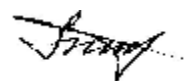


На правах рукописи



БИККИНИНА АЛЬМИРА ГАБДУЛАХАТОВНА

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ РЕКУЛЬТИВАЦИИ
НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ОБЪЕКТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
КОМПЛЕКСА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

03.00.23 – биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Уфа – 2007

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

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Логинов Олег Николаевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Киреева Наиля Ахняфовна

заслуженный деятель науки РФ,
доктор биологических наук, профессор
Еремец Владимир Иванович

Ведущая организация: Российский химико - технологический
университет им. Д.И. Менделеева

Защита состоится « 17 » мая 2007 г. в 14.00 часов на заседании Диссертационного Совета КМ 002.136.01 при Институте биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г. Уфа, Проспект Октября, 69. Тел./факс (347) – 235-53-62, e-mail: ib@anrb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Уфимского научного центра РАН и на официальном сайте: <http://www.anrb.ru/inbio/dissovet/index.htm>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2007.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Р.В.Уразгильдин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Одной из серьезных проблем восстановления природной среды при нефтедобыче является ликвидация нефтяных загрязнений и утилизация отходов, образующихся в процессе очистки и переработки нефти.

Наиболее полное, экологически безопасное и экономически обоснованное восстановление загрязненных нефтью и нефтепродуктами биоценозов может быть достигнуто при применении микробиологического метода с использованием высокоэффективных культур нефтеокисляющих микроорганизмов.

Успешно процессы рекультивации могут проходить лишь при наличии в почве полноценного микробного сообщества, обеспечивающего пополнение питательных элементов, биологически активных веществ, ко-факторов и ко-субстратов для углеводородоокисляющих микроорганизмов.

Попадая в почву, нефть изменяет структуру почвенной микробиоты, а нефтезагрязненные отходы и вовсе лишены сбалансированного микробного сообщества (Гузов, Левин, 1989). Поэтому поиск эффективных способов активизации микроорганизмов очищаемой почвы и создание полноценного микробного сообщества в техногенных субстратах является актуальной проблемой.

Одним из методов ускорения процессов деструкции углеводородов может стать интродукция в очищаемый объект почву совместно с микроорганизмами - нефтедеструкторами бактерий, способствующих стимуляции жизнедеятельности всего микробного сообщества.

Цель исследования. Изучение процессов биоремедиации загрязненных нефтью и нефтепродуктами объектов при использовании комплекса биопрепаратов.

Задачи исследования:

1. Изучить микробиологические процессы в отработанной отбеливающей земле в условиях лабораторного и полевого опытов при совместном использовании комплекса биопрепаратов («Ленойл» и «Азолен») и фитомелиорации для разработки технологии биорекультивации.

2. Оценить эффективность совместного применения биопрепаратов «Ленойл», «Азолен» и «Бациспектин» для биоремедиации нефтезагрязненного чернозема типичного.

3. Разработать оптимальный способ утилизации углеводородсодержащего отхода с помощью комплекса биопрепаратов «Ленойл», «Азолен» и «Бациспектин».

Научная новизна. Впервые разработана биотехнология очистки отработанной отбеливающей земли и нефтезагрязненного типичного чернозема, основанная на применении комплекса микробиологических препаратов «Ленойл» и «Азолен».

Изучены микробиологические процессы, протекающие в отработанной отбеливающей земле и черноземе типичном, загрязненных углеводородами нефти, при различных приемах рекультивации. Впервые показано, что совместное использование биопрепаратов «Ленойл» и «Азолен» способствует поддержанию более высокой плотности популяции углеводородокисляющих микроорганизмов в рекультивированных субстратах, чем при индивидуальном внесении препарата «Ленойл».

Показано, что при использовании биоудобрения «Азолен» совместно с биопрепаратом «Ленойл» деструкция нефти в рекультивируемых объектах протекает более эффективно, чем при внесении минеральных удобрений.

Впервые показана возможность утилизации углеводородсодержащего отхода нефтехимической промышленности при использовании комплекса биопрепаратов «Ленойл», «Азолен» и «Бациспектин».

Практическая значимость. Разработан и запатентован в Российской Федерации «Способ рекультивации отбеливающей земли, загрязненной нефтепродуктами», основанный на использовании комплекса биопрепаратов

«Ленойл» и «Азолен». (Заявка № 2005130840/13 (034576) от 04.10.2005 г.).
Решение Роспатента о выдаче Патента РФ от 11.10.2006.

Доказана высокая эффективность совместного использования биопрепаратов «Ленойл», «Азолен», «Бациспектин» для биологической рекультивации отработанной отбеливающей земли, загрязненной нефтепродуктами, чернозема типичного, загрязненного сырой нефтью, и утилизации углеводородсодержащего отхода переработки нефти. Разработанная биотехнология была испытана в промышленных условиях при проведении рекультивационных работ на территории НГДУ «Бугурусланнефть» ОАО «Оренбургнефть» при ликвидации нефтяного разлива и на полигоне ОАО «Орскнефтеоргсинтез».

Апробация работы. Основные результаты исследований были представлены на II Международной научной конференции «Биоразнообразие, экология, эволюция, адаптация» (Одесса, 2005), Международной научно-практической конференции «Нефтепереработка и нефтехимия – 2005» (Уфа, 2005), XIII Международной конференции «Ломоносов-2006» (Москва, 2006), IV съезде Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (Пушино, 2006), XIX Международной научно-технической конференции «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии» (Уфа, 2006).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в Перечень ВАК и патент Российской Федерации.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, экспериментальной части (3 главы), заключения, выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 113 страницах, содержит 24 таблицы и 6 рисунков. Список использованной литературы включает 165 наименований, из них 108 на русском языке.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследования служили отработанная отбеливающая земля, загрязненная нефтепродуктами, чернозем типичный, загрязненный в результате разлива сырой нефти, и углеводородсодержащий отход, отобранный из шламонакопителя ОАО «Уфаоргсинтез».

