

ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ТОВАРНОЙ ФОРМЫ ПРЕПАРАТА-НЕФТЕДЕСТРУКТОРА «РОДЕР» И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЭТИХ ФОРМ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ И В ПРИРОДЕ

©2013 А.И. Албулов¹, А.Я. Самуйленко², М.А. Фролова², В.П. Мурыгина³,
С.Н. Гайдамака³, Ю.Д. Фролов²

¹ЗАО Биопрогресс, Московская обл., Щелковский р-н, п. Биокombинат

²Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности
РАСХН, Московская обл., Щелковский р-н, п. Биокombинат

³МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва

Поступила 21.06.2013

В данной статье описаны результаты изучения нефтеокисляющей активности различных форм препарата-нефтедеструктора «Родер». Показано, что наилучшей нефтеокисляющей активностью обладает препарат в виде жидкого концентрата.

Ключевые слова: препарат-нефтедеструктор, нефтеокисляющая активность, распылительное и лиофильное высушивание.

Экологическое состояние природы оказывает значительное влияние не только на здоровье человека, но и всего живого на планете Земля. В России основным загрязнением подвергаются почвы, а предпочтение отдается биологическим методам очистки почв от углеводородистых загрязнений с помощью препаратов-нефтедеструкторов как наиболее дешевых технологий. В связи с этим разработка технологии производства товарной формы препарата-нефтедеструктора «Родер» и изучение эффективности его применения является актуальным исследованием.

Большинство потребителей препаратов-нефтедеструкторов предпочитают иметь сухую форму (сухой порошок) препаратов, поскольку перевозить и хранить (1-2 года) такой препарат легче. В большинстве случаев сухую форму препарата получают методом распылительной сушки, а это негативно сказывается на жизнеспособности клеток и их нефтеокисляющей активности. Лيوфильное высушивание клеток микроорганизмов для получения сухой формы препарата сохраняет до 90% их численность и нефтеокисляющую активность, но очень существенно удорожает препарат. Жидкие формы препаратов, как правило, имеют более высокую численность и активность живых клеток и более низкую стоимость, но такие препараты имеют ограниченный срок хранения (несколько месяцев).

Целью настоящего исследования было изучение зависимости от технологии выращивания биомассы штаммов препарата-нефтедеструктора «Родер» и

способа приготовления его товарной формы на базе ОАО «Биопрогресс» эффективности его действия на нефтяные загрязнения почв в различных регионах России.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Препарат-нефтедеструктор «Родер» был разработан для микробиологической очистки водной поверхности, почв и грунтов от загрязнений углеводородами нефти и нефтепродуктов. Состоит из двух выделенных из почвы, загрязненной сырой нефтью, высокоактивных штаммов-деструкторов нефти, непатогенных для людей, животных и растений, относящихся к роду *Rhodococcus* (*R. ruber* Ac-1513 Д и *R. erythropolis* Ac-1514 Д) и обладающих синергизмом при деградации углеводородов нефти. Препарат разрешен для широкого применения в природе и успешно применялся для очистки водной поверхности, почв и грунтов от нефти и для очистки нефтешламов [1-4].

Культивирование штаммов родококков проводили в ОАО «Биопрогресс» в 600 л или 250 л ферментерах, оборудованных мешалками, подачей стерильного воздуха, контролем pH и температуры. Клеточную массу отделяли от культуральной жидкости центрифугированием на проточной центрифуге ОТР 101-К и высушивали на лиофильной сушилке марки ТГ-50 или методом распылительной сушки на сушилке марки NIRO ATOMAZER.

Микробиологические анализы. Определяли общую численность микроорганизмов (ОЧМ) на Петри-фильмз и количество УВ окисляющих (УВО) клеток в жидкой среде Раймонда с нефтью [5,6] в конце культивирования штаммов в ферментере и после приготовления из высушенных клеток препарата «Родер» или после смешивания сконцентрированных клеток штаммов препарата «Родер».

