**Сравнительная эффективность деструкции нефтепродуктов различными биопрепаратами при разных уровнях загрязнения торфогрунтов**

Алехин В.Г., Фахрутдинов А.И., Малышкина Л.А., Ситников А.В, Емцев В.Т., Хотянович А.В.

Современный микробиологический метод рекультивации, основанный на применении высокоэффективных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов, выделенных из загрязненных природных объектов, широко применяется в мировой практике рекультивационных мероприятий [I].

Важнейшим фактором, разносторонне влияющим на активность процесса разрушения углеводородов в почве нефтеокис-ляющими микроорганизмами, являются почвенно-климатические условия [2]. Эффективная деструкция различных углеводородов микроорганизмами, внесенными в почву с препаратом, возможна лишь в тех случаях, когда они найдут в почве (или других средах, куда будут помещены) благоприятные условия для жизнедеятельности и развития (источники питания, необходимый тепловой и водный режимы, и т.д.), т.е. микроорганизму (или группе микроорганизмов) необходимо создать благоприятную экологическую нишу, в которой он будет развиваться [3,4, 5].

Очень большое значение для жизнедеятельности нефтеокисляющих микроорганизмов имеет и качественный состав нефтяного сырья, попавшего в почву (или другую среду), и время, прошедшее с момента загрязнения. Различные фракции нефтепродуктов, их сочетания по-разному влияют на микроорганизмы, в том числе внесенные с биопрепаратами [1, б]. Это вызвано возможностью использования различных углеводородов как источника энергии у данных микроорганизмов и определяется их фи-зиолого-биохимическими особенностями, способностью разрушать тяжелые или легкие фракции углеводородного сырья [5, 7].

Отсюда следует, что применение каждого биопрепарата, имеющего в своем составе активные формы микроорганизмов, требует создания оригинальной технологии и строгого ее выполнения в процессе использования препарата. Для каждой почвен-но-климатической зоны технология должна корректироваться. Главными факторами, накладывающими особенности на технологию в условиях Среднего Приобья, являются короткий период активных температур и химической состав разлитой нефти [2]. При этом вполне возможно, что штаммы микроорганизмов, выделенные в зонах умеренного климата и активно разрушающие там углеводороды, в условиях Севера "работать" не будут в силу своих физиологических особенностей, адаптированных к более мягким климатическим условиям [8].

Цель проведенных исследований - оценка эффективности различных биопрепаратов при деструкции нефтяных углеводородов в образцах торфогрунта, выполненная в лабораторных условиях.

**Методика проведения эксперимента**

В качестве объекта исследований был использован загрязненный нефтью торфогрунт, отобранный с места аварийного разлива нефти семилетней давности на Западно-Сургугском месторождении (куст 84). Образцы торфа обрабатывали следующими препаратами: деворойл 1 (порошок), деворойл 2 (порошок), деворойл (паста), инипол, фаерзайм, биоприн, деградойлас 81, деградойлас Nj9, ремедиаст, биопрепарат 999, биопрепарат 670, нафтокс (жидкий), нафтокс, псевдомин.

Опыт проводился на базе Инженерно-экономического внедренческого центра ОАО "Сургутнефтегаз" и был организован Отделом охраны природы и борьбы с коррозией.

Для испытания каждого из препаратов использовали 2 сосуда по 10 кг нефтезагрязненного торфогрунта в каждом, а также 2 сосуда с контрольными образцами. Опыт был поставлен на 2-х уровнях нефтяного загрязнения - среднем (170-250 г/кг) и очень высоком (300-600 г/кг). Обработка каждого образца нефтезагрязненного торфяника проводилась в соответствии с рекомендованной разработчиком технологией. Сосуды с образцами в течение опыта находились при температуре 18-20 °С.

По ходу эксперимента раз в неделю проводилось увлажнение путем дождевания и рыхления торфяника, а также внесение минеральных удобрений (для тех препаратов, где это предусмотрено технологией, предложенной разработчиком препарата).

