

УДК 579.83+631.46:579.6

## БИОРЕМЕДІАЦІЯ ЗАБРУДНЕНОГО НАФТОЮ ТА ДИЗЕЛЬНИМ ПАЛИВОМ ҐРУНТУ

Т.У. Думанська, Т.М Ногіна, В.С. Підгорський

**Біоремедіація забрудненого нафтою та дизельним паливом ґрунту.** – Т.У. Думанська, Т.М Ногіна, В.С. Підгорський. – Досліджена ефективність очищення препаратами Еколан та Родоїл забрудненого нафтою (1% та 5%) і дизельним паливом (5 %) дерново-підзолистого ґрунту. Встановлено, що використання цих препаратів супроводжується інтенсивним формуванням вуглеводнеокиснювального бактеріоценозу у ґрунті, що обумовлює високу швидкість біоремедіації. На 90 добу ступінь деструкції дизельного палива досягала 92,1-92,7%, а нафти – 85,5-88,1 % та 72,8-74,5% при 1 % і 5 % забрудненні, відповідно, що майже в 1,6 разів перевищувало ці показники у контрольному ґрунті.

**Ключові слова:** нафтові забруднення, вуглеводнеокиснювальні бактерії, біоремедіація

**Адреса:** Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, вул. Заболотного, 154, Київ, Д 03680, Україна; E-mail: dumanska@imv.kiev.ua

**The bioremediation of oil and fuel oil contamination soil.** – T.U Dumanska, T.M. Nogina, V.S.Podgorskye. – A purification efficiency of Ecolan and Rodoil preparations in sod-podzolic soil contaminated with oil (1 % and 5 %) and fuel-oil (5 %) was investigated. It was established that a usage of these preparations caused the intensive formation of the hydrocarbon-oxidizing bacterial coenosis in soil that determined a high speed of bioremediation. On the 90-th day of investigation the destruction degree of fuel-oil amounted to 92,1-92,7%, but of oil did to 85,5-88,1 % and 72,8-74,5 % under 1 % and 5 % of soil contamination accordingly. It was almost in 1.6 time exceeded the indices of control soil.

**Key words:** oil contaminations, hydrocarbon-oxidizing bacteria, bioremediation.

**Address:** Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine, 154, Zabolotno str., Kyiv, D 03680, Ukraine; E-mail: dumanska@imv.kiev.ua

Очищення ґрунту від нафти та нафтопродуктів на даний час залишається проблемою екологічної безпеки життєдіяльності людини. Техногенні забруднення вказаними речовинами негативно впливають на природні мікробні ценози ґрунту, флору та фауну і призводять до виключення із землекористування значних сільськогосподарських угідь [3-5, 10]. При забрудненні вуглеводнями підвищується гідрофобність та порушується водно-повітряний режим у ґрунті, у ньому збільшується кількість фітотоксичних форм мікроорганізмів, що негативно впливає на ріст і розвиток рослин та їх видове різноманіття [3, 5]. Відомо, що розкладання нафти і нафтопродуктів в природних умовах – процес біогеохімічний, в якому вирішальне значення має функціональна активність комплексу вуглеводнеокиснювальних мікроорганізмів, що забезпечують повну мінералізацію цих речовин до CO<sub>2</sub> і води. Тому найбільш ефективними для очищення довкілля від нафтових забруднень є мікробіологічні методи очищення, які полягають у додатковому внесенні у відкриті екосистеми активних штамів мікроорганізмів-деструкторів вуглеводнів, або біопрепаратів на їх основі, що дозволяє скоротити строки детоксика-

ції та відновлення забрудненого середовища з десятків років до декількох місяців [4, 5].

Метою роботи було дослідження ефективності очищення препаратами Еколан та Родоїл забрудненого нафтою та дизельним паливом дерново-підзолистого ґрунту.