Химические анализы углеводородов (УВ) в почве до и после применения препарата «Родер» проводили гравиметрическим методом, методом колоночной хроматографии, ГХ и ВЭЖХ [7, 8]. Опре-

Албулов Алексей Иванович, д.б.н., проф., генеральный директор, e-mail: info@bioprogress.ru; Самуйленко Анатолий Яковлевич, д.в.н., академик РАСХН, директор, e-mail: vnitibr@mail.ru; Фролова Марина Алексеевна, д.б.н., ведущий научный сотрудник, e-mail: info@bioprogress.ru; Мурыгина Валентина Павловна, к.б.н., научный сотрудник, e-mail: vp_murugina@mail.ru; Гайдамака Сергей Николаевич, ведущий инженер; Фролов Юрий Дмитриевич, к.б.н., ученый секретарь, e-mail: vnitibr@mail.ru

деляли в пробах почв общую концентрацию веществ, экстрагируемых хлороформом (загрязнение), проводили фракционный анализ УВ в хлороформенных экстрактах на патронах Диапак С и анализ гексановых фракций УВ на газовом хроматографе и ВЭЖХ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Каждый штамм, составляющий препарат «Родер», выращивали отдельно в ферментере емкостью 600 л на специально подобранной среде с учетом физиологических особенностей каждого из них. По окончании культивирования клеточную массу каждого штамма отделяли от культуральной жидкости и высушивали лиофильно. Затем штаммы проверяли на жизнеспособность и численность нефтеокисляющих клеток до и после высушивания. Жизнеспособность клеток родококков и их нефтеокисляющая активность сохраняются при этом на 90% и более (табл.).

Таблица. Численность нефтеокисляющих клеток (активность) штаммов препарата «Родер» и готовой формы препарата «Родер»

Лиофильное высушивание			Распылительная сушка			Жидкий концентрат		
R. r, кл/мл	R. e кл/мл	Родер кл/г	R. r, кл/мл	R. e кл/мл	Родер кл/г	R. r, кл/мл	R. e кл/мл	Родер кл/мл
$1 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^9$	$7,5 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^{10}$	$1,0 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^{10}$

Прим.: R. r – штамм *Rhodococcus ruber* (Ac-1513 Д), R. e – штамм *R. erythropolis* (Ac-1514 Д)

Как видно из представленных результатов, численность и нефтеокисляющая активность до и после лиофильного высушивания клеток родококков препарата «Родер» различаются на 1 порядок и остаются достаточно высокими. После распылительной сушки теряется от 2 до 3-х порядков в численности УВО клеток (табл.). Самым мягким способом сохранения высокой численности и активности нефтеокисляющих клеток родококков, составляющих препарат «Родер», является получение концентрата этих клеток после выращивания в ферментере и стабилизации консервантом.

После высушивания клеток родококков методом распылительной или лиофильной сушки, сухие клетки штаммов смешивают в соотношении 1:1 и получают сухую форму препарата «Родер».

Препарат «Родер», полученный методом лиофильной сушки, применяли в пилотном эксперименте на почве, загрязненной мазутом на Обуховском заводе в Санкт-Петербурге. Результаты анализа почвы, загрязненной мазутом, в динамике применения препарата определяли после экстракции углеводов из почвы и колоночной хроматографии хлороформенного экстракта гравиметрическим методом (рис. 1).

Под действием препарата «Родер» концентрация насыщенных углеводов (УВ) в загрязнении снизилась на 92%, ароматических на 93%, смолисто-асфальтеновых на 92% за три обработки, проведенные в течение полутора месяцев летом 2006 г.

Исследование углеводов (нефтепродуктов) загрязненной мазутом почвы до и после применения препарата «Родер» на газовом хроматографе представлено на рис. 2. Можно видеть, насколько эффективно клетки препарата деградировали мазутное загрязнение на Обуховском заводе в Санкт-Петербурге.

