**ИЗУЧЕНИЕ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ БИОПРЕПАРАТА-
НЕФТЕДЕСТРУКТОРА «АРКОЙЛ»****DEGRADATION OF OIL BY BACTERIAL PRODUCT «ARKOIL»****ЭРКЕНОВА М.И.****ERKENOVA M.I.***ООО «Нижегородский Институт
Прикладных Технологий»**Nizhny Novgorod Institute of Applied
Technologies**e_malika@mail.ru**e_malika@mail.ru**doi: 10.18411/pivsn-6**idsp: pivsn-6***АННОТАЦИЯ**

В статье рассмотрена нефтеокисляющая способность биологического препарата-нефтедеструктора в условиях использования разных источников питания и временем проведения эксперимента. В эксперименте показано снижение содержания общих алканов и полиароматических углеводородов.

Ключевые слова: нефть, нефтяное загрязнение, биопрепарат, рекультивация.

ABSTRACT

This paper presents the oil degradation ability of bacterial product under the conditions of using different elements sources and the time of the experiment. The experiment showed a decrease in the content of total alkanes and polyaromatic hydrocarbons.

Key words: oil, oil pollution, biological product, recultivation

ВВЕДЕНИЕ

Нефть и различные нефтепродукты являются наиболее распространёнными на сегодняшний день загрязнителями окружающей среды. В силу различных причин, загрязнения происходят как в местах добычи, так и в местах переработки углеводородного сырья. Особенно опасны для окружающей природной среды аварийные ситуации, возникающие на магистральных нефтепроводах и в районах эксплуатации нефтяных скважин. Еще один источник возможного загрязнения окружающей среды - отходы, бурения и переработки сырья, и как правило, долгое время хранящиеся на предприятиях в шламонакопителях и амбарах.

Эти отходы и большие площади загрязненных нефтью и нефтепродуктами земель являются широко распространенным проявлением накопленного экологического ущерба в РФ, и его ликвидация и рекультивация земель являются одной из задач Федеральной целевой программы «Ликвидация накопленного экологического ущерба» на 2014 – 2025 годы. Все вышеизложенное указывает на необходимость и актуальность разработки эффективных и экологически безопасных способов восстановления окружающей среды после нефтяного загрязнения.

Очищение почвы от нефтепродуктов (НП) и переработка различных нефтесодержащих отходов – это сложный физико-химический и биохимический процесс, скорость и направленность которого зависят от ряда факторов, таких как свойства почв и отходов, исходная концентрация загрязнителя, активность микроорганизмов, влажность субстрата и ряда других факторов. Наиболее полно требованиям экологичности отвечают технологии биоремедиации почв с использованием специально подобранных штаммов микроорганизмов в составе

биопрепаратов. Российский рынок биопрепаратов активно развивается, каждый год выпускаются новые биопрепараты. Один из биопрепаратов, представленных на российском рынке и широко используемых, является - нефтеструктор «Аркойл».

Цель работы заключалась в изучении нефтеокисляющей способности биопрепарата «Аркойл» в лабораторных условиях.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования был биологический препарат-нефтеструктор «Аркойл». Биопрепарат «Аркойл» представляет собой микробную массу живых штаммов углеводородоокисляющих микроорганизмов родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*. Количество живых клеток $3 \cdot 10^9$ в 1 мл.

В ФГБУН «Научно-исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства» проведена добровольная токсиколого-гигиеническая оценка биопрепарата-нефтеструктора «Аркойл», которая свидетельствует об 4 классе опасности биопрепарата-нефтеструктора «Аркойл» (мало опасный продукт) на основании СанПиН 1.2.2584-10. В той же организации проведено биотестирование препарата на интегральную токсичность.

Также на проект технической документации «Биологический препарат-нефтеструктор «Аркойл» и технологии применения биологического препарата-нефтеструктора «Аркойл» получено положительное заключение государственной экологической экспертизы.

Биопрепарат производится ООО «Нижегородский институт прикладных технологий» согласно ТУ 9291-015-93754080-2016.

Для исследования была использована сырая нефть Самотлорского месторождения. В качестве источника элементов питания применяли азотную основу Yeast Nitrogen Base фирмы Fluka или Азофоску (N:P:K = 15:15:15). Основными компонентами, входящими в состав азотной основы Yeast Nitrogen Base, являются инозитол, дигидроортофосфат калия, борная кислота, сульфаты магния и аммония.

Эксперимент проводили в стерильных колбах с резиновыми пробками объемом 500 мл. Колбы ставили на шейкер на 200-220 оборотов в минуту при температуре 20°C. Было заложено 4 варианта эксперимента, к каждому варианту дополнительно закладывался контроль без внесения биопрепарата-нефтеструктора. Продолжительность эксперимента – 10 и 15 дней. В Таблице №1 представлена схема проведения эксперимента.