Содержание нефтепродуктов в торфе определяли методом ИК-спектрометрии на приборе АН-1 (анализатор нефтепродуктов) в соответствии с РД 390147098-015-90 "Инструкции по контролю за состоянием почв на объектах предприятий Миннефтегазпро-ма"; использовали ГОСТ-Р, разработанный ВНИГРИ "Определение содержания нефтепродуктов в почвах и грунтах".

Эффективность воздействия биопрепаратов рассчитывалась по отношению разрушенных (усвоенных) микроорганизмами нефте-углеводородов к исходному их содержанию в образцах за время t, выраженному в процентах:

Эфф=((С0 - Сt)/C0) x100,

где: Со - исходное содержание нефтепродуктов в торфогрунге;

С t - содержание нефтепродуктов в еженедельных отборах образцов торфогрунта

Для оценки влияния биопрепаратов на биологическую активность почвы на последнем этапе испытаний отбирались образцы торфа для микробиологических исследований.

Изучение общей биологической активности почв вели на твердой питательной среде МПА, а численность нефтеокисляющих микроорганизмов определяли на твердой среде Придхема - Готглиба [9], в которую добавлялась нефть как единственный источник энергии в количестве 1, 2, 3, 4, 5%. Подсчет микроорганизмов вели чашечным методом [10].

**Результаты исследований и их обсуждение**

Рассмотрение полученных экспериментальных данных проводилось по 2 критериям оценки способности биопрепаратов к деструкции углеводородов нефти:

критерий 1 - по времени, в течение которого достигается 50% эффективность, т.е. по скорости расщепления углеводородов нефти;

критерий 2 - по максимальному снижению содержания углеводородов нефти в образцах торфа за 11 недель.

В таблице 1 представлены результаты анализов остаточного содержания нефтепродуктов в образцах торфа, которые показывают, что через 2 недели при одностадийной обработке почвы в сосудах 50%-го уровня эффективности снижения нефтепродуктов в торфе достигли: деворойл - 61,49%, инипол - 58,94%, фер-займ - 58,32%, ремедиаст - 65,32%. № 999 - 67,37%, № 670 - 63,36.

Эффективность действия псевдомина и нафтокса для сосудов с "низким" уровнем загрязнения (порядка 200 г/кг) превысила 50% уровень после 5-ти недель с момента обработки (табл. 2). Следует особо подчеркнуть способность нафтокса к интенсивному разложению нефтепродуктов на "высоком" уровне загрязнения (584 г/кг). Пятидесятипроцентный барьер здесь был преодолен через 2 недели после обработки, значение эффективности составило 60,1%. Кроме того, произошло разрыхление обработанного торфа, он приобрел способность поглощать и удерживать воду. Остальные испытуемые препараты достигли 50% уровня эффективности по истечении 4-х недель с проведением дополнительной обработки.

Таблица 1

Содержание нефтеуглеродов в образцах торфа (г/кг) и эффективность их разрушения биопрепаратами