Исследование полиароматических углеводов (ПАУ) на ВЭЖХ, извлеченных из загрязненной

мазутом почвы, до и после применения препарата «Родер», представлены на рис. 3, где очень хорошо видно, что после применения препарата исчезли практически все ПАУ.

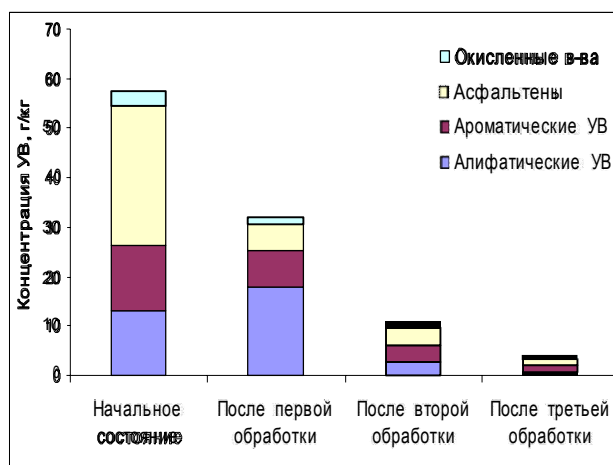


Рис. 1. Деградация компонентов застарелого мазута в процессе биоремедиации загрязнения препаратом «Родер» (участок № 1)

В соответствии с патентом РФ № 2295403, 2005 [9], посевной материал каждого штамма выращивали отдельно, затем засевали 250 л ферментер первым штаммом, а через 12 час подсеивали второй штамм и заканчивали культивирование через 28 час после внесения второго штамма.

Клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием, разводили остатком культуральной жидкости и вводили в распылительную сушилку.

Проверяли общую численность и численность нефтеокисляющих клеток до и после высушивания.

Результаты, представленные в таблице, показывают, что после распылительной сушки численность нефтеокисляющих клеток уже на 2-3 порядка ниже, чем при лиофильном высушивании.

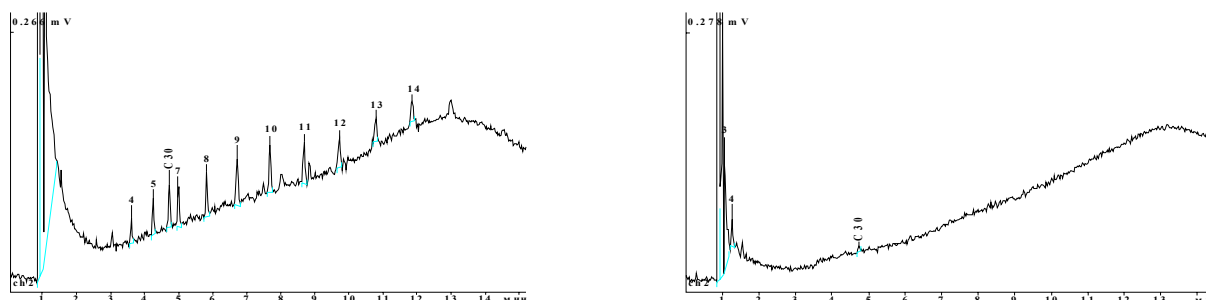


Рис. 2. Газовая хроматограмма мазутного загрязнения в почве до (слева) и после действия препарата «Родер» (справа).

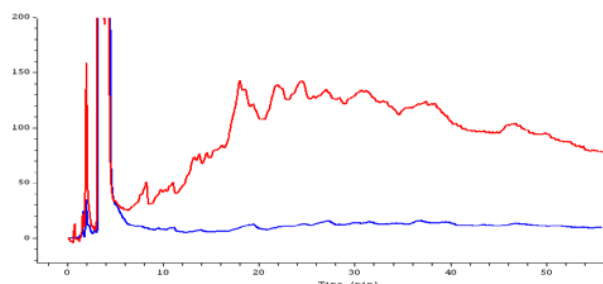


Рис. 3. ВЭЖ хроматограмма ароматической фракции до (красный цвет) и после (синий цвет) действия препарата «Родер» на загрязненную мазутом почву