В процессах их рекультивации были использованы биопрепараты «Ленойл», «Азолен» и «Бациспектин», разработанные в Институте биологии Уфимского научного центра РАН и запатентованные в Российской Федерации. Биопрепарат нефтедеструктор «Ленойл», основанный на природном консорциуме микроорганизмов *Bacillus brevis* и *Arthrobacter species* (Пат. РФ № 2232806). Биомассу консорциума бактерий *Bacillus brevis* и *Arthrobacter species* ИБ ДТ-5 получали культивированием на жидкой среде 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; источником углерода служило дизельное топливо – 1%; вода дистиллированная – до 1 л.

Биодобрение комплексного действия «Азолен» на основе *Azotobacter vinelandii* ИБ 4 (Пат. РФ № 2224791), нарабатывали на жидкой среде 40 имеющей состав, г/л: KH_2PO_4 - 0,2; KHPO_4 - 0,8; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; FeCl_3 - 0,01; Na_2MoO_4 - 0,01; сахароза - 20 г; дистиллированная вода - до 1 л (Егоров, 1976).

Биопрепарат «Бациспектин» содержит в основе природный штамм *Bacillus sp.* 739 (Пат. РФ №1743019). В работе использовали сухую препаративную форму биопрепарата с титром $2,0 \cdot 10^6$ КОЕ/г.

Биопрепараты «Ленойл» и «Азолен» вносили в загрязненный грунт ежемесячно: в лабораторных экспериментах в дозе $2 \cdot 10^8$ КОЕ/г субстрата и из расчета 10 литров на 1 м^2 с титром 10^8 КОЕ/мл в полевых экспериментах, биопрепарат «Бациспектин» в дозе $1 \cdot 10^6$ КОЕ/г субстрата в соответствии со схемами опытов. Нарботка опытных партий микробиологических препаратов для проведения полевых экспериментов была осуществлена на ГУП «Опытный завод Академии Наук Республики Башкортостан», биопрепарата «Ленойл» в

соответствии с ТУ 9291-016-22657427-2002, биопрепарата «Азолен» в соответствии с ТУ 9291-018-22657427-2005.

Схемы опытов включали варианты как совместного, так и отдельного применения микробиологических препаратов «Ленойл» и «Азолен». Контролем служили варианты опыта без интродукции микроорганизмов.

Для наблюдения за процессом биодegradации усредненные образцы грунта анализировали ежемесячно.

В качестве фитомелиоранта была использована Суданская трава (*Sorghum sudanense*).

Микробиологический анализ образцов ризосферы растений проводили согласно стандартной методике, описанной Звягинцевым (1980).

Содержание углеводов определяли весовым методом после экстракции углеводов из навески почвы или грунта хлороформом на аппарате Сокслета по Богомолу (1984).

Фитотоксичность загрязненной и рекультивируемой почвы оценивали биотестом с помощью семян тест-растений: кресс – салата (*Lepidium sativum*) и редиса (*Raphanus sativus*, сорт красный с белым кончиком). Степень фитотоксичности грунта оценивали по соотношению числа проросших и непроросших семян и выражали в процентах по Гродзинскому (1991).

Численность основных групп микроорганизмов, участвующих в биотрансформации нефти и нефтепродуктов, определяли посевом почвенной суспензии на элективные питательные среды. Численность бактерий, усваивающих органический азот, учитывали на мясопептонном агаре, азотфиксаторов – на среде Эшби, углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) – на среде Цукамуры.

Статистическую обработку результатов проводили, используя критерий Стьюдента на 5% уровне значимости. Полученные экспериментальные данные, были обработаны на персональном компьютере с помощью программы Excel-2000.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. РЕКУЛЬТИВАЦИЯ ОТРАБОТАННОЙ ОТБЕЛИВАЮЩЕЙ ЗЕМЛИ, ЗАГРЯЗНЕННОЙ НЕФТЕПРОДУКТАМИ, С ПОМОЩЬЮ КОМПЛЕКСА БИОПРЕПАРАТОВ И ФИТОМЕЛИОРАЦИИ

В модельных экспериментах изучен процесс биорекультивации отработанной отбеливающей земли с помощью комплекса биопрепаратов «Ленойл» и «Азолен». Концентрация нефтепродуктов в отбеливающей земле составляла 18 мас. %.

В таблице 1 представлены данные о динамике биодegradации нефтепродуктов в отбеливающей земле. Показано, что при использовании биопрепарата «Ленойл» степень degradation загрязнителя составила 55%, при внесении биоудобрения «Азолен» – 27%, на фоне минеральных удобрений убыль углеводов нефти под действием микроорганизмов биопрепарата «Ленойл» увеличилась до 69%. Внесение биоудобрения «Азолен» более эффективно сказывалось на увеличении degradation нефтепродуктов, чем использование минеральных удобрений. В варианте совместного применения микробиологических препаратов «Ленойл» и «Азолен» степень degradation составляла 78% за 150 суток, что статистически достоверно превышает значение, полученное в варианте с внесением минеральных удобрений.

Наиболее высокая скорость утилизации углеводов была зарегистрирована в первый месяц во всех вариантах опыта. За это время из субстрата удалялось 20-40% углеводов. В последующие месяцы процесс очистки замедлялся. Возможно, это обусловлено быстрой деструкцией парафиновых фракций и доминированием к концу инкубационного периода в составе остаточного загрязнения тяжелых ароматических фракций, труднодоступных для усваивающих углеводороды микроорганизмов.

