

УДК 504.064

<sup>1</sup>У.Р. Идрисова\*, <sup>1</sup>Т.Б. Мусалдинов, <sup>1</sup>Д.Ж. Идрисова,  
<sup>2</sup>О.Н. Ауэзова, <sup>1</sup>Н.С. Ашыкбаев,  
<sup>1</sup>Ж.М. Кабденов, <sup>2</sup>С.А. Айткельдиева, <sup>2</sup>А.К. Саданов

<sup>1</sup>ТОО «Таза Су», Казахстан, г. Алматы

<sup>2</sup>РГП «Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, Казахстан, г. Алматы

\*e-mail: taza-su@mail.ru

### Изучение степени очистки нефтезагрязненной почвы под воздействием цеолита и биопрепарата «Бакойл-KZ»

Анализ численности основных физиологических групп микроорганизмов в проведенном модельном эксперименте показал, что внесение в нефтезагрязненную почву цеолита, биовермикомпоста и биопрепарата «Бакойл-KZ» благоприятно сказывается на микрофлоре. При этом численность углеводородокисляющих микроорганизмов увеличивается на три, четыре порядка. Совместное внесение этих мелиорантов приводит к очистке почвы от нефти на 68,5%, при этом активизируются такие почвенные ферменты как каталаза и дегидрогеназа.

**Ключевые слова:** нефтезагрязненная почва, микрофлора, цеолит, биовермикомпост, биопрепарат, каталаза, дегидрогеназа.

У.Р. Идрисова, Т.Б. Мусалдинов, Д.Ж. Идрисова,  
 О.Н. Ауэзова, Н.С. Ашыкбаев, Ж.М. Кабденов, С.А. Айткельдиева,  
 А.К. Саданов

### Мұнаймен ластанған топырақты тазарту деңгейлеріне цеолит және «Бакойл-KZ» биопрепаратының әсерін зерттеу

Микроорганизмдердің негізгі топтарының санын зерттеуде, жүргізілген моделді тәжірибеде көрсетілгендей, мұнаймен ластанған топыраққа цеолит, биовермикомпост және «Бакойл – KZ» биопрепаратын енгізу топырақ микрофлорасына қолайлы әсер етті. Сонымен қатар мұнай тотықтырғыш микроорганизмдер саны үш, төрт көрсеткішке артты. Аталған мелиоранттарды бірге енгізу нәтижесінде, топырақ мұнайдан 68,5 % – ға тазарып, каталаза және дегидрогеназа секілді топырақ ферменттерінің белсенділігі жоғарылады.

**Түйін сөздер:** мұнаймен ластанған топырақ, микрофлора, цеолит, биовермикомпост, биопрепарат, каталаза, дегидрогеназа.

U.R. Idrisova, T.B. Musaldinov, D.Zh. Idrisova,  
 O.N. Auezova, N.S. Ashikbaev, Zh.M. Kabdenov, S.A. Aytkeldieva,  
 A.K. Sadanov

### Study the degree of purification oil-polluted soil under the influence of zeolite and biopreparation «Bakoil-KZ»

The analysis of the number of basic physiological groups of microorganisms conducted in the model experiment showed that introduction of the oily soil zeolite, biovermikompost and biopreparation «Bakoil -KZ» favorably influences on the microflora. Meanwhile, the number of microorganisms increases hydrocarbon by three to four orders. Joint application of these meliorantov clears the soil from oil by 68,5 %, while the activated soil enzymes such as catalase and dehydrogenase .

**Key words:** oil-polluted soil, microflora, zeolite, biovermikompost, biopreparation, catalase, dehydrogenase.

Загрязнение почв нефтью приводит к главному изменению практически всех основных характеристик почвы и обуславливает потерю

плодородия. В связи с угрожающими размерами загрязнения почвенного покрова нефтью и нефтепродуктами разработка новых эффективных,

экономически выгодных и экологически безопасных технологий имеет важное значение для поддержания экологического равновесия.