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Препарат | Исходноесодержание | Через 2 недели  | Через 7 недели  | Через 11 недели  |
| Содержание | эфф., % | Содержание | эфф., % | Содержание | эфф., % |
| Деворойл 1 | 264 | 138,9 | 36,5 | 99 | 56,7 | 76 | 64,9 |
| 290 | 215,5 | 141 | 120 |
| Деворойл 2 | 289 | 108,6 | 61,5 | 84.5  | 69.6 | 75,5 | 72,5 |
| 270 | 106,5 | 85.5 | 77.0 |
| Леворойл паста | 269 | 149,5 | 40,5 | 117,0  | 56 | 89 | 64,8 |
| 302 | 191,5 | 134,0 | 112,5 |
| Биоприн | 305 | 228,5 | 31,2 | 130 | 55,8 | 111,7 | 62,3 |
| 293 | 182,5 | 134,5 | 118,8 |
| Инипол | 371 | 175 | 58,9 | 128 | 69,8 | 97 | 78,5 |
| 363 | 126,9 | 94 | 61 |
| Фаерзайм | 285 | 129 | 58,3 | 94 | 68,6 | 760 | 74,7 |
| 273 | 103.8 | 81 | 650 |
| Деградойлас 81 | 254 | 167,7 | 39,9 | 115,5 | 57,3 | \* | 57,3 |
| 365 | 197,1 | 149 | \* |
| Деградойлас Nj9 | 304 | 199,5 | 29,7 | 93.5  | 66,6 | \* | 66,6 |
| 258 | 193,5 | 94.0 | \* |
| Ремедиаст | 278 | 96 | 65,3 | 70,5 | 74,5 | \* | 74,5 |
| 288 | 100,5 | 74 | \* |
| Препарат №670 | 319 | 137 | 63,3 | 88,5 | 76,1 | \* | 76,1 |
| 468 | 142 | 99,5 | \* |
| Препарат №999 | 340 | 126,9 | 67,4 | 89,5 | 75,6 | \* | 75,6 |
| 330 | 92,4 | 74 | \* |
| Контроль | 261 | 244,5 |   | 224,5 |   |   |   |
| 264 | 205 | 188,5 |   |
| Примечание: \* - испытание препаратов прекращено из-за полученной высокой эффективности  |

Таблица 2

Содержание нефтеуглеродов в образцах торфа (г/кг) и эффективность их разрушения биопрепаратами псевдомин, нафтокс, нафтокс жидкий

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Препарат | Исходноесодержание | Через 1 недели  | Через 2 недели  | Через 3 недели  |
| Содержание | эфф., % | Содержание | эфф., % | Содержание | эфф., % |
| Псевдоним | 197 | 175 | 11,2 | 144 | 27 | 115 | 41.6 |
| 552 | 459 | 16,8 | 412 | 25,4 | 398 | 37161 |
| Нафтокс | 203 | 138 | 32,2 | 119 | 41.4 | 114 | 44,1 |
| 584 | 511 | 12,5 | 233 | 60,1 | 227 | 61,1 |
| Нафтокс жидкий | 203 | неопр. | не опр. | 199 | 2.0 | 153 | 24,6 |
| 532 | 476 | 10,5 | 449 | 15,9 | 419 | 21,2 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Препарат | Через 4 недели  | Через 8 недели  | Через 11 недели  |
| Содержание | эфф., % | Содержание | эфф., % | Содержание | эфф., % |
| Псевдомин | 114 | 42.4  | 58 | 70,8 | 48 | 75,6 |
| 381 | 31 | 332 | 40 | 314 | 43,1 |
| Нафтокс | 109 | 46.3  | 82 | 60 | 54 | 73,4 |
| 209 | 64,2 | 173 | 70,4 | 161 | 72,4 |
| Нафтокс жидкий | 118 | 41,8 | 83 | 59,4 | 59 | 70,9 |
| 380 | 28.4 | 329 | 38,2 | 294 | 44,7 |
| Примечание: Внесение минеральных удобрений, мела и оструктуривателя произведено через 7 недель от начала опыта |

Таблица 3

Ранжировка препаратов по скорости деструкции нефтеуглеводородов

|  |  |
| --- | --- |
| Наименование препарата | Ранг в соответствии с критерием 1 |
| №999 | 1 |
| Ремедиаст | 2 |
| №670 | 3 |
| Деворойл2 | 4 |
| Инипол | 5 |
| Фаерзайм | 6 |
| Деградойлас Nj9 | 7 (дополнительная обработка 1) |
| Деворойл | 8 (дополнительная обработка 1) |
| Деградойлас 81 | 9 (дополнительная обработка 1) |
| Псевдомин | 10 |
| Нафтокс | 11 |
| Деворойл паста | 12 (дополнительная обработка 1) |
| Биоприн | 13 (дополнительная обработка 1) |
| Нафтокс жидкий | 14 |

В таблице 3 представлена ранжировка способности биопрепаратов к деструкции нефтяных загрязнений в соответствии с критерием 1.