Препарат «Родер», полученный методом распылительной сушки, проверяли в лабораторных условиях на минеральной почве, загрязненной нефтью. В каждую емкость ($110 \times 120 \text{ мм}^2$) было внесено по весу 700 г загрязненной почвы. Исследовали в сравнении эффективность действия препарата «Родер» как такового и гумата «Экстра» (производство Новосибирск) как такового, взятого в концентрации 0,1 г/кг почвы, а также действие препарата «Родер» в сочетании с гуматом, взятым в такой же концентрации. Негативный контроль – исходная почва, без внесения препаратов и удобрения. Результаты представлены на рис. 4 и 5.

На представленных хроматограммах (рис. 4) хорошо видно, что препарат «Родер» как таковой хорошо деградирует углеводороды нефтяного загрязнения, несколько хуже работает препарат в сочетании с гуматом. ГХ анализ в исходной почве обнаружил 15 значимых пиков. После действия препарата «Родер» остается 3 пика (деградация 80%), а после совместного воздействия препарата и гумата 0,1 г/кг почвы – 7 пиков (деградация 53%).

На рис. 5 представлены результаты фракционного анализа нефтяного загрязнения почвы до и после применения препарата «Родер», гумата и сочетания этого же препарата и гумата.

Под действием препарата «Родер» (трехкратная обработка) концентрация нефтяного загрязнения в почве снижается на 21,5%, под действием гумата 0,1 г/кг – на 18,1%, а в сочетании «Родер»+гумат (0,1 г/кг) на 25%.

Анализ ароматического загрязнения (ВЭЖХ) показал, что сочетание препарата и гумата не дало положительных результатов по биодegradации тяжелых ароматических углеводородов (ПАУ), что не подтверждает результаты, полученные нами раньше [10]. Возможно, это связано с тем, что раньше работали с гуматом Pow-humus (производство Германия).

Жидкую форму препарата «Родер» получали путем выращивания по отдельности штаммов препарата в 600 л ферментере, концентрирования клеток на центрифуге и смешивания в соотношении 1:1. Жизнеспособность и численность нефтеокисляющих клеток штаммов из ферментера и в готовом препарате выше, чем при любой сушке (табл.).

Жизнеспособность и нефтеокисляющая активность готового препарата «Родер» была высокой и сохранялась в готовом препарате «Родер» без изменения в течение 4-х месяцев.

Эффективность действия жидкого концентрата препарата «Родер» проверяли на загрязненном углеводородами грунте, взятом из промышленной зоны, в сравнении с препаратом Деворойл.

Технология обработки грунта была одинаковой: грунт изымали из загрязненного места, модифицировали, перемещали в смеситель и выдерживали при температуре 25°C и добавлении стимуляторов роста микроорганизмов при перемешивании в течение 72 час. Результаты представлены на рис. 7 и 8.

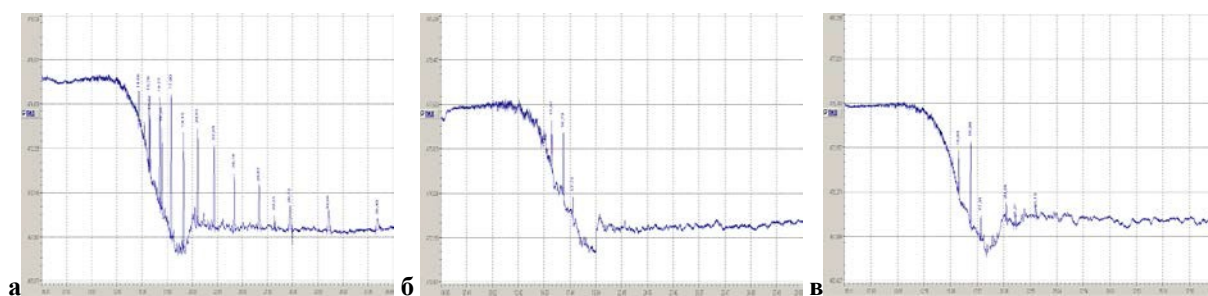


Рис. 4. ГХ анализ исходного нефтяного загрязнения: (а) – негативный контроль, (б) после действия препарата «Родер», (в) после действия препарата «Родер» с гуматом 0,1 г/кг

