

Заключение. Совершенствование управления экологическими знаниями в области радиационной безопасности является важной проблемой развития непрерывного образования в Республике Беларусь. Последнее должно обеспечить многоуровневое образование в области радиационной безопасности, содействовать устойчивому развитию страны и формированию гражданской позиции, направленной на сохранение здоровья человека и сбалансированное состояние окружающей среды как необходимое условие существования нынешней и будущих цивилизаций. Важно только использовать для этого современные инновационные методы и индикативное управление.

Материал поступил в редакцию 05.09.2014.

УДК 551.461, 502.36

Ж. К. Мусаева

Каспийский государственный университет технологий и инжиниринга имени Ш. Есенова, Актау, Казахстан

В. В. Соколова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Астраханский государственный технический университет», Астрахань, Российская Федерация

А. К. Казиева

Каспийский государственный университет технологий и инжиниринга имени Ш. Есенова, Актау, Казахстан

АПРОБАЦИЯ БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ КОНСОРЦИУМА ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS* И *ACINETOBACTER JOHNSONII* В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

Введение. В условиях неуклонно возрастающего антропогенного давления на окружающую среду её защита от техногенного загрязнения является одной из серьёзных задач экологии. Объёмы добычи, транспортировки и переработки этого сырья очень велики, и связанные с этим утечки и разливы при авариях имеют глобальный масштаб. Нефть и нефтепродукты, поступая в окружающую среду, оказывают негативное влияние на все компоненты экосистем. Углеводороды являются постоянным источником канцерогенного и мутагенного воздействия. Нефть и её компоненты подвергаются естественному разложению, однако процесс самовосстановления загрязнённой среды является очень длительным [3]. Без проведения широкомасштабных и эффективных мероприятий по ликвидации последствий попадания

нефти и нефтепродуктов в окружающую среду (таких, как механический сбор, отжим и выжигание нефти) количество загрязнённых территорий будет неуклонно расти. Однако механические методы малоэффективны и наносят дополнительный вред окружающей среде. Наиболее действенным является метод биоремедиации. Микроорганизмы в составе препаратов в короткий срок утилизируют практически все углеводороды нефти, в том числе ароматические, полиароматические, непредельные, изопреноидные, которые наиболее канцерогенны и токсичны для живой природы.

На сегодня разработаны и производятся различные биопрепараты, предназначенные для ремедиации природных объектов от последствий загрязнения нефтью и нефтепродуктами. Однако для морской воды казахстанского сектора Каспия не предложено ни одного бактериального препарата. Известно, что вдоль побережья ведётся активная разведка и добыча углеводородного сырья и возможны несанкционированные разливы нефти и её поллютантов, способные привести к неблагоприятным воздействиям на биоту моря.

В лаборатории «Промышленная экология» при кафедре экологии и химических технологий Каспийского государственного университета технологий и инжиниринга имени Ш. Есенов» (Казахстан) в результате скрининга отобраны аборигенные штаммы микроорганизмов-нефтедеструкторов *Bacillus subtilis* и *Acinetobacter johnsonii*, выделенные из морской воды портов Баутино и Актауского. Для данных штаммов изучены культурально-морфологические, физиолого-биохимические свойства, исследована способность к деструкции нефти и нефтепродуктов, определены эмульгирующие свойства и исследована их биосовместимость. На основе этих культур создан биопрепарат, для которого разработана технологическая схема производства, подобраны оптимальные условия для наращивания биомассы бактерий.

Целью данной работы как раз таки и явилось изучение нового препарата в модельных системах для определения степени деструкционной активности по отношению к нефти.

Методология и методы исследования. Для апробации биопрепарата были поставлены микроэкосистемы на основе морской воды Северного Каспия и суспензий штаммов [4]. Последние вносили в количестве 10^6 — 10^7 КОЕ / мл по объёму. В качестве загрязнителя в микроэкосистемы вносили нефть (1% от общего объёма). Контролем служила морская вода без внесения нефти и суспензий штаммов (контроль I), а также микроэкосистема, загрязнённая нефтью, но без внесения суспензии штаммов (контроль II). Морскую воду по 10 л вносили в аквариумы, открытые для газообмена и естественного освещения при температуре 25°C.

Вода в микроэкосистемах исследовалась на общую обсеменённость микроорганизмами и численность углеводородоксилирующих микроорга-

низмов. Численность сапротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов выявляли методом предельных разведений и проращиванием их на плотных питательных средах: питательном агаре для сапротрофов и среде Миллса с добавлением нефти для углеводородокисляющих бактерий [5; 6].

Пробы воды из микроэкосистем отбирались в момент их постановки, через 5, 15, 30 и 60 суток экспозиции. Содержание нефтепродуктов определяли на 30-е сутки эксперимента флюориметрическим методом на анализаторе жидкости «Флюорат-02-3М» и гравиметрическим методом, путём экстракции нефти хлороформом через 60 суток экспозиции [1; 2].

Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью пакета статистического анализа программы Microsoft Excel 2003 и STATISTICA 6.0.