Для достижения максимальной степени очистки были проведены две дополнительные обработки биопрепаратом нефтезаг-рязненного грунта. Первая была проведена через 3 недели после основной. По прошествии 4-х недель после первой дополнительной обработки эффективность воздействия биопрепаратов достигла 55-78% (табл. 1, 2). Максимальное повышение эффективности после обработки отмечается для деворойла 1 (порошок), биоприна, деградойласа Nj9, деворойла (паста).

Максимальная степеныдеструкции углеводородов нефти отмечается для сосудов с почвой, обработанных деворойлом 2, инипо-лом, фаерзаймом, деградойлосом Nj9, ремедиастом, № 670, № 999.

Через 7 недель после начала эксперимента проведена вторая дополнительная обработка торфа следующими препаратами: деворойлом 1 (порошок), деворойлом 2 (порошок), деворойлом (паста), иниполом, фаерзаймом, биоприном. В сосуды с почвой, обработанные псевдомином и нафтоксом, были внесены минеральные удобрения в дозе NeoPwKso, мел - до рН 6,8-7,2 и песок - 5% от массы торфа. Через 4 недели после второй обработки максимальную эффективность показали инипол, фаерзайм, деворойл (порошок). Псевдомин и нафтокс были эффективны как на низком уровне загрязнения, так и на высоком (табл. 2).

В соответствии с критерием 2 оценки работоспособности биопрепараты ранжировались в следующем порядке (табл. 4).

Таблица 4

Оценка эффективности биопрепаратов при достижении максимального снижения уровня загрязнения

|  |  |
| --- | --- |
| Наименование препарата | Ранг в соответствии с критерием 2 |
| Инипол | 1 |
| Псевдомнн | 2 |
| Фаерзайм | 3 |
| Нафтокс | 4 |
| Деворойл2 | 5 |
| Нафтокс жидкий | 6 |
| Деворойл 1 | 7 |
| Деворойл паста | 8 |
| Биоприн | 9 |

Сравнительная оценка эффективности испытанных препаратов позволила выделить препараты, обладающие наибольшей способностью к окислению нефтепродуктов, по 2-м критериям (табл.5).

Таблица 5

Препараты, обладающие наибольшей активностью к деструкции нефтеуглеводородов

|  |  |
| --- | --- |
| Наименованиепрепарата | Ранг |
| Инипол | 1 |
| Фаерзайм | 2 |
| Деворойл 2 | 2 |
| Псевдомнн | 3 |
| Нафтокс | 4 |
| Деворойл 1 | 5 |
| Нафтокс жидкий | 6 |
| Деворойл паста | 7 |
| Биоприн | 8 |
| Примечание: ранг определен как среднее арифметическое по критериям 1 и 2. |

Внесение в почву различных биопрепаратов способствовало увеличению числа бактерий в испытуемых вариантах загрязнения торфа в среднем с 4,2 o 106 (деворойл 1 порошок) до 8,7 o 108 (нафтокс жидкий) по отношению к контрольным образцам. Контрольные образцы показали стабильное количество микроорганизмов, в среднем 3,0- 105. Наибольшее количество микроорганизмов обнаружено на вариантах с применением препаратов псевдомин, нафтокс и нафтокс жидкий (табл. 6).

Это, очевидно, связано с особенностями применяемой технологии, способствующей созданию наиболее благополучной экологической ниши для внесенных в почву микроорганизмов.