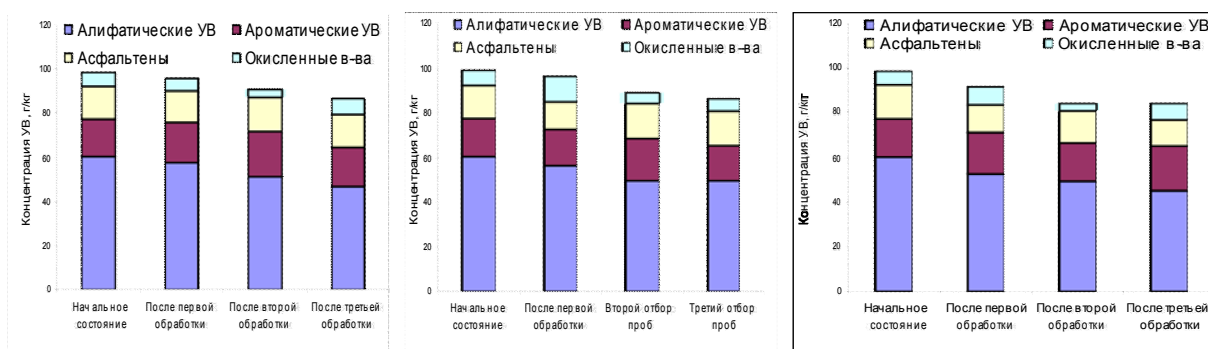


Рис. 5. Дegradация нефтяного загрязнения минеральной почвы под действием препарата «Родер» (слева), гумата 0,1 г/кг почвы (середина), сочетание препарата Родер и гумата 0,1

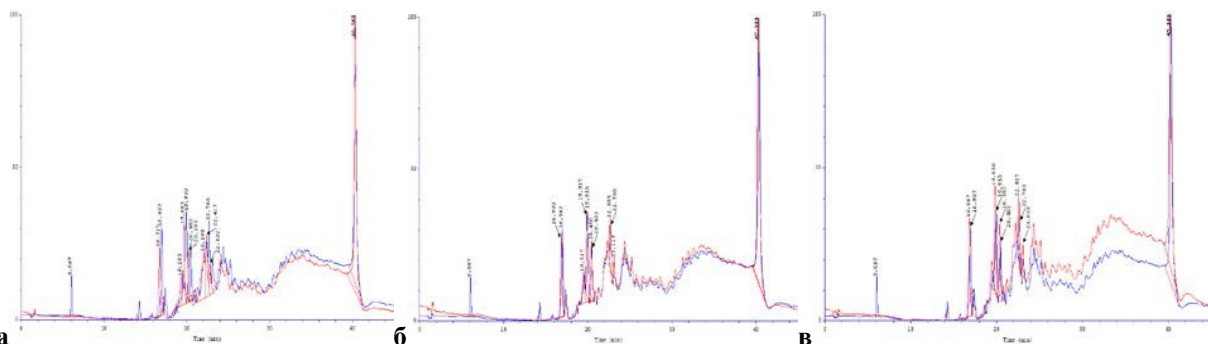


Рис. 6. ВЭЖХ анализ ароматической фракции нефтяного загрязнения почвы: (а) после действия препарата «Родер», (б) после действия гумата 0,1г/кг. (в) препарата «Родер» с гуматом 0,1 г/кг. Синий цвет – исходная почва, красный – после действия препарата или гумата или их сочетания