### Матеріали і методи дослідження

В досліді використовували повітряно-сухий дерново-підзолистий ґрунт, рН якого перед початком досліджень доводили до нейтрального значення 10 % розчином вапна. Визначення рН проводили у водній суспензії ґрунту при співвідношенні ґрунт/вода 1:5 за об'ємом [11]. У ґрунт вносили окремо 1 % та 5 % нафти, або 5 % дизельного палива (ДП), після чого його ретельно перемішували і витримували впродовж 1 доби для випаровування легких фракцій. Мінеральне добриво (нітроамфоску) додавали у кількості 0,65 г/кг ґрунту при 1 % забруднювача та 2,65 г/кг – при 5 %. Підготовлений чистий і забруднений ґрунт зволожували до рівня 60 %, що підтримувався впродовж всього досліді, та розміщували по 1,5 кг у вегетаційних ємностях. Досліди по біоремедіації ґрунту проводили з використанням препара-

тів Еколан та Родойл, які включають вуглеводне-окиснювальні бактерії, сорбенти та біогенні елементи [1, 2]. Мікробний компонент препарату Еколан представлений штамми *Rhodococcus erythropolis* IMB B-7012 та *Gordonia rubropertinctus* IMB Ac-5005, а препарату Родойл – вказаними штамми та *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7013. Препарати вносили у ґрунт з такого розрахунку, щоб кількість клітин їх мікробних компонентів становила не менш ніж  $1 \times 10^6$  кл/г ґрунту. Як контролю використовували чистий та забруднений ґрунти, в які не додавали препарати. Відбір проб ґрунту для аналізів проводили через 1, 10, 30, 60 та 90 діб від початку досліджу.

Чисельність гетеротрофних бактерій у ґрунті визначали методом граничних розведень з використанням твердого поживного середовища – м'ясо пептонного агару (МПА) [6]. Кількість вуглеводнеокиснювальних бактерій (ВОБ) визначали на рідкому мінеральному середовищу Таусона, в яке вносили 0,1 % суміші вуглеводнів (н-парафінів), як єдине джерело вуглецю та енергії [8]. Контролем слугувало вказане середовище без н-парафінів. Перше розведення (10–2) проб зразків ґрунту обробляли на установці УЗДН-1 впродовж 3 хвилин при силі току 0,40 А і частоті коливань 15 кГц [6].

Визначення вмісту вуглеводнів проводили з об'єднаної гомогенної проби зразка забрудненого ґрунту методом інфрачервоної спектроскопії на аналізаторі нафтопродуктів АН-1 з попередньою екстракцією вуглеводнів чотирьоххлористим вуглецем [7].

### Результати досліджень та їх обговорення

У зв'язку з тим, що забруднення вуглеводнями супроводжується значними змінами у структурі мікробних ценозів ґрунту, зокрема, у кількості та складі гетеротрофних і вуглеводнеокиснювальних бактерій [9, 12], ми визначали динаміку чисельності цих мікроорганізмів протягом всього періоду біоремедіації забрудненого нафтою та ДП ґрунту. Мікробіологічний аналіз чистого ґрунту показав, що чисельність гетеротрофних бактерій у ньому становила  $1,4 \times 10^7$  КУО/г ґрунту, а кількість ВОБ –  $7,2 \times 10^4$  клітин/г ґрунту. Нами встановлено, що при внесенні нафти або ДП в ґрунті відбувались поступові зміни у кількісному складі цих груп мікроорганізмів. Так, на першу добу в ґрунті з 1 % нафти чисельність ВОБ та гетеротрофних бактерій майже не змінювалась і дорівнювала  $7,9 \times 10^4$  клітин/г ґрунту та  $1,2 \times 10^7$  КУО/г ґрунту, відповідно; при забрудненні ґрунту 5,0 % нафти чисельність ВОБ залишалась на тому ж рівні ( $7,0 \times 10^4$  клітин/г ґрунту), тоді, як чисельність гетеротрофних мікроорганізмів знижувалась майже в 10 разів і становила  $2,8 \times 10^6$  КУО/г ґрунту. При забруд-

ненні ДП чисельність ВОБ і гетеротрофних бактерій складала  $6,9 \times 10^4$  клітин/г ґрунту та  $2,7 \times 10^6$  КУО/г ґрунту, відповідно.