Организация исследования. Для изучения процесса деструкции нефти в морской воде при внесении полученного биопрепарата применялись экспериментальные модельные микроэкосистемы с достаточно полным приближением к реальным условиям. Их использование позволяет выяснить воздействие загрязнителя на биогеоценозы и проследить динамику очищения водоёмов с участием абиотических и биотических факторов среды.

В работе была проведена постановка пяти модельных микроэкосистем:

1) контрольная микроэкосистема I. В контрольный аквариум вносили только морскую воду;

2) контрольная микроэкосистема II. Вносили морскую воду и нефть (1% от общего объёма);

3) вариант 1. В микроэкосистему вносили морскую воду, нефть (1% от общего объёма), полученный биопрепарат на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Acinetobacter johnsonii* (100 мл);

4) вариант 2. В микроэкосистему вносили морскую воду, нефть (1% от общего объёма), полученный биопрепарат на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Acinetobacter johnsonii* (50 мл) и суспензию штаммов *Serratia grimesii* (50 мл);

5) вариант 3. В микроэкосистему вносили морскую воду, нефть (1% от общего объёма), полученный биопрепарат на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Acinetobacter johnsonii* (50 мл), суспензию штамма *Serratia grimesii* и *Bacillus* 16 (по 25 мл).

Культуры *Serratia grimesii* и *Bacillus* 16 любезно предоставлены коллекцией микроорганизмов кафедры гидробиологии и общей биологии Астраханского государственного технического университета.

При постановке и экспозиции модельных микроэкосистем проводились микробиологические исследования по определению общего микробного числа и численности нефтеокисляющих микроорганизмов в морской

воде. Перед внесением биопрепарата и двух дополнительных культур для данных микроорганизмов проверяли концентрации клеток. Начальные показатели численности микробных клеток в биопрепарате составили порядка от $2,8 \cdot 10^7$ до $7,8 \cdot 10^7$ КОЕ / мл.

При внесении нефти на поверхности воды образовалась тонкая нефтяная флуоресцирующая плёнка.

Высев из микроэкосистем проводился в момент постановки. Общая численность микроорганизмов в микроэкосистемах составила: для контрольных сосудов — $1,5 \cdot 10^5$ и $2,1 \cdot 10^5$ КОЕ / мл, а для вариантов — от $1,9 \cdot 10^8$ до $3,7 \cdot 10^8$ КОЕ / мл. Численность углеводородоокисляющих микроорганизмов в контрольных микроэкосистемах — $2,8 \cdot 10^3$ и $3,6 \cdot 10^3$ КОЕ / мл, в вариантах — от $1,4 \cdot 10^5$ до $6,5 \cdot 10^5$ КОЕ / мл.

На 15-е сутки эксперимента нефтяная плёнка на поверхности воды в микроэкосистемах с микроорганизмами начала образовывать сгустки и конгломераты. В контроле II нефтяная плёнка была подобна эмульсии. Микробиологические анализы морской воды в микроэкосистемах показали, что на 15-е сутки численность микроорганизмов резко возрастает. Общее микробное число в контроле I — $8,9 \cdot 10^5$ КОЕ / мл, в контроле II — $6,2 \cdot 10^6$ КОЕ / мл, в вариантах с микроорганизмами численность увеличивается на три порядка (до $2,3 \cdot 10^9$ КОЕ / мл). Численность углеводородоокисляющих микроорганизмов составила в контроле II — $4,7 \cdot 10^5$ КОЕ / мл, в вариантах с микроорганизмами численность увеличивается до $6,8 \cdot 10^8$ КОЕ / мл, в контроле I увеличения не наблюдается.

Через 30 суток производили высев морской воды для определения численности бактерий. Общее микробное число в контроле I составило $3,6 \cdot 10^5$ КОЕ / мл, в контроле II — $2,1 \cdot 10^5$ КОЕ / мл, в вариантах с микроорганизмами — до $5,3 \cdot 10^8$ КОЕ / мл. Численность углеводородоокисляющих микроорганизмов составляла в контроле II — $6,3 \cdot 10^4$ КОЕ / мл, в вариантах с микроорганизмами — до $7,1 \cdot 10^7$ КОЕ / мл, в контроле I увеличения численности не наблюдается.

Концентрация нефтепродуктов в морской воде через 30 суток экспозиции представлена (таблица 1).

При анализе результатов отмечено, что в микроэкосистемах, в которые вносились микроорганизмы, наблюдается активная деструкция нефти. В контроле II снижение концентрации также отмечено, но незначительное ($1,9$ мг / дм^3), т. е. имеет место процесс самоочищения, который протекает в морской среде. В контроле I концентрация нефти находится на уровне ПДК (предельно допустимой концентрации) ($0,05$ мг / дм^3).