Таблица 1

Степень биодegradации нефтепродуктов при использовании различных приемов рекультивации отработанной отбеливающей земли

Вариант опыта	Степень биодegradации, %				
	30 суток	60 суток	90 суток	120 суток	150 суток
Контроль (ОЗ) – без интродукции микроорганизмов	1±0,4	2±0,3	3±0,5	3±1,1	5±1,7
ОЗ + минеральные удобрения	5±1,6	6±1,4	13±6,57	13±4,1	15±6,56
ОЗ + Азолен	21±3,2	21±7,45	23±7,45	26±3,1	27±1,5
ОЗ + Ленойл	32±4,3	35±5,11	37±4,1	48±2,4	55±8,9
ОЗ + Ленойл + минеральные удобрения	32±6,57	39±6,56	43±8,95	55±2,3	69±1,2
ОЗ + Ленойл + Азолен	37±3,3	40±4,95	45±1,8	51±8,95	78±3,5

Примечание: ОЗ - отбеливающая земля

Изучение динамики численности углеводородокисляющих микроорганизмов показало, что совместное применение в процессе рекультивации биопрепарата «Ленойл» и биоудобрения «Азолен» позволило поддерживать численность углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) на высоком уровне. Увеличение количества аборигенных УОМ отмечался и при индивидуальном применении биоудобрения «Азолен». Стимулирующее влияние внесения различных видов бактерий р. *Azotobacter* на самоочищение нефтезагрязненной почвы было отмечено и другими авторами (Градова, 2003). Однако, несмотря на стимуляцию естественной нефтеокисляющей микрофлоры в результате применения биоудобрения «Азолен», введение в загрязненную экосистему активных УОМ биопрепарата «Ленойл» более эффективно, о чем свидетельствуют данные по биодegradации углеводов.

Определение фитотоксичности рекультивируемой отбеливающей земли показало, что применение комплекса микробиологических препаратов «Ленойл» и «Азолен» позволяет за 150 суток почти полностью нейтрализовать

токсичность загрязненного грунта для растений. Всхожесть семян редиса (*Raphanus sativus*) в этих вариантах опыта составила 96%.

Таким образом, совместное использование биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл» и биоудобрения «Азолен», на первом, микробиологическом этапе биоремедиации отработанной отбеливающей земли, позволило снизить содержание остаточных углеводов в грунте с $181 \pm 1,2$ г/кг до $3,9 \pm 0,8$ г/кг и дало возможность перейти к этапу фитомелиорации.

Для проведения фитомелиорации была выбрана Суданская трава (*Sorghum sudanense*), т.к. она характеризуется высокой устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды (Соловьев, 1967; Мукатанов, Чанышев, 2006). Кроме того, при проверке Суданской травы на устойчивость к нефтяному загрязнению, были получены положительные результаты - всхожесть семян при 30% нефтяном загрязнении составила 36,6%.

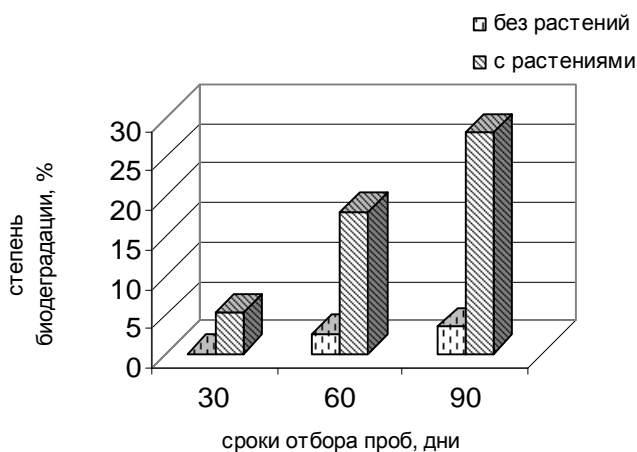


Рис. 1. Биодegradация нефтепродуктов в отбеливающей земле при фитомелиорации Суданской травой (*Sorghum sudanense*)

Как показали результаты лабораторного эксперимента, посев Суданской травы положительно сказывался на процессе дальнейшей биодegradации загрязнителя. Содержание остаточных нефтепродуктов в отбеливающей земле

под посевами Суданской травы снизилось на 28% за 90 суток, тогда как без посева растений степень биодegradации составила лишь 3,4% (рис. 1).

Максимальная численность микроорганизмов, в том числе и УОМ, отмечена в ризосфере растений, что свидетельствует о создании оптимальных условий для их развития и хорошо согласуется с динамикой процесса деструкции углеводов (табл. 2).

Таблица 2

Динамика численности микроорганизмов в отбеливающей земле при фиторемедиации (млн. КОЕ/г)

Контроль (без растений)			Почва между растениями			Ризосфера		
30 суток	60 суток	90 суток	30 суток	60 суток	90 суток	30 суток	60 суток	90 суток
Гетеротрофы								
0,82±0,02	0,91±0,04	1,30±0,29	3,00±0,36	9,60±0,37	45,0±2,9	78,0±1,4	120±19	9300±100
Олигонитрофилы								
0,40±0,28	0,98±0,04	0,36±0,05	3,10±0,27	4,20±0,31	27,0±5,1	13,0±1,1	85,0±2,5	260±12
УОМ								
0,16±0,01	0,37±0,03	1,20±0,31	9,80±0,16	12,0±1,9	86,0±1,7	180±21	280±31	7900±340

Результаты лабораторного эксперимента показали, что Суданская трава является эффективным фитомелиорантом отбеливающей земли, загрязненной низкими концентрациями нефтепродуктов.