Применяемые механические, физические и химические методы очистки не являются достаточно эффективными, поэтому в настоящее время большое внимание уделяется биоремедиационным способам очистки. Биоремедиация является эффективной технологией снижения количества нефтяных углеводородов в почвах. Существуют несколько методов биоремедиации [1]. Наиболее перспективной является биоремедиация с внесением в загрязненную среду активных нефтеокисляющих микроорганизмов в виде биопрепаратов, способных за сравнительно короткие сроки утилизировать вредные загрязнения [2]. Одним из современных способов очистки нефтезагрязненных почв является биоремедиация с применением цеолитно-микробиологической технологии. При этом используется экологически чистый природный материал цеолит и биопрепараты на основе активных нефтеокисляющих микроорганизмов.

Цель исследований – определение биологической активности и степени деструкции нефти в почве при внесении цеолита, биовермикомпоста и биопрепарата «Бакойл-KZ» через 2 месяца.

#### **Материалы и методы исследований**

Объектами исследований служила почва нефтегазового месторождения Кумколь, которая классифицируется как серо-бурая пустынная и цеолит Чанканайского месторождения с размером частиц до 2 мм.

Для изучения влияния цеолита совместно с биовермикомпостом и биопрепаратом «Бакойл-KZ» на очистку нефтезагрязненной почвы был поставлен модельный эксперимент. Согласно схеме опыта цеолит добавляли в дозе 7,5 т/га, предыдущие исследования показали, что эта доза является оптимальной для биоремедиации [3]. Концентрация нефтяного загрязнения составляла 5% по объему. Контролями служила чистая почва и почва загрязненная нефтью, но без мелиорантов. Опыт был проведен в 3-х кратной повторности. Через 2 месяца определяли численность основных групп микроорганизмов: количество гетеротрофных и спорообразующих бактерий – на среде РПА, актиномицетов и бактерий, потребляющих минеральные формы азота на КАА, мицелиальных грибов на среде Чапе-

ка [4]. Количество микроорганизмов выражали как число КОЕ на 1 г почвенного субстрата [5]. Угледородоокисляющую микрофлору учитывали на среде Ворошиловой-Диановой (ВД), где в качестве источника углерода и энергии использовали нефть м. Кумколь в количестве 1%. Одновременно, определяли каталазную и дегидрогеназную активность [6], а также количественную убыль нефти методом ГЖХ.

#### **Результаты и обсуждение**

В последнее время во всем мире широко практикуется применение для очистки загрязненных земель различных биопрепаратов, созданных на основе микроорганизмов [7]. В модельном эксперименте использовали биопрепарат «Бакойл-KZ», который был разработан в Институте микробиологии и вирусологии. В состав этого биопрепарата входят активные нефтеокисляющие бактерии *Micrococcus roseus* 34, *Micrococcus roseus* 40, *Rhodococcus erythropolis* 7-A, адсорбированные на бентоните. Биопрепарат вносили в почву из расчета 72 кг/га. Биовермикомпост (биогу́мус), используемый в эксперименте, как все органические удобрения, улучшает структуру почвы и ее водно-физические свойства. Существенное отличие его от других органических удобрений – повышенное содержание в нем водорастворимых форм азота, фосфора и калия. Микроэлементы тоже переходят в более подвижную форму. Биовермикомпост представляет собой выделения или копролиты калифорнийских червей. Он представляет собой черную рассыпчатую и приятно пахнущую почвоподобную массу, похожую на чернозем. Так как биогу́мус содержит большое количество (до 32% на сухой вес) гуминовых веществ – гуминовые кислоты, фульвокислоты и гумины, – то это придает этому органическому удобрению высокие агрохимические и ростостимулирующие свойства. Все питательные вещества находятся в нем в сбалансированном сочетании и в виде доступных для микроорганизмов и растений соединений.

Как видно из таблицы 1 содержание гетеротрофных бактерий, растущих на РПА, было 220 тысяч клеток в грамме почвы. В фоновом варианте, куда добавили нефть, в количестве 5% по объему, их число увеличилось на порядок. В почве с нефтью и цеолитом этих микроорганизмов стало еще в два раза больше – 5,6 млн.

клеток. Соизмеримое количество наблюдалось в варианте с цеолитом и биопрепаратом – 6,6 млн. клеток. Самые значительные изменения в составе этой группы микроорганизмов произошли в почве с добавлением биовермикомпоста (варианты 4,5,8 и 9), что вполне объяснимо, так как этот мелиорант сам по себе содержит большое количество микроорганизмов. Такая же закономерность отмечена и для спорообразующих бактерий и бактерий, способных усваивать минеральные формы азота, самое значительное количество последних зафиксировано в вариантах 5 и 9, куда вносили биовермикомпост из расчета 6,0 т/га, их число составляло 8,2 и 8,5 млн. клеток в грамме почвы.