На 10 добу чисельність ВОБ у контрольному, забрудненому нафтою та ДП ґрунті, незначно зростала. На відміну від цього, у варіантах досліджу по біоремедіації ґрунту препаратами Еколан та Родойл у цей період спостерігалось значне підвищення чисельності ВОБ до  $10^7$ - $10^8$  клітин/г ґрунту при забрудненні нафтою та до  $10^6$ - $10^7$  клітин/г ґрунту при забрудненні ДП, з наступною стабілізацією вказаних показників на близьких до цих рівнів значеннях до 60 доби спостережень. Найявність прямої корелятивної залежності чисельності вуглеводнеокиснювальних мікроорганізмів у ґрунті від концентрації забруднення відмічали і інші автори [9, 10, 12]. Кількість гетеротрофних бактерій у забрудненому ґрунті за цей період зростала в 2-5 разів. На 90 добу, коли сукцесія на вуглеводнях завершувалась – кількість ВОБ і гетеротрофних бактерій у очищеному від нафти та ДП ґрунті знизилась до рівня контрольного чистого ґрунту.

Отримані дані свідчать про те, що в процесі очищення дослідженими препаратами забрудненого нафтою та ДП ґрунту спостерігалось інтенсивне формування вуглеводнеокиснювального мікробного ценозу, важливу роль у якому, за нашими даними, відігравали штами *R. erythropolis* IMB B-7012, *G. rubropertinctus* IMB Ac-5005 та *A. calcoaceticus* IMB B-7013, інтродуковані у цей ґрунт у складі препаратів. Вживаність та конкурентоздатність цих штамів відносно аборигенної мікрофлори забрудненого вуглеводнями ґрунту підтверджена висівами проб цього ґрунту на МПА (рис. 1).

Дослідження ефективності процесу біоремедіації ґрунту препаратами Еколан та Родойл показало, що за 30 діб деструкція нафти при початковому 1 % забрудненні досягала рівня 56,4-57,1 % (рис.2), а при 5 % забрудненні – 43,7-44,5 % (рис.3).

Активність деструкції ДП у вказаний період була дещо вищою і складала 63,1-64,2 % (рис.4). Значно меншими були ці показники при самоочищенні ґрунту: 32,1 % та 25,5 % при 1 % і 5 % забрудненні нафтою, відповідно та 40,3 % – при 5 % забрудненні ДП (рис.2-4).

На 90 добу ступінь деструкції вуглеводнів при використанні препаратів була найбільшою (92,1-92,7 %) у ґрунті забрудненому ДП та дещо меншою – при забрудненні 1% нафти (85,5-88,1 %) та 5% нафти (72,8-74,5 %). За відсутності препаратів деструкція нафти та дизельного палива за цей період була майже в 1,6 разів нижчою і знаходилась в межах 48,3-59,5 %.

Таким чином, нами встановлено, що висока швидкість біодеструкції препаратами Еколан та Родойл нафти і дизельного палива супроводжувалась значним підвищенням чисельності вуг-

леводнеокиснювальних бактерій у забрудненому ґрунті. По мірі очищення ґрунту чисельність ВОБ у ньому поступово знижувалась до їх початкової кількості у чистому ґрунті, виключаючи тим са-

мим можливість побічного негативного явища інтродукції – додаткового мікробного забруднення навколишнього середовища