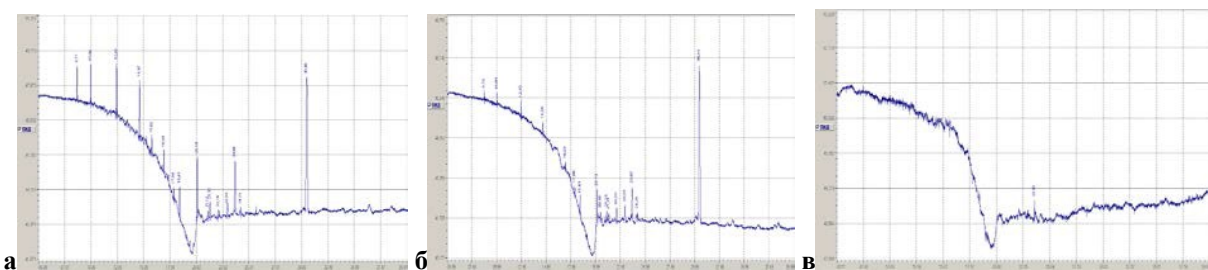


Рис. 7. ГХ анализ (а) исходного нефтяного загрязнения, (б) после действия препарата Деворойл, (в) после действия препарата «Родер»

ГХ анализ показал (рис. 7), что в исходной почве обнаруживаются 16 значимых пиков, суммарная высота пиков 19,349 мв. После действия препарата Деворойл обнаруживаются те же 16 пиков, но суммарная высота пиков на 6 мв меньше, а площадь

пиков меньше на 0,1535 мв*мин, чем в исходной почве (деградация 30,6%).

После действия препарата «Родер» обнаруживается только один значимый пик с площадью в 0,369 мв (деградация 98,9%).

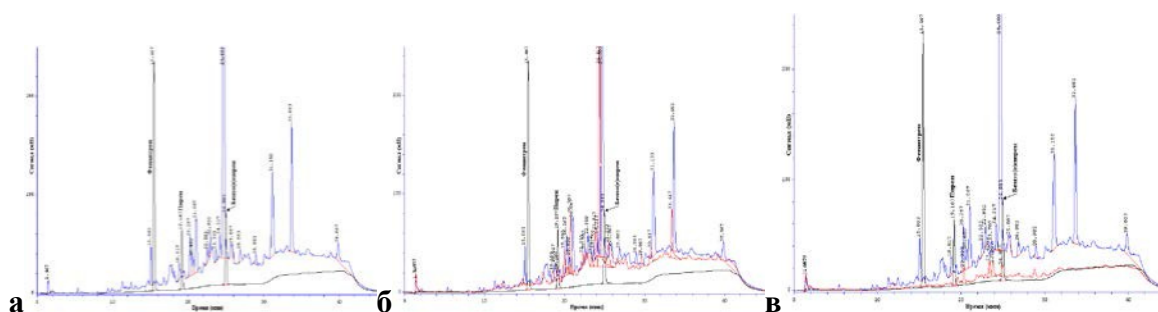


Рис. 8. ВЭЖХ анализ ароматической фракции (а) исходного нефтяного загрязнения, (б) под действием препарата Деворойл. (в) под действием препарата «Родер». Синий цвет – исходная почва, черный – свидетели (фенантрен, пирен, бензо(е)пирен); красный – после действия препарата

Под действием препарата «Родер» полиароматические УВ деградированы на 95,7%, под действием препарата Деворойл на 61,3%.