Таблица 6

Влияние различных биопрепаратов на общую биологическую активность почвы

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № | Наименование препарата | Общее число микроорганизмов на МПА (кл/гр) |
| Контроль | Опыт |
| 1 | Деворойл 1 порошок | 3,8\*105 | 4,2\*106 |
| 2 | Деворойл 2 порошок | 3\*105 | 5,8\*106 |
| 3 | Деворойл паста | 2,8\*105 | 6\*106 |
| 4 | Биоприн | 3,1\*105 | 6,8\*107 |
| 5 | Инипол | 3\*105 | 7,2\*107 |
| 6 | Фаерзайм | 3,1\*105 | 7\*106 |
| 7 | Деградойлс 81 | 2,8\*105 | 5,6\*105 |
| 8 | Деградойлс Nj9 | 2,9\*105 | 5,4\*105 |
| 9 | Ремедиаст | 3,1\*105 | 6,1\*106 |
| 10 | №670 | 3,0\*105 | 7,2\*105 |
| 11 | №999 | 3,2\*105 | 6,8\*105 |
| 12 | Псевдомин' | 3,1\*105 | 7,2\*107 |
| 13 | Псевдомин'' | 3,1\*105 | 7,8\*107 |
| 14 | Нафтокс' | 3,0\*105 | 7,9\*107 |
| 15 | Нафтокс'' | 3,0\*105 | 8,5\*107 |
| 16 | Нафтокс жидкий' | 3,1\*105 | 8,7\*107 |
| 17 | Нафтокс жидкий'' | 3,1\*105 | 8,1\*107 |
| Примечание: ' - образцы из сосудов с низким содержанием нефти; '' - образцы из сосудов с высоким содержанием нефти. |

Таблица 7

Количество микроорганизмов (кл/г) на среде Придхема-Готтлиба с разной концентрацией нефтеуглеводородов

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № | Наименование препарата | Крнцентрация нефти в среде |
| 0% | 1% | 2% | 3% | 4% | 5% |
| 1 | Деворойл 1 порошок | 5,6\*102 | 6,3\*105 | 5,4\*105 | 4,9\*104 | 7,8\*102 | 1,1\*102 |
| 2 | Деворойл 2 порошок | 3,2\*102 | 7,8\*105 | 6,2\*105 | 4,2\*104 | 2,0\*102 | 1,2\*102 |
| 3 | Деворойл паста | 1,8\*102 | 5,6\*105 | 6\*105 | 4,8\*104 | 1,9\*102 | 1,0\*102 |
| 4 | Биоприн | 2,8\*103 | 7,3\*106 | 5,6\*104 | 1,8\*102 | - | - |
| 5 | Инипол | 3,9\*103 | 8,9\*107 | 7,1\*106 | 6,6\*104 | 5,6\*105 | 3,2\*104 |
| 6 | Фаерзайм | 2,7\*102 | 7,4\*106 | 5,6\*105 | 5,6\*103 | 1,7\*103 | 1,1\*102 |
| 7 | Деградойлс 81 | 1,1\*102 | 8,9\*104 | 7,8\*104 | 2,8\*102 | - | - |
| 8 | Деградойлс Nj9 | 1,4\*103 | 7,6\*105 | 5,1\*102 | 1,1\*102 | - | - |
| 9 | Ремедиаст | 4,1\*102 | 8,1\*104 | 8,1\*103 | 5,7\*102 | - | - |
| 10 | №670 | 1,7\*103 | 4,9\*105 | 3,8\*104 | 2,8\*102 | 1,1\*102 | - |
| 11 | №999 | 2,1\*103 | 1,8\*105 | 2,8\*103 | 1,7\*102 | - | - |
| 12 | Псевдомин' | 3,8\*103 | 7,2\*105 | 6,4\*105 | 5,8\*104 | 2,1\*104 | 1,8\*104 |
| 13 | Псевдомин'' | 4,9\*104 | 8,1\*108 | 7,8\*106 | 6,4\*106 | 4,8\*104 | 2,1\*104 |
| 14 | Нафтокс' | 3,8\*104 | 8,3\*107 | 7,4\*106 | 6,1\*105 | 4,8\*105 | 3,8\*104 |
| 15 | Нафтокс'' | 3,1\*104 | 8,2\*107 | 6,8\*106 | 5,9\*105 | 3,9\*105 | 3,1\*104 |
| 16 | Нафтокс жидкий' | 1,8\*103 | 6,1\*106 | 5,0\*104 | 3,8\*104 | 2,7\*102 | 1,1\*102 |
| 17 | Нафтокс жидкий'' | 1,9\*103 | 5,9\*107 | 4,1\*106 | 2,8\*104 | 1,8\*103 | 1,7\*102 |
| Примечание: ' - образцы из сосудов с низким содержанием нефти; '' - образцы из сосудов с высоким содержанием нефти |