Таблица №1

Схема проведения эксперимента

№ варианта	Описание варианта	Время, сутки
1	100 мл воды, 2 г нефти, 1 г «Аркойл», 0,67 г азотной основы Yeast Nitrogen Base.	10
2	100 мл воды, 2 г нефти, 1 г «Аркойл», 0,67 г азотной основы Yeast Nitrogen Base.	15
3	100 мл воды, 2 г нефти, 1 г «Аркойл», 1 г Азофоски.	10
4	100 мл воды, 2 г нефти, 1 г «Аркойл», 1 г Азофоски.	15

Нефтеокисляющую способность «Аркойл» оценивали по уменьшению содержания *n*-алканов и фракции полиароматических углеводородов нефти (ПАУ), а также по возрастанию индекса биологической деградации, выраженном в соотношении концентрации изо-алканов (пристана и фитана) к концентрации *n*-алканов C₁₇H₃₆ и C₁₈H₃₈.

Содержание НП определяли по ГОСТ 31953-2012 «Межгосударственный стандарт. Вода. определение нефтепродуктов методом газовой хроматографии». Для калибровки по индивидуальным алканам здесь используется стандартная смесь *n*-

алканов C_{12} – C_{36} . Построение калибровочных кривых и расчет концентрации НП и алканов в пробах производится с помощью программы Chemstation.

ПАУ определяли по ПНД Ф 14.1:2.4.70-96 «Методика измерений массовых концентраций полициклических ароматических углеводородов в питьевых, природных и сточных водах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии» на хроматографе Agilent 1200 с флуориметрическим детектором, колонка Диасфер 110- C_{18} , длина 250 мм, диаметр 4 мм, размер частиц 5 микрон.

Для калибровки по индивидуальным ПАУ используется стандартная смесь ПАУ в ацетонитриле. Выстраивалась калибровочная кривая в зависимости от площадей пиков индивидуальных ПАУ от их концентрации в стандартном растворе. Построение калибровочной кривой и расчет концентрации ПАУ в пробах производится с помощью программы Chemstation.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Снижение содержания алканов. После проведения эксперимента определялась сумма алканов, содержание алканов с длиной цепи C_{12} – C_{36} и содержание пристана и фитана.

Содержание алканов между 4 вариантами контроля отличается незначительно и варьирует от 67,5 до 78,0 мг. Максимально содержание алканов с длиной цепи C_{14} – C_{24} (среднекипящая фракция) и составляет 84% от суммы алканов (рисунок.1).

Рисунок.1. Содержание алканов в контрольных вариантах.

Рисунок.2. Содержание алканов в вариантах эксперимента.

После проведения эксперимента содержание алканов снизилось во всех вариантах опыта по сравнению с контролем, что свидетельствует о проявлении нефтеокисляющей способности биопрепарата. В Варианте №1 и Варианте №3 (длительность эксперимента 10 дней) сумма алканов составила 49,3 мг и 46,5 мг, что на 30,9% и 34,9% меньше, чем в аналогичных вариантах контроля (рисунок 2.). В Варианте №2 и Варианте №4 (длительность эксперимента 15 дней) сумма алканов составила 13,3 мг и 24,1 мг, что на 81,3% и 66,1% меньше, чем в аналогичных вариантах контроля.

Максимально подверглись деградации алканы с длиной цепи C_{14} - C_{24} , что подтверждается литературными данными (Петров, 1984, Федоренко, 2016). Таким образом, максимальное снижение содержания алканов, на 81,3%, наблюдается в Варианте №2, с временем биодеструкции 15 суток и добавлением азотной основы Yeast Nitrogen Base. Использование азотной основы (Варианты №1 и №2) в качестве источника питания микроорганизмов, по сравнению с Азотосодержащей (Варианты №3 и №4), привело к большему снижению содержания алканов, что объясняется наличием в составе как минеральных, так и органических соединений.

Изучение состава алканов также позволило определить степень биодегradации нефти. Так, для оценки деградации НП рассчитывали углеводородный индекс (УИ) - отношение суммы пристана и фитана (i - C_{17} и i - C_{18} , соответственно) к сумме n -алканов (C_{17} и C_{18}), характеризующий деградацию исходных НП (Другов, Родин, 2007, Frysinger et al., 2011, Каталитические, сорбционные...2013). Для контрольных вариантов УИ варьирует от 0,75 до 0,78. Во всех вариантах эксперимента величина УИ возросла и составила 0,94, 3,97, 0,99, 1,62 в Вариантах №1,2,3,4 соответственно. Увеличение значений УИ по сравнению со значением для контрольных вариантов, как правило, свидетельствует о ферментативной деградации углеводородов клетками микроорганизмов. Величина УИ максимальная в Варианте №2, что также подтверждается максимальной убылью алканов в этом варианте эксперимента.