Третьей по численности группой были актиномицеты. Сравнивая их количество с контрольным вариантом (чистая почва), можно отметить, что число актиномицетов в опытных почвах значительно увеличилось – на один, два порядка.

При учете мицелиальных грибов не отмечено какой-либо закономерности, важно лишь то, что их количество сильно не увеличивалось. Это положительный момент, поскольку при биоремедиации условия, способствующие изменению состава микробного сообщества почвы в сторону увеличения численности микроскопических грибов не желательны, так как многие из них являются активными токсикантами и способны угнетать многие виды почвенной микрофлоры.

Важно отметить, что по истечении двух месяцев в опытных вариантах резко возросло количество углеводородокисляющей микрофлоры – на три, четыре порядка. Если в чистой почве их насчитывалось всего 100, а в фоновой – 1000 клеток в грамме, то внесение цеолита, биовермикомпоста и биопрепарата привело к тому, что углеводородокисляющих микроорганизмов стало уже миллион клеток в таком же объеме. Такое резкое возрастание их числа свидетельствует об интенсивности процессов деструкции нефти в почве.

Химическое определение остаточной нефти после двух месяцев инкубации эксперимента показало, что в контрольном фоновом варианте утилизация нефти составила 15,9%, в фоновом варианте с добавлением цеолита – 48,4%, что подтверждает эффективность внесения цеолита в нефтезагрязненную почву (таблица 2). В вариантах опыта 4,5,7 деструкция нефти была

несколько выше 50%. Внесение биопрепарата совместно с цеолитом приближало ее к 60%. Самым эффективным было внесение цеолита, биовермикомпоста и биопрепарата (более 67%), причем доза биовермикомпоста существенной роли при этом не играла. При внесении биогазуса в дозе 4,0 и 6,0 т/га процент утилизации нефти был практически одинаковым, разница составляла всего десятые доли процента.

Как уже отмечалось, такие почвенные ферменты как каталаза и дегидрогеназа играют существенную роль в важнейших биохимических процессах в почве. Их активность служит индикатором при биоремедиации нефтезагрязненных почв и зависит от многих природных и антропогенных факторов [8,9,10]. Во всех опытных вариантах эксперимента каталазная активность увеличилась по отношению к фону (почва + нефть). Самым незначительным это увеличение было в варианте при внесении в нефтезагрязненную почву только биопрепарата и составляло 1,7 О<sub>2</sub>/мин/г, а самым заметным – 3,0 О<sub>2</sub>/мин/г, в тех случаях, когда в почву добавляли биовермикомпост, при этом доза вносимого биогазуса никакой роли не играла. Сравнивая полученные данные по каталазной активности с результатами степени утилизации нефти в этом модельном эксперименте, становится очевидным, что минимальная исследуемая доза биогазуса 4,0 т/га, является оптимальной.

При исследовании фермента дегидрогеназы отмечена сходная картина. Минимальная активность 0,59 мкг/ТФФ/г/сут была в варианте с внесением только биопрепарата «Бакойл-KZ», во всех вариантах опыта, куда был добавлен биовермикомпост она превышала 0,80 мкг/ТФФ/г/сут.

Таким образом, анализ численности основных физиологических групп микроорганизмов в проведенном модельном эксперименте показал, что внесение в нефтезагрязненную почву цеолита, биовермикомпоста и биопрепарата «Бакойл-KZ» благоприятно сказывается на микрофлоре. При этом численность углеводородокисляющих микроорганизмов увеличивается на три, четыре порядка. Совместное внесение этих мелиорантов приводит к очистке почвы от нефти на 68,5%, при этом активизируются такие почвенные ферменты как каталаза и дегидрогеназа, их уровень повышается до 3,0 О<sub>2</sub>/мин/г и 0,85 мкг/ТФФ/г/сут.