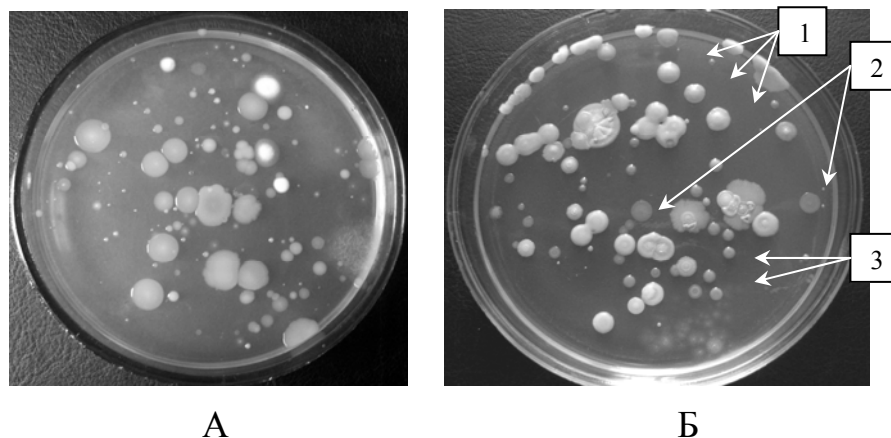


Рис. 1. Конкурентоздатність штамів-деструкторів вуглеводнів, які входять до складу препарату Родойл по відношенню до аборигенної мікрофлори ґрунту: А – висів проб забрудненого нафтою (5,0 %) ґрунту на МПА через 30 діб (контроль); Б – висів проб забрудненого нафтою (5,0 %) ґрунту на МПА через 30 діб після внесення препарату Родойл; 1 - *R.erythropolis*, 2 - *A.calcoaceticus*, 3 - *G.rubropertinctus*.

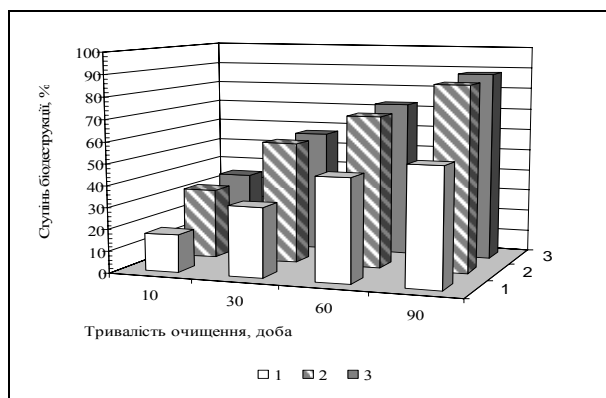


Рис. 2. Динаміка процесу біоремедіації забрудненого нафтою (1,0 %) ґрунту: 1 – ґрунт + нафта; 2 – ґрунт + нафта +препарат Еколан; 3 – ґрунт + нафта + препарат Родойл

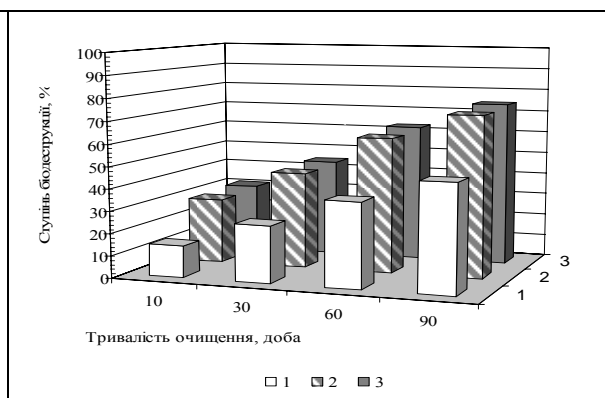


Рис. 3. Динаміка процесу біоремедіації забрудненого нафтою (5,0 %) ґрунту: 1 – ґрунт + нафта; 2 – ґрунт + нафта +препарат Еколан; 3 – ґрунт + нафта + препарат Родойл.