Полученные в лабораторных условиях результаты нашли свое подтверждение и в условиях полигона промышленных отходов ОАО «Орскнефтеоргсинтез».

Динамика дегradации нефтепродуктов была сходной с таковой выявленной в лабораторном эксперименте. Самая значительная убыль нефтепродуктов выявлена при совместном применении биопрепаратов «Ленойл» и «Азолен», она составила 69%, что в 1,6 выше, чем при использовании только биопрепарата «Ленойл» (рис. 2).

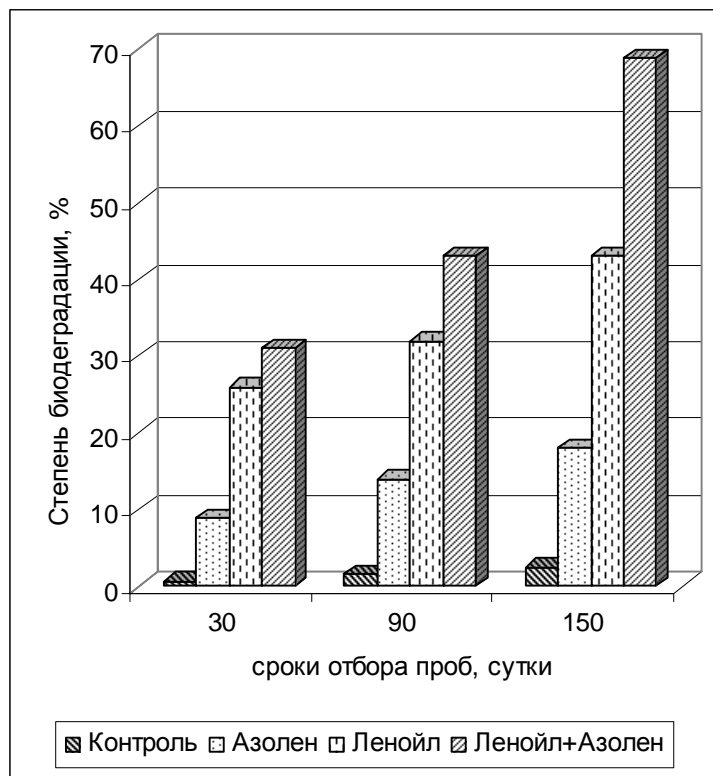


Рис. 2. Степень биодegradации нефтепродуктов в рекультивируемой отбеливающей земле в полевом эксперименте

Микробиологический анализ показал, что наибольшая численность углеводородокисляющих микроорганизмов выявляется в варианте комплексного внесения биопрепаратов (рис. 3.)

Использование разработанной технологии биоремедиации нефтезагрязненной отбеливающей земли позволило значительно снизить его фитотоксичность. После 150 суток рекультивации токсическое воздействие нефтяного загрязнения на всхожесть семян редиса максимально снизилось в образцах, обработанных комплексом биопрепаратов, что свидетельствует об удалении наиболее токсичных нефтяных компонентов (всхожесть семян составила 85 %).

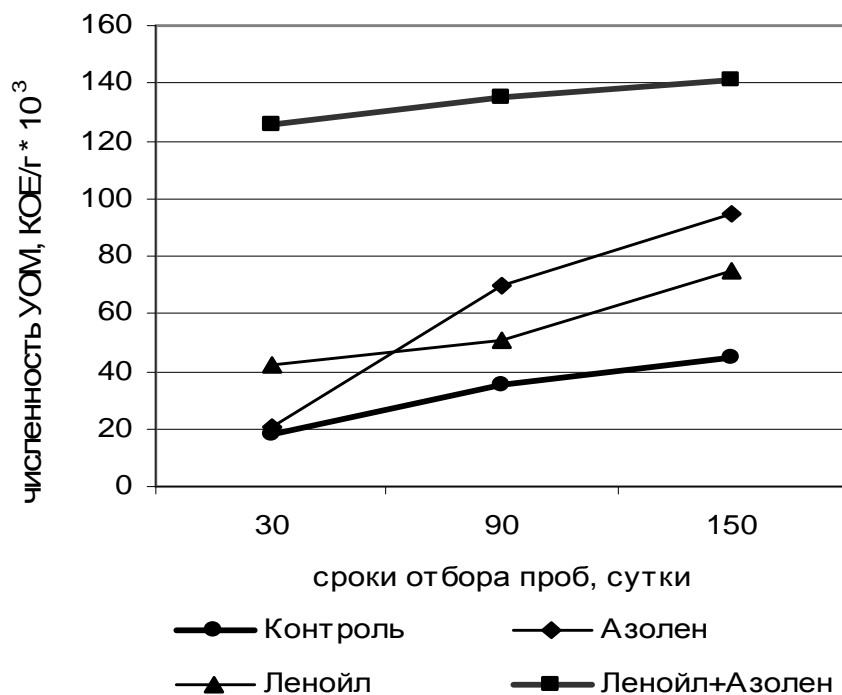


Рис. 3. Динамика численности углеводородокисляющих микроорганизмов в отбеливающей земле в процессе ее ремедиации

Полученные в лабораторных и подтвержденные в полевых условиях результаты, показывающие высокую эффективность комплекса биопрепаратов «Ленойл» и «Азолен» для очистки отработанной отбеливающей земли, позволили создать «Способ рекультивации отбеливающей земли, загрязненной нефтепродуктами» (Решение Роспатента о выдаче Патента РФ от 11.10.2006).

