского края микробными препаратами // Известия вузов. Пищевая технология. 2010. № 5–6. С. 105–108.
5. Ногина Т.М., Думанская Т.У., Хоменко Л.А., Подгорский В.С. Эффективность препарата «Эколан-М» для очистки нефтяных загрязнений почвы // Микробиол. журнал. 2012. Т. 74, № 6. С. 29–35.
6. Казиева А.А., Мелякина Э.И. Сравнительная оценка различных доз биопрепарата для очистки нефтезагрязненных почв // Вестник АГТУ. 2014. № 2 (58). С. 54–58.
7. ПНД Ф 16.1.41-04 Методические указания по выполнению измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах почв гравиметрическим методом. М., 2004. 6 с.