Таким образом, препарат «Родер» в виде жидкого концентрата обладал наилучшей нефтеокисляющей активностью и очень эффективно деградировал углеводородное загрязнение в почве. Следующим по эффективности и нефтеокисляющей активности был лиофильно высушенный препарат «Родер» и, наконец, препарат «Родер», полученный путем распылительной сушки оказался более низкого качества по всем трем критериям оценки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Мурыгина В.П., Аринбасаров М.У., Калюжный С.В.* Очистка водной поверхности и грунтов от нефтяных загрязнений биопрепаратом Родер // ЭКиП, август, 1999 г. С. 17-19.
2. *Murygina V.P., Markarova M.Yu., Kalyuzhnyi S.V.* Application of biopreparation "Rhoder" for remediation of oil polluted polar marshy wetlands in Komi Republic // Environmen International. 2005. N. 31. P. 163-166.
3. *Ouyang W., Liu H., Yu Y.-Y., Murygina V., Kalyuzhnyi S., Xu Z.-D - Huanjing Kexue.* Field-scale study on performance comparison of bio-augmentation and compost treatment of oily sludge // Environmental Science. 2006. V. 27 (1). P. 160-164.
4. *Мурыгина В.П., Калюжный С.В.* Биоремедиация загрязненных углеводородами территорий в северных регионах России // Мир нефтепродуктов. Вестник нефтяных компаний. 2008. № 4. С. 30-36.
5. *Назина Т.Н., Розанова Е.П.* Химические и микробиологические методы исследования пластовых жидкостей и кернов / Препринт. Пущино, 1988. 25 с.
6. *Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусова.* М.: Akademia, 2005. 603 с.
7. *Другов Ю.С., Зенкевич И.Г., Родин А.А.* Газохроматографическая идентификация загрязнений воздуха, воды, почвы и биосферы. М.: Изд-во Бином, 2005. 752 с.
8. *Алексеенок Д.А., Герасимова Д.А., Михайлик Ю.В., Другов Ю.С., Зенкевич И.Г., Родин А.А.* Определение бенз (а) пирена в почвах и грунтах методом ВЭЖХ с использованием концентрирующих патронов «Диапак С» (силикагель). 2009. lab@ecocity.ru
9. *Мурыгина В.П., Калюжный С.В., Войшвилло Н.Е.* Способ получения бактериального препарата Родер для очистки почв, почвогрунтов, нефтешламов, пресных и минерализованных вод от нефти и нефтепродуктов // Патент России No 2295403, 2007. Бюл. № 43.
10. *Salem K., Perminova I.V., Grechicheva N.U., Mecheriakov S.V.* Influence of humic substances on degradation of oil by oil-oxidizing microorganisms // Biocatalytic Technology and Nanotechnology / Ed. G. Zaikov. N.Y.: Nova Science Publishers, 2004. P. 29-39.

TECHNOLOGY OF PRODUCTION OF THE COMMODITY FORM OF THE DRUG-OILDESTRUCTOR «RODER» AND EFFICACY OF THE USE OF THESE FORMS IN LABORATORY CONDITIONS AND IN NATURE

©2013 A.I. Albulov¹, A.Ya. Samuilenko², M.A. Frolova², V.P. Myrugina³, S.N. Gaydamaka³, Yu.D. Frolov²

¹CJSC Bioprogress, Moscow region, Shchelkovo, Biocombinat

²AII-Russia Scientific-Research and Technology Institute of Biological Industry, Moscow region, Shchelkovo, Biocombinat

³MGU named of M.V. Lomonosov, Moscow

This article describes the results of a study of petroleum biodegradation in present activity of various forms of drug-oilDestructor «Roder». It is shown that the best petroleum biodegradation in present activity possesses medication in the form of a liquid concentrate.

Keywords: drug-oilDestructor, oiloxide activity, spray and liophyl drying.

Alexey Albulov, Doctor of Biology, Professor, General Director, e-mail: info@bioprogress.ru; Anatoly Samuilenko, Doctor of Veterinary, academician RAAS, Director, e-mail: vnitbp@mail.ru; Marina Frolova, Doctor of Biology, leading researcher, e-mail: info@bioprogress.ru; Valentina Myrugina, Candidate of Biology, researcher, e-mail: vp_murygina@mail.ru; Sergey Gaydamaka, leading engineer; Yury Frolov, Candidate of Biology, scientific secretary, e-mail: vnitbp@mail.ru