2. РЕКУЛЬТИВАЦИЯ ЧЕРНОЗЕМА ТИПИЧНОГО, ЗАГРЯЗНЕННОГО СЫРОЙ НЕФТЬЮ

В лабораторном эксперименте оценивали эффективность совместного использования биопрепаратов «Ленойл», «Азолен», «Бациспектин» для биоремедиации чернозема типичного, загрязненного сырой нефтью. Содержание нефти в отобранных пробах составляло 13 мас. %.

Анализ полученных данных показал положительное влияние всех испытанных биопрепаратов уже в течение первого месяца биорекультивации, но эффективность их использования была различной (табл. 3).

Таблица 3

Степень биодegradации нефти при различных приемах рекультивации чернозема типичного

Вариант опыта	Степень биодegradации, %		
	30 сутки	60 сутки	90 сутки
Контроль (НЗП)- без интродукции микроорганизмов	1,0±0,1	1,5±2,3	6,9±1,8
НЗП + Азолен	6,1±1,4	18,0±1,8	32,0±5,4
НЗП + Ленойл	41,5±1,5	62,0±1,2	71,0±2,6
НЗП + Ленойл+Азолен	39,2±3,6	70,7±5,6	77,0±3,5
НЗП + Бациспекцин	32,0±1,3	56,7±3,7	66,0±1,5
НЗП + Ленойл+Бациспекцин	53,0±3,4	60,7±6,3	82,3±1,3
НЗП + Бациспекцин+Азолен	26,1±2,8	55±5,1	67,9±1,7
НЗП+ Ленойл+Азолен+Бациспекцин	55,2±1,2	75,3±4,2	91,5±2,5

Примечание: НЗП – нефтезагрязненная почва

Оптимальным для дegradации углеводов явилось совместное применение трех биопрепаратов «Ленойл», «Азолен» и «Бациспекцин», при этом убыль нефти к концу эксперимента составила - 91,5 %, что в 1,2 раза превысило значение показателя, достигнутое при внесении только биопрепарата «Ленойл» (71%). Биодобрение «Азолен» на фоне «Ленойла» позволило повысить эффективность процесса до 77%, а совместное применение биопрепарата «Ленойл» и «Бациспекцин» до 82,3 %.

Анализ численности микроорганизмов показал, что применение в процессе рекультивации биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл» положительно сказывалось на численности УОМ. Очевидно, возрастание количества УОМ происходило за счет интродукции микроорганизмов, входящих в «Ленойл», во всех вариантах опытов с этим биопрепаратом, численность УОМ возросла – до 10^9 через 90 суток (табл.4).

Внесение биодобрения «Азолен» и биопрепарата «Бациспекцин» также позволило повысить количество микроорганизмов, участвующих в трансформации углеводов нефти, по-видимому, это связано как со стимуляцией аборигенной углеводородокисляющей микробиоты (варианты

опыта: НЗП + Азолен; НЗП + Бациспектин), так и с улучшением условий для микроорганизмов, составляющих основу биопрепарата «Ленойл» (варианты опыта: НЗП + Ленойл + Азолен; НЗП + Ленойл + Бациспектин).

Таблица 4

Динамика численности углеводородокисляющих микроорганизмов при различных приемах рекультивации чернозема типичного

Вариант опыта	Численность углеводородокисляющих микроорганизмов, КОЕ/г * 10 ⁶		
	30 сутки	60 сутки	90 сутки
Контроль (НЗП) - без интродукции микроорганизмов	5,0±1,3	11,4±1,3	19,5±3,2
НЗП + Ленойл	291±16	1185±38	3110±56
НЗП + Азолен	181±6	390±26	1280±18
НЗП + Ленойл+Азолен	350±18	870±17	5100±38
НЗП + Бациспектин	131±8	580±11	1480±11
НЗП + Ленойл+Бациспектин	370±4	1800±10	3800±110
НЗП + Бациспектин+Азолен	119±2	918±18	1410±44
НЗП + Ленойл+Азолен+Бациспектин	310±18	3110±3	7110±86

Таблица 5

Динамика численности олигонитрофилов в черноземе типичном, при различных приемах его рекультивации

Вариант опыта	Численность олигонитрофилов, КОЕ/г* 10 ⁶		
	30 сутки	60 сутки	90 сутки
Контроль (НЗП)- без интродукции микроорганизмов	4,0±1,4	4,1±1,4	8,1±1,3
НЗП + Ленойл	18±2	19±6	68±11
НЗП + Азолен	168±11	600±11	1100±56
НЗП + Ленойл+Азолен	53 ±14	31±7	680±26
НЗП + Бациспектин	58±7	71±18	210±18
НЗП + Ленойл+Бациспектин	130±18	510±15	900±72
НЗП + Бациспектин+Азолен	780±30	810±18	1910±83
НЗП + Ленойл+Азолен+Бациспектин	900±56	1700±35	2810±31

Наибольшая численность олигонитрофилов была зафиксирована в варианте совместного использования трех биопрепаратов уже на 30 сутки и

сохранялась на высоком уровне при дальнейшей инкубации, что свидетельствует о хорошей выживаемости штамма *Azotobacter vinelandii* ИБ 4, составляющего основу биоудобрения (численность возросла - до 10^9) (табл. 5).

Совместное применение биопрепаратов «Ленойл», «Азолен» и «Бациспецин» способствовало максимальному снижению токсичности очищаемой почвы по отношению к семенам кресс-салата - через 90 суток всхожесть составила 96,6%.