**Таблица 1** - Численность микроорганизмов в почве с 5% нефтяным загрязнением в модельном эксперименте с цеолитом, биовермикомпостом и биопрепаратом «Бакойл-КЗ» через 2 месяца

Варианты	Бактерии на РПА, КОЕ/г	Спорообразующие бактерии, КОЕ/г	Бактерии на КАА, КОЕ/г	Актиномицеты, КОЕ/г	Мицелиальные грибы, КОЕ/г	УОМ НВЧ кл/г
1. Контроль. Чистая почва	$(2,2 \pm 0,7) \times 10^5$	$(7,7 \pm 0,6) \times 10^3$	$(3,4 \pm 0,3) \times 10^5$	$(3,5 \pm 0,8) \times 10^3$	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^2$	$10^2$
2. Контроль. Почва + нефть (фон)	$(2,8 \pm 0,4) \times 10^6$	$(4,0 \pm 0,3) \times 10^4$	$(6,9 \pm 0,4) \times 10^5$	$(1,2 \pm 0,5) \times 10^3$	$(3,0 \pm 0,2) \times 10^3$	$10^3$
3. Фон + цеолит 7,5 т/га	$(5,6 \pm 0,4) \times 10^6$	$(4,0 \pm 0,3) \times 10^3$	$(3,9 \pm 0,3) \times 10^6$	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^4$	$(4,0 \pm 0,3) \times 10^2$	$10^3$
4. Фон + биовермикомпост 4,0 т/га + биопрепарат «Бакойл-КЗ»	$(2,0 \pm 0,2) \times 10^7$	$(1,4 \pm 0,5) \times 10^4$	$(2,8 \pm 0,2) \times 10^6$	$(1,4 \pm 0,5) \times 10^5$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^2$	$10^3$
5. Фон + биовермикомпост 6,0 т/га + биопрепарат «Бакойл-КЗ»	$(2,1 \pm 0,2) \times 10^7$	$(1,2 \pm 0,5) \times 10^4$	$(8,2 \pm 0,4) \times 10^6$	$(7,4 \pm 0,9) \times 10^5$	$(7,0 \pm 0,4) \times 10^3$	$10^6$
6. Фон + цеолит 7,5 т/га + «Бакойл-КЗ»	$(6,6 \pm 0,2) \times 10^6$	$(6,0 \pm 0,4) \times 10^3$	$(2,4 \pm 0,2) \times 10^5$	$(4,0 \pm 0,3) \times 10^4$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^2$	$10^6$
7. Фон + биопрепарат «Бакойл-КЗ»	$(1,7 \pm 0,2) \times 10^6$	$(1,7 \pm 0,6) \times 10^3$	$(3,8 \pm 0,3) \times 10^5$	$(1,9 \pm 0,6) \times 10^4$	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^2$	$10^6$
8. Фон + цеолит 7,5 т/га + биовермикомпост 4,0 т/га + биопрепарат «Бакойл-КЗ»	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^7$	$(2,5 \pm 0,3) \times 10^4$	$(7,5 \pm 0,3) \times 10^6$	$(7,5 \pm 0,3) \times 10^5$	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^2$	$10^6$
9. Фон + цеолит 7,5 т/га + биовермикомпост 6,0 т/га + биопрепарат «Бакойл-КЗ»	$(2,0 \pm 0,3) \times 10^7$	$(3,5 \pm 0,3) \times 10^4$	$(8,5 \pm 0,3) \times 10^6$	$(7,5 \pm 0,4) \times 10^5$	$(2,5 \pm 0,3) \times 10^3$	$10^6$

**Таблица 2** - Степень очистки нефтезагрязненной почвы в модельном эксперименте с помощью цеолита, биовермикомпоста и биопрепарата «Бакойл-КЗ»

Варианты	Степень утилизации нефти, в %	Каталазная активность, O <sub>2</sub> /мин/г	Дегидрогеназная активность, мкг/ТФФ/г/сут
Контроль. Чистая почва	-	3,9	1,25
Контроль. Почва + нефть (фон)	15,9	1,3	0,48
Фон + цеолит 7,5 т/га	48,4	2,7	0,60
Фон + биовермикомпост 4,0 т/га + биопрепарат «Бакойл-КЗ»	52,7	2,9	0,84
Фон + биовермикомпост 6,0 т/га. + биопрепарат «Бакойл-КЗ»	55,5	3,0	0,80
Фон + цеолит 7,5 т/га + «Бакойл-КЗ»	59,4,	2,5	0,75
Фон + биопрепарат «Бакойл-КЗ»	54,1	1,7	0,59
Фон + цеолит 7,5 т/га + биовермикомпост 4,0 т/га + биопрепарат «Бакойл-КЗ»	67,8	3,0	0,85
Фон + цеолит 7,5 т/га + биовермикомпост 6,0 т/га + биопрепарат «Бакойл-КЗ»	68,5	3,0	0,85