Снижение ПАУ. После проведения эксперимента во всех вариантах определяли 13 ПАУ: флуорен, аценафтен, фенантрен, антрацен, флуорантен, пирен, бензо(а)антрацен, хризен, бензо(б)флуорантен, бензо(к)флуорантен, бензо(а)пирен, дибенз(а,һ)антрацен, бензо(ɡ,һ,і)перилен.

Рисунок.3. Снижение содержания ПАУ в вариантах эксперимента. Цифрами обозначен процент снижения ПАУ.

ПАУ являются наиболее трудноразлагаемыми углеводородами, обладают канцерогенными и токсичными свойствами, разлагаются представителями родов *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Brevibacillus* (Панов и др.,

2013; Кусегова, 2006). Низкая биodeградируемость ПАУ связана с низкой растворимостью, которая снижается с увеличением числа ароматических колец в молекуле ПАУ (Ленёва и др., 2009).

Максимальное снижение суммы ПАУ произошло в Варианте №2 и составило 39,6% за 15 дней. В Варианте №4 с использованием Азофоски содержание суммы ПАУ снизилось на 38%. Содержание триароматических углеводов снизилось на 51-95% в разных вариантах эксперимента, антрацен подвергся деградации практически полностью. ПАУ с 4 и 5 ароматическими кольцами деградировали в меньшей степени.

Заключения

Во всех вариантах эксперимента наблюдается проявление нефтеокисляющей способности препарата, выраженной в уменьшении содержания алканов и ПАУ, увеличении УИ (индекса биологической деградации). Наиболее значительное проявление действия препарата-нефтедеструктора наблюдается в варианте 15-суточного эксперимента с азотной основой, где *n*-алканы разложились на 81,3% по отношению к контролю (средним значениям), содержание ПАУ снизилось на 39,6% по отношению к контролю, индекс биологической деградации возрос до 3,97 против 0,75 в контрольном варианте. Таким образом, биопрепарат-нефтедеструктор «Аркойл» обладает выраженной нефтеокисляющей способностью и соответствует заявленным характеристикам по нефтеразложению.

1. ГОСТ 31953-2012 «Межгосударственный стандарт. Вода. Определение нефтепродуктов методом газовой хроматографии».
2. Другов Ю.С., Родин А.А. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов, практическое руководство. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. – 270 с.
3. Каталитические, сорбционные, микробиологические и интегральные методы для защиты и ремедиации окружающей среды//Алтунина и др.; под ред. О.П. Таран, В.Н. Пармона; Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2013. - 298 с.
4. Куцера Р. Применение *Pseudomonas Putida* и *Rhodococcus* sp. путем биodeградации образцов ПАУ (S), ПХБ (S) и недр из отвала опасных отходов в Пожатках (Чешская Республика) // Rud.-geol.-naft. zb., Vol. 18, 2006. P.97 – 101.
5. Ленёва Н.А., Коломуцева М.П., Баскунов Б.П., Головлева Л.А. Деградация фенантрена и антрацена бактериями рода *Rhodococcus* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45. - №2. – С. 188-194.
6. Панов А. В., Есикова Т. З., Соколов С. Л., Кошелева И. А., Боронин А. М. Влияние загрязнения почвы на состав микробного сообщества // Микробиология, 2013, том 82, № 2, с. 239–246.
7. Петров А.А. Углеводороды нефти. – М.: Наука, 1984. -264с.
8. ПНД Ф 14.1:2.4.70-96 «Методика измерений массовых концентраций полициклических ароматических углеводородов в питьевых, природных и сточных водах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии».
9. СанПиН 1.2.2584-10 "Гигиенические требования к безопасности процессов испытаний, хранения, перевозки, реализации, применения, обезвреживания и утилизации пестицидов и агрохимикатов".
10. Федоренко В.Н. Выделение и оценка биотехнологического потенциала микроорганизмов для утилизации нефтяных загрязнений северных морей.:дис.канд. биол. наук: 03.02.03, 03.01.06- М., 2016.
11. Фрисенгер Г.С., Халл Г.Дж., Поурмонир А.Л., Бисхел Н.Н., Пикок Е.Е., Нельсон Р.Н., Редди С.М. Отслеживание и моделирование деградации 30-летнего разлива мазута с помощью комплексной двумерной газовой хроматографии // Международная конференция по нефтяным разливам. - 2011. - V. 2011. - № 1. - С.428