Положительные результаты, свидетельствующие об эффективности совместного применения биопрепаратов «Ленойл» и «Азолен» в лабораторных исследованиях, были использованы в процессе рекультивации почвы на месте разлива нефти, произошедшего в 2002 году. Содержание нефти в загрязненной почве составляло 10 мас. %.

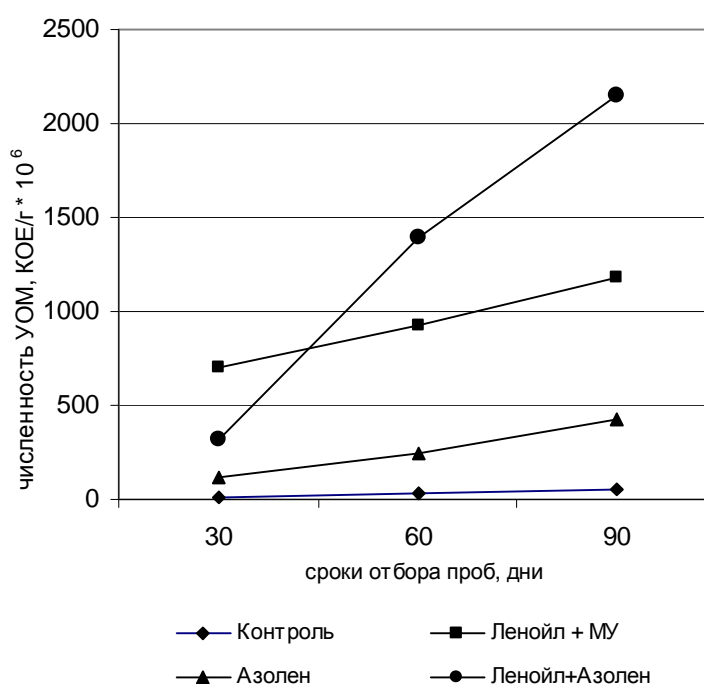
Применение для рекультивации в полевых условиях биопрепаратов «Ленойл» и «Азолен» подтвердило высокую эффективность нового способа. При обработке чернозема типичного, загрязненного сырой нефтью, биопрепаратом «Ленойл» на фоне минеральных удобрений степень биодеградации нефти через 120 суток составила 70% (табл. 6). Интенсифицировать процесс деструкции удалось за счет совместного внесения биоудобрения «Азолен» - степень биодеградации в этом варианте опыта была максимальной, и к концу вегетационного сезона деструкция нефти составила - 85,7 %, что в 1,2 раза выше, чем при использовании биопрепарата «Ленойл» на фоне минеральных удобрений. Полученные данные свидетельствуют о том, что деструкция нефти протекает более эффективно при использовании биоудобрения «Азолен», чем при внесении минеральных удобрений.

Таблица 6

Степень биодegradации нефти при различных вариантах рекультивации чернозема типичного (полевой опыт)

Вариант опыта	Степень биодegradации, %			
	30 сутки	60 сутки	90 сутки	120 сутки
Контроль (НЗП) – без интродукции микроорганизмов	4,7±1,2	7,4±0,7	13,8±2,3	16,6±1,8
НЗП + Азолен	10,9±1,9	18,8±1,8	25,7±5,1	37,6±1,8
НЗП + Ленойл + минеральное удобрение	27,2±2,8	41,2±3,6	63,7±1,0	70,0±0,8
НЗП + Ленойл + Азолен	27,5±5,1	51,1±3,2	54,9±2,0	85,7±2,1

Данные по определению численности УОМ в полевых условиях согласуются с результатами, полученными в ходе лабораторного эксперимента. При совместном внесении биоудобрения «Азолен» и биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл» количество УОМ возрастало в большей степени, и сохранялось на высоком уровне на протяжении всего периода рекультивации (рис. 4).



Примечание: МУ – минеральное удобрение

Рис. 4. Динамика численности углеводородокисляющих микроорганизмов чернозема типичного при ремедиации

После проведенных рекультивационных мероприятий токсическое воздействие нефтяного загрязнения на всхожесть семян кресс-салата (*Lepidium sativum*) максимально снизилось в образцах, обработанных комплексом биопрепаратов, что свидетельствует об удалении наиболее токсичных нефтяных компонентов и подтверждает факт максимального снижения содержания остаточных углеводов нефти в этом варианте опыта (всхожесть семян составила 73%).

Таким образом, в ходе лабораторных и полевых исследований показано, что использование комплекса биопрепаратов «Азолен», «Бациспектин» и «Ленойл» для очистки чернозема типичного от нефтяного загрязнения позволяет активизировать микробиологическую деградацию поллютантов и снизить фитотоксичность нефтезагрязненного чернозема типичного по отношению к растениям. Степень биодеструкции углеводов при начальной концентрации нефти в почве, составляющей 10 - 13 мас. %, за 120 суток с использованием комплекса биопрепаратов достигла 85,7- 91,5%.

3. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ УТИЛИЗАЦИИ УГЛЕВОДОРОДСОДЕРЖАЩЕГО ОТХОДА С ПОМОЩЬЮ КОМПЛЕКСА БИОПРЕПАРАТОВ

В лабораторных условиях исследована возможность применения комплекса биопрепаратов для ускорения разложения углеводов в отходах шламонакопителей предприятия ОАО «Уфаоргсинтез».

Углеводородсодержащие отходы смешивали в различных концентрациях со структурообразователями (опилки – 20%; фосфогипс – 20%; типичный чернозем до содержания нефтепродуктов в субстрате - 5 мас. % - (Фон I), 10 мас. % - (Фон II), и 20 мас. % - (Фон III)).