На 60-е сутки производили высев морской воды из микроэкосистем для определения численности бактерий. Установлено, что общее микробное число во всех микроэкосистемах снизилось: в контроле I составляет

Т а б л и ц а 1 — Концентрация нефти в микрэкосистемах через 30 суток эксперимента

Микрэкосистема	Начальная концентрация нефти, мг / дм ³
Контроль I	0,05 ± 0,02
Контроль II	8,10 ± 2,00
Вариант 1	2,10 ± 0,50
Вариант 2	3,40 ± 0,90
Вариант 3	3,00 ± 0,70

$7,2 \cdot 10^3$ КОЕ / мл, в контроле II — $3,6 \cdot 10^4$ КОЕ / мл, в вариантах с микроорганизмами численность составляла до $6,2 \cdot 10^6$ КОЕ / мл. Количество углеводородокисляющих микроорганизмов в контроле II оказалось на уровне $3,9 \cdot 10^3$ КОЕ / мл, в вариантах с микроорганизмами — до $8,3 \cdot 10^5$ КОЕ / мл, в контроле I — $0,6 \cdot 10^2$ КОЕ / мл; т. е., по сравнению с предыдущими (на 30-е сутки) результатами по определению численности микроорганизмов, наблюдается снижение количества бактерий. Это может быть объяснено тем, что оставшиеся нефтяные фракции очень сложные для биodeградации. В контроле II (действие аборигенной микрофлоры) наблюдается отмирание бактериальных клеток. В вариантах 1, 2, 3 численность микроорганизмов снизилась, но на два порядка выше, чем в контроле II. Это свидетельствует о том, что в данных микрэкосистемах процессы деградации сложных нефтяных фракций продолжаются.

Как результат исследования по истечении 60 суток был проведён анализ по концентрации нефти в микрэкосистемах гравиметрическим методом (таблица 2).

Анализ результатов гравиметрического определения содержания нефти показывает, что максимальная степень деструкции нефти характерна для варианта I, куда вносили биопрепарат на основе аборигенного консорциума

Т а б л и ц а 2 — Концентрация нефти в микрэкосистемах через 60 суток эксперимента

Микрэкосистема	Конечная концентрация нефти, мг / дм ³
Контроль I	0,03 ± 0,01
Контроль II	3,50 ± 0,08
Вариант 1	0,10 ± 0,02
Вариант 2	0,45 ± 0,06
Вариант 3	0,15 ± 0,04

штаммов *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter johnsonii*. По степени деструкции близким по исследуемым свойствам оказался вариант 3: конечные показатели содержания нефти составили 0,15 мг / дм³ морской воды. Для варианта 2 отмечены более высокие показатели содержания нефти на конечном этапе эксперимента (0,45 мг / дм³). Это может быть объяснено тем, что штаммы *Serratia grimesii* и *Bacillus* 16 не были изначально проверены на антагонистические свойства по отношению к культурам в составе биопрепарата. Возможно, именно эти свойства повлияли на менее выраженную деструкцию нефти, по сравнению с вариантом 1.

В микроэкосистеме контроль II конечная концентрация нефти высока, по сравнению с микроэкосистемами с бактериальными клетками, но значительно ниже начальных показателей. Эта микроэкосистема характеризует физико-химические процессы, протекающие в морской среде (испарение, оседание, растворение, окисление, образование агрегатов, седиментация).

Заключение. Проведена апробация нефтеразрушающего препарата на основе бактериальных штаммов *Bacillus subtilis* и *Acinetobacter johnsonii* в лабораторных условиях. На всех этапах эксперимента проводился микробиологический контроль за общей численностью микроорганизмов и углеводородоксилирующих бактерий. В результате данного эксперимента установлено, что за 60 суток воздействия биопрепарата на нефть в морской воде концентрация первой снизилась до 0,1 мг / дм³ от исходного содержания 10 мг / дм³. Таким образом, деструкция нефти на основе аборигенного сообщества микроорганизмов составила 90%. Результаты проведенных исследований доказывают эффективность созданного биопрепарата. Следовательно, его можно рекомендовать для процессов доочистки морской среды в случае несанкционированных сбросов и аварийных разливов нефти и нефтепродуктов в казахстанском секторе Каспия.

Список цитируемых источников

1. Белоусова, Н. И. Деструкция нефтепродуктов различной степени конденсации микроорганизмами при пониженных температурах / Н. И. Белоусова, А. Н. Шкидченко // Прикладная биохимия и микробиология. — 2004. — Т. 40. — № 3. — С. 312—316.
2. Другов, Ю. С. Экологическая аналитическая химия / Ю. С. Другов. — СПб.: Изд-во Анатолия, 2000. — 432 с.
3. Миронов, О. Г. Бактериальная трансформация нефтяных углеводородов в прибрежной зоне моря / О. Г. Миронов // Морской эколог. журн. — 2002. — № 1. — Т. I. — С. 56—66.
4. Одум, Ю. Экология : в 2 т. / Ю. Одум. — М.: Мир. — 1986. — Т. 1. — 376 с.
5. Практикум по микробиологии : учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений / А. И. Нетрусов [и др.]; под ред. А. И. Нетрусова. — М.: Академия, 2005. — 608 с.
6. Mills, A. L. Enumeration of petroleum - degrading marine and estuarine microorganisms by the most probable number method / A. L. Mills, C. Breule, R. R. Colwell // Canad. J. Microbiol. — 1978. — V. 24. — № 5. — P. 552.

Материал поступил в редакцию 15.09.2014.