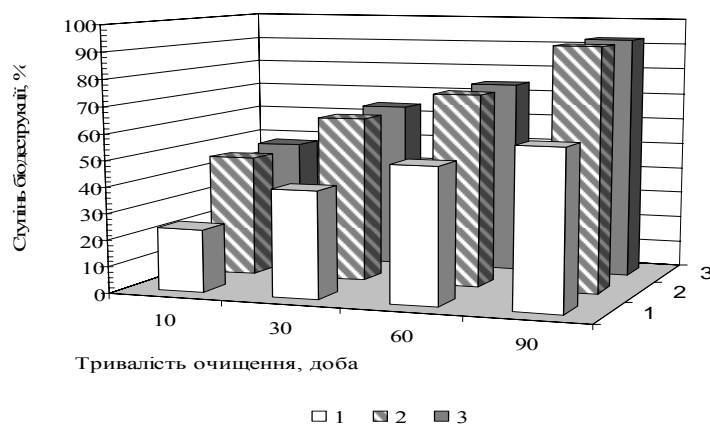


Рис. 4. Динаміка процесу біоремедіації забрудненого дизельним паливом (5,0%) ґрунту: 1 – ґрунт + нафта; 2 – ґрунт + нафта +препарат Еколан; 3 – ґрунт + нафта + препарат Родойл.

- 
1. Дульгерев О.М., Ногіна Т.М., Підгорський В.С., Думанська Т.У., Гавриленко М.М. Препарат для біологічного очищення ґрунту і води від забруднень нафтою та нафтопродуктами "Родойл". Деклараційний патент на винахід 34894 А Україна, С 02F3/34. Опубл.15.03.2001, Бюл. №2.
  2. Думанська Т.У., Ногіна Т.М., Підгорський В.С., Чернов С.Ю., Устенко В.М. Біоочищення відкритих водних басейнів від вуглеводнів нафти при використанні сорбенту // Вісник Одеського національного університету. Серія Біологія – 2005.– Т.10, вип.7. – С. 37-43.
  3. Киреева Н.А., Кузяхметов Г.Г., Мифтахова А.М., Водопьянов В.В. Фитотоксичность антропогенно-загрязненных почв. Уфа: Гелем. – 2003. – 266 с.
  4. Коронелли Т.В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводородов в окружающей среде (Обзор). Прикладная биохимия и микробиология // –1996. – Т.32, N 6. – С.579-585.
  5. Мифтахова А.М. Самоочищение и восстановление плодородия почв природных и антропогенных экосистем в условиях нефтяного загрязнения Автореферат дис... д-ра биол. наук: 14.06.06. – Тольятти, 2006. – 36 с.
  6. Методы почвенной микробиологии и биохимии. Под ред. Д.Г.Звягинцева. – М.: МГУ, 1991. – 304 с.
  7. ОСТ 38.01378-85. Охрана природы. Гидросфера, определение нефтепродуктов в сточных водах методом инфракрасной спектрофотометрии. М.: Изд-во стандартов. – 1985. – 8 с.
  8. Романенко В.И., Кузнецов С.И.. Экология микроорганизмов пресных водоемов. Ленинград: Наука, 1974. – 194 с.
  9. Рычкова М.И. Влияние Rhodococcus-биосурфактантов на процессы десорбции и деградации нефтяных углеводородов в почве: Автореферат дис... канд. биол. наук: 11.05.07. – Пермь, 2007. – 26 с.
  10. Тарасенко Е.М. Биологическая активность и токсичность почв при нефтяных загрязнениях и рекультивации: Автореферат дис... канд. биол. наук: 03.04.06. – Уфа, 2006. – 22 с.
  11. Фомин Г.С., Фомин А.Г. Почва. Контроль качества и экологической безопасности по международным стандартам. Справочник. – М.: Изд-во Протектор, 2001. – 304 с.
  12. Christofi N., Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Philp J.C. Biological treatment of crude oil contaminated soil in Russia // Engineering Geology Special Publication. – 1998. – Vol. 14, – P. 45-51.

Отримано: 10 жовтня 2007 р.

Прийнято до друку: 21 листопада 2007 р.