Интродукция в субстрат (Фон I) микроорганизмов биопрепарата «Ленойл» позволила снизить содержание нефтепродуктов на 37,9% (табл. 7.). Внесение биопрепарата «Бациспектин» совместно с биопрепаратом «Ленойл» стимулировало процесс биодegradации, при этом убыль нефтепродуктов

составила 45,9 %. Обнаружено, что деструкция углеводов протекает намного эффективнее в вариантах совместного использования биопрепаратов, чем при их индивидуальном применении. Степень деструкции углеводов в оптимальном варианте составила 57,6 %.

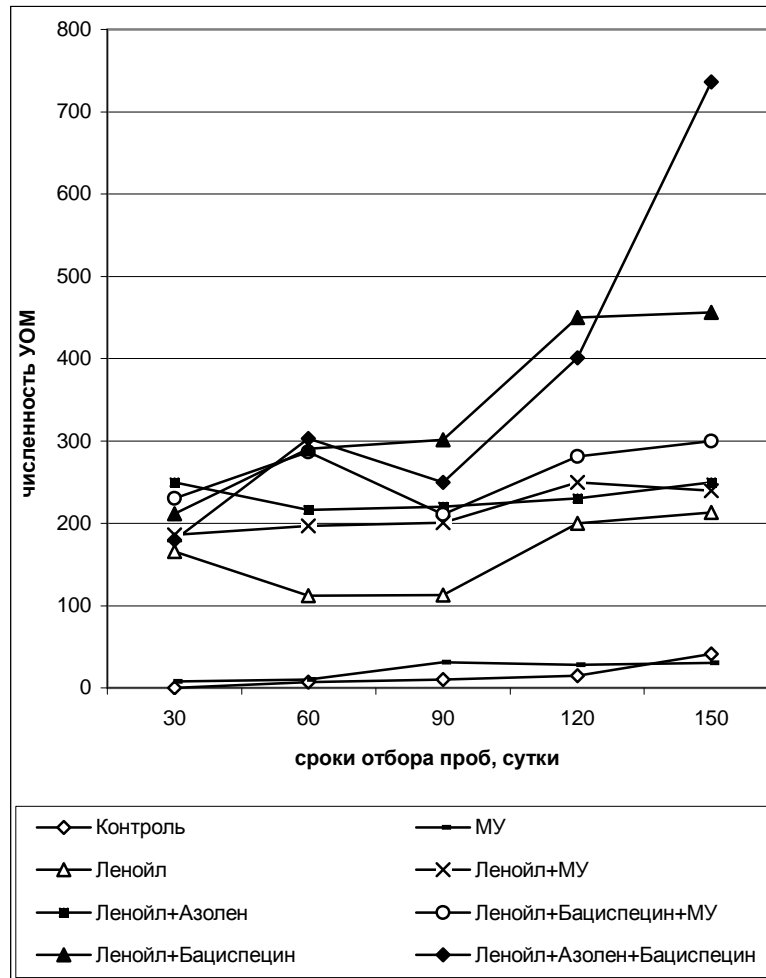
Аналогичная тенденция была характерна и для субстратов с более высоким содержанием загрязнителя (Фон II - 10 % и Фон III - 20 %). Однако, при максимальном уровне загрязнения (Фон III), деструкция углеводов была не так эффективна, к концу эксперимента она составляла 47,4 %, а при 10% концентрации углеводов (Фон II), разложилось 50,8 % загрязнителя.

Таблица 7

Биодеградация нефтепродуктов в утилизируемом субстрате, содержащем 5 % нефтепродуктов

Вариант опыта	Степень биодеградации, %				
	30 сутки	60 сутки	90 сутки	120 сутки	150 сутки
Контроль (Фон I)- без интродукции микроорганизмов	0±0	0,3±0,1	0,8±0,2	1,4±0,9	4,0±1,2
Фон I+минеральные удобрения	1,3±0,1	1,4±0,3	2,0±0,3	2,1±0,4	4,3±2,1
Фон I+Ленойл	12,1±1,3	13,7±1,4	20,6±2,4	33,7±2,3	37,9±3,2
Фон I+Ленойл+минеральные удобрения	17,8±2,1	25,0±3,2	27,7±3,7	35,7±2,4	38,5±1,5
Фон I+Ленойл+Бациспекцин	15,1±1,3	21,6±3,6	29,4±2,5	38,9±3,2	45,9±4,3
Фон I + Ленойл + Бациспекцин + минеральные удобрения	17,4±1,8	24,8±1,3	31,1±3,2	35,2±4,3	47,4±2,6
Фон I+Ленойл+Азолен	17,0±1,6	20,3±2,5	24,7±2,1	35,5±3,8	42,4±4,2
Фон I +Ленойл+Азолен+Бациспекцин	18,4±2,3	30,2±3,2	45,7±4,3	51,2±4,1	57,6±3,1

Анализ динамики численности углеводородокисляющих микроорганизмов показал, что после периода адаптации (120 суток) максимальное развитие этой группы микроорганизмов достигалось при комплексном внесении биопрепаратов «Ленойл», «Азолен» и «Бациспекцин» в субстрат, содержащий 5 % нефтепродуктов (рис. 5). Сходная динамика выявлена и при использовании комплекса биопрепаратов для утилизации более загрязненных субстратов (Фон II и Фон III), однако, численность УОМ в них была существенно ниже.



Примечание: МУ – минеральное удобрение

Рис. 5. Динамика численности УОМ при различных приемах утилизации субстрата, содержащего 5% нефтепродуктов (млн. КОЕ/г)

Подтверждением детоксикации субстрата под влиянием комплекса биопрепаратов явилось увеличение всхожести семян кресс-салата (*Lepidium sativum*), которая в конце эксперимента составила – 89 % - Фон I, 70 % -Фон II, и 51% - Фон III.