Данные микробиологического анализа по определению активности жизнедеятельности нефтеокисляющих микроорганизмов подтверждают результаты, полученные в ходе химических анализов. Обращает на себя внимание тот факт, что наивысшая активность микроорганизмов всех испытанных препаратов была отмечена при низких концентрациях нефти в среде (1%). По мере увеличения концентрации нефти количество микроорганизмов в среде снижалось. Активно развивались на высоких концентрациях (до 5%) нефти в среде лишь микроорганизмы в сосудах, в которые вносились препараты инипол, псевдомин и нафтокс (табл. 7).

Таким образом, отмеченная выше способность нафтокса усваивать и быстро разрушать нефтепродукты в условиях предельно высоких концентраций связана с физиологическими и биохимическими особенностями микроорганизмов, составляющих основу этого препарата и разработанной технологии их применения.

**Выводы**

1. Испытанные биопрепараты для деструкции нефтеуглеводо-родов показали достаточно высокую эффективность в условиях лабораторного опыта. Наивысшей активностью разрушения нефти при уровне загрязнения торфа от 265 до 365 г/кг обладали препараты инипол, фаерзайм, деворойл 2 (порошок), псевдомин и нафтокс.

2. Показано, что наиболее полной деструкции нефтепродуктов можно добиться при повторной обработке загрязненной среды самим препаратом или внесением минеральных удобрений, рас-кислителя и оструктуривателя.

3. Наивысшей активностью деструкции нефти при высоком (до 584 г/кг) уровне загрязнения обладал препарат нафтокс, способность которого к интенсивному разрушению высоких концентраций нефти связана с физиологическими и биохимическими особенностями слагающих его микроорганизмов.

4. Для подтверждения полученных результатов необходимо провести исследования по изучению способности биопрепаратов к деструкции углеводородов нефти на различных нефтяных загрязнениях в реальных условиях короткого северного лета, с определением воздействия биопрепаратов на различные фракции нефти.

**Список литературы**

1. Международный региональный семинар "Охрана окружающей среды: Современные исследования по экологии и микробиологии" // Физиология и биохимия культурных растений. Ужгород, 1997. № 5.

2. Ермоленко З.М., Чугунов В.А., Герасименко В.Н. Влияние некоторых факторов окружающей среды на выживаемость внесенных бактерий, разрушающих нефтяные углеводороды // Биотехнология. 1997. № 5.

3. Ботоер М. Микробные сообщества в мерзлотных почвах Сибири // Вторая Междунар. конф. Сыктывкар, август, 1997: Тезисы. докл. Сыктывкар, 1997.

4. Stewart R.S. Distribution of multiple oil tolerant and oil degrading bacteria around a site ofnutural crude oil seepage // Тех. J.Sci. 1997. 49. №4.

5. Киреева Н.А., Новоселова Е.И., Хазиев Ф.Х. Ферменты азотного обмена в нефтезагрязненньгх почвах // Изв. РАН. Сер. биол. 1997. № 6.

6. Алехин В.Г., Емцев В.Т, Рогозина Е.А, Фахрутдинов А.И. Биологическая активность и микробиологическая рекультивация почв, загрязненных нефтепродуктами // Биологические ресурсы и природопользование. Нижневартовск, 1998. Вып. 2.