### Литература

- 1 Кожанова Г.А., Руденко А.В. Бактерии-деструкторы с широким спектром биологической активности для интродукции в природные биоценозы// Микробиологический журнал, 1994.- т.50.- № 2.
- 2 Барахнина В.Б. Сравнительный анализ биопрепаратов для ликвидации нефтяных загрязнений почвы и воды//Экол. вестн. России.- 2011.- № 10 – С.14-17.
- 3 Идрисова У. Р., Идрисова Д. Ж., Мусалдинов Т. Б., Ауэзова О. Н., Мырзадаулетова И.Т. Курманбаев А. А., Айткельдиева С. А. Определения оптимальной дозы и фракции цеолита для увеличения активности микрофлоры нефтезагрязненной почвы // Микробиология және вирусология. – №1. – 2013. – С. 21-31.
- 4 Егоров Н.С. Практикум по микробиологии.- Изд-во МГУ.- 1976.- С. 56-124.
- 5 Колешко О.И. Экология микроорганизмов.-Минск: Высшая школа, 1981.-120 с.
- 6 Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. Изд-во МГУ.- 1991.- С. 59-75.
- 7 Кураков А.В., Ильинский С.В., Котелевцев С.В., Садчиков А.П. Биоиндикация и реабилитация экосистем при нефтяных загрязнениях.- М.-2006.- 330 с.
- 8 Baran S. Bielinsko J.E., Oleazezuk P. Enzymatic activity in an airfield soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons// Geoderma. – 2004. – Vol. 118. – P. 221-232.
- 9 Voopathy R. Factors limiting bioremediation technologies // Bioresur. Technol. – 2000. – Vol.74. – P. 63-67.
- 10 Biederbeck V.O., Zenter R.P, Cambell C.A. Soil microbial populations and activities as influenced by legume green fallow in a semirigid climate// Soil. Biol. Bioch. – 2005. – Vol. 37. – P. 1775-1784.

### Reference

- 1 Kozhanova G.A, Rudenko A.V. Bacteria – destructors with a wide spectrum of biological activity for introduction into the natural biocenosis // Journal of Microbiology , 1994. – Vol.50. – №2.
- 2 Barakhnin V.B. Comparative analysis of biological products for the elimination of oil pollution of soil and water//Ecol . vestn . Russia . – 2011 . – №10 – P.14 -17.
- 3 Idrissova W.R., Idrissova D.J., Musaldinov T.B., Auezova O.N., Myrzadauletova I.T., Kurmanbaev A.A., Aytkeldieva S.A. Definitions optimal dose and fraction of zeolite to increase the activity of soil microflora oily // Microbiology zhene virology. – № 1. – 2013. – S. 21-31 .

- 4 Egorov N.S. Workshop on Microbiology . – State Univ . – 1976 . – P. 56-124 .
- 5 Koleshko O.I. Ecology mikroorganizmov. Minsk : High School, 1981.-120 with .
- 6 Zvyagintsev D.G. Methods of Soil Microbiology and Biochemistry . State Univ . – 1991 . – P. 59-75.
- 7 Kurakov A.V., Il'inskii S.V., Kotelevtsev S.V., Sadchikov A.P. Bioindication and rehabilitation of ecosystems in oil pollution. – M. 2006. – 330.
- 8 Baran S. Bielinsko J.E., Oleazezuk P. Enzimatic activity in an airfield soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons // Geoderma. – 2004. – Vol. 118. – P. 221-232.
- 9 Boopathy R. Factors limiting bioremediation technologies // Bioresur. Technol. – 2000. – Vol.74. – P. 63-67.
- 10 Biederbeck V.O., Zenter R.P., Cambell C.A. Soil microbial populations and activites as influenced by legume green fallow in a semiramid climate // Soil. Biol. Bioch. – 2005. – Vol. 37. – P. 1775-1784.