ВЫВОДЫ

1. Разработана новая технология биологической рекультивации отработанной отбеливающей земли, загрязненной нефтепродуктами, на основе комплекса биопрепаратов «Ленойл» и «Азолен». Применение этой технологии позволило увеличить степень биодеструкции углеводов за 150 суток до 78 мас. %.

2. Показана эффективность использования Суданской травы (*Sorghum sudanense*) для проведения фитомелиоративного этапа биорекультивации отработанной отбеливающей земли. Посев Суданской травы позволил за 90 суток снизить содержание остаточных углеводов с 3,9 г/кг до 2,8 г/кг. При этом степень биодegradации составила 28 мас. %.

3. В лабораторных и полевых условиях доказана высокая эффективность совместного применения комплекса микробиологических препаратов «Ленойл» и «Азолен» для биорекультивации чернозема типичного, загрязненного сырой нефтью. Степень биодеструкции нефти за 120 суток составила 85,7 - 91,5 мас. %.

4. Установлено, что использование комплекса биопрепаратов «Ленойл» и «Азолен» для деструкции углеводов в рекультивируемых субстратах, способствует поддержанию более высокой численности углеводородокисляющих микроорганизмов, чем при индивидуальном применении биопрепарата «Ленойл».

5. Разработан способ утилизации углеводородсодержащего отхода нефтехимической промышленности с использованием комплекса микробиологических препаратов «Ленойл», «Азолен» и «Бациспектин» и структурообразователей (чернозем типичный, опилки, фосфогипс).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Биккинина А.Г., Логинов О.Н. Биологическая ремедиация почв, загрязненных нефтепродуктами, с использованием комплекса биопрепаратов // Материалы II Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биоразнообразие, экология, эволюция, адаптация», посвященной 140-летию Одесского национального университета им. И.И.Мечникова (28.03-1.04.2005 г., г. Одесса). Одесса.-2005.-С. 109.
2. Логинов О.Н., Биккинина А.Г., Силищев Н.Н., Бойко Т.Ф., Галимзянова Н.Ф. Способ рекультивации отбеливающей земли, загрязненной нефтепродуктами // Заявка № 2005130840/13 (034576) от 04.10.2005 г. Решение Роспатента о выдаче Патента РФ от 11.10.2006.
3. Бакаева М.Д, Биккинина А.Г., Нуртдинова Л.А., Н.Н. Силищев, Усманов М.Ф., Логинов О.Н. Опыт рекультивации загрязненной углеводородами отработанной отбеливающей глины с применением биопрепарата «Ленойл» // Башкирский химический журнал, 2005. - Т. 12, № 3. – С. 123-127.
4. Биккинина А.Г., Логинов О.Н., Силищев Н.Н. Рекультивация почв, загрязненных нефтепродуктами, с использованием комплекса биопрепаратов // Материалы Международной научно-практической конференции «Нефтепереработка и нефтехимия – 2005» (25.05.2005 г., г. Уфа). Уфа.-2005.- С. 337-338.
5. Биккинина А.Г., Логинов О.Н. Использование биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл» и биоудобрения «Азолен» при рекультивации отработанной отбеливающей земли // Тезисы докладов XIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006» (12-15.04.2006 г., Москва). М., МГУ, Секция биологии.-2006.- С. 25-26.
6. Биккинина А.Г, Логинов О.Н., Силищев Н.Н., Бакаева М.Д., Бойко Т.Ф., Галимзянова Н.Ф. Повышение эффективности процесса биоремедиации отработанной отбеливающей земли, загрязненной углеводородами, при совместном использовании комплекса биопрепаратов «Ленойл» и «Азолен» // Биотехнология, 2006. - №5. – С. 57-62.

7. Логинов О.Н., Биккинина А.Г., Силищев Н.Н., Назаров А.М. Новые биопрепараты для рекультивации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами // Материалы IV съезда Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова: Пущино. – М.:МАКС Пресс, 2006.- С. 140-141.
8. Биккинина А.Г., Логинов О.Н., Силищев Н.Н. Использование суданской травы (*Sorghum sudanense*) для фиторемедиации отработанной отбеливающей земли, загрязненной нефтепродуктами // Материалы XIX Международной научно-технической конференции «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии» (2-4.10.2006 г., Уфа). Уфа.-2006.-Т. 1.-С. 35-36.
9. Биккинина А.Г., Логинов О.Н., Силищев Н.Н., Бакаева М.Д., Галимзянова Н.Ф., Бойко Т.Ф., Усманов М.Ф. Разработка технологии биорекультивации промышленных отвалов отбеливающей земли, загрязненной нефтепродуктами, с использованием комплекса биопрепаратов // Экология и промышленность России, 2007. – №2. – С. 2 – 3.
10. Биккинина А.Г., Бакаева М.Д., Логинов О.Н., Силищев Н.Н. Фиторемедиация отработанной отбеливающей земли, загрязненной нефтепродуктами, с помощью суданской травы // Нефтяное хозяйство, 2007. - №3. - С. 115 – 116.

Подписано в печать 12.04.2007. Формат 60x84 1/16.
Бумага ксероксная. Печать ризографическая. Тираж 100 экз. Заказ 099.
Гарнитура «Times New Roman». Отпечатано с готовых оригинал-макетов
в типографии «ПЕЧАТНЫЙ ДОМЪ». ИП ВЕРКО.
Объем 1,4 п.л. Уфа, Карла Маркса12/4,
т/ф: 2727-600, 2729-123