

УДК 665.637

А.К. САДАНОВ<sup>1</sup>, С.А. АЙТКЕЛЬДИЕВА<sup>2</sup>, О.Н. АУЭЗОВА<sup>3</sup>, Э.Р. ФАЙЗУЛИНА<sup>2</sup>

## ОЦЕНКА УГЛЕВОДОДОКИСЛЯЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ХЛОРИДНОМ ЗАСОЛЕНИИ И ИХ РОСТ НА НЕФТЕПРОДУКТАХ

(Центр биологических исследований МОН РК<sup>1</sup>, Институт микробиологии и вирусологии МОН РК<sup>2</sup>,  
Институт почвоведения им. У. У. Успанова МСХ РК<sup>3</sup>)

*Изучена способность бактериальных штаммов, выделенных из нефтезагрязненных почв Атырауской области, утилизировать нефтяную смесь в жидкой среде при различных концентрациях NaCl. Отмечено, что большинство исследованных штаммов наиболее интенсивно потребляли нефть при 1 и 2 % хлоридного засоления. Проведен анализ роста этих культур на отдельных углеводородах. Показано, что лучшие всего они растут на керосине и дизельном топливе, рост на бензине незначителен.*

Освоение запасов нефти и газа вывело Казахстан в разряд крупнейших нефтедобывающих стран мира. Нефтегазовая отрасль обеспечивает коренные изменения социально-экономических условий жизни населения страны. Вместе с тем она является одной из главных экологически опасных отраслей хозяйства. Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами приводит к серьезным нарушениям природных экосистем. В первую очередь это касается районов Прикаспийской низменности, в частности Атырауской области, где расположены основные нефтедобывающие площади Казахстана [1, 2].

Нефтехимическое загрязнение почв отмечается на площади всех действующих нефтегазовых месторождений и происходит на всех стадиях разработки, транспортировки и при хранении. Пропитывая профиль почвы, нефтяные загрязнители изменяют ее физическое состояние, миграцию веществ, нарушают водно-воздушный режим, структурное состояние и углеродно-азотный баланс. Положение усугубляется еще и тем, что сами почвы этого региона малогумусные, с высокой степенью засоления, карбонатные, щелочные, с низкой поглотительной способностью, бесструктурные. Все эти признаки свидетельствуют об относительно низкой буферности экологических функций почв указанного региона по сравнению с антропогенными нагрузками, в том числе и с нефтехимическим загрязнением [3]. Реабилитация почв с невысокой самоочищающей способностью в засушливых условиях пустыни протекает медленно. Механическое удаление разлитой на поверхности нефти приводит к сня-

тию плодородного слоя почвы. Применение химических веществ типа сорбентов, эмульгаторов и др. для восстановления нефтезагрязненных почв также нежелательно, поскольку многие из них являются ксенобиотиками и обладают токсичными свойствами [4].

Наиболее приемлемым способом очистки нефтезагрязненных экосистем является биоремедиация, т.е. использование в этих целях живых организмов [5] и в первую очередь микроорганизмов. Ускорить очистку почвы от нефти возможно активизацией метаболической активности естественной микрофлоры, для чего используют хорошо известные агротехнические и агрохимические приемы обработки почв, или внесением в загрязненную среду специально подобранных активных нефтеокисляющих микроорганизмов, которые должны быть выделены непосредственно из мест загрязнения, т.е. уже адаптированы к существующим условиям [6]. Последнее особенно важно для биоремедиации нефтезагрязненных почв Атырауской области, так как они имеют ярко выраженный тип хлоридно-сульфатного засоления [7].

Цель работы – изучение биодеструкционной активности штаммов микроорганизмов, выделенных из нефтезагрязненных почв Атырауской области, по отношению к нефти в жидкой среде с различными концентрациями NaCl, а также изучение их роста на отдельных углеводородах.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Из почвенных образцов различных нефтегазовых месторождений Атырауской области, длительное время контактирующих с нефтяны-

ми углеводородами, методом накопительных культур было выделено 9 бактериальных штаммов, которые согласно общепризнанным методикам [8] определены как *Micrococcus roseus* 34, *Micrococcus roseus* 40, *Rhodococcus maris* 65, *Acinetobacter calcoaceticus* 2-A, *Micrococcus roseus* 6-A, *Rhodococcus erythropolis* 7-A, *Arthrobacter globiformis* 44-A, *Microbacterium lacticum* 8-C, *Microbacterium lacticum* 41-3. Медико-биологические исследования этих штаммов показали, что все они могут быть отнесены к невирулентным, непатогенным и нетоксичным [9].

Для изучения нефтеокисляющей активности отобранных штаммов использовали среду следующего состава (г/л):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1;  $\text{MgSO}_4$  – 0,2;  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,02;  $\text{FeCl}_3$  – следы; pH 7,0–7,2. Режим стерилизации 1 атм – 30 мин. Использовали среду без соли и с 1, 2, 3% NaCl от количества среды. В качестве единственного источника углерода в среду вносили смесь нефтей различных месторождений, которая по химическим параметрам представляла собой широкий спектр различных углеводов (1% по объему). Культивирование микроорганизмов проводили в колбах Эрленмейера, содержащих 100 мл жидкой селективной среды, на круговой качалке (180 об/мин) при 30 °C в течение 14 сут. Инокулирование колб с нефтью проводили суспензией бактерий (5 мл на 100 мл среды) с определенной величиной оптической плотности. Количественное определение остаточной нефти выполняли весовым методом [10].

При изучении биологического окисления нефтепродуктов использовали ту же среду, куда в качестве единственного источника углерода вносили соответствующее углеводородное соединение. Оптическую плотность бактериальной суспензии при этом определяли после трехкратного отмывания биомассы буферным раствором от питательной среды и последующего ресуспендирования. Измерения проводили на ФЭК-56М в кювете с длиной оптического пути 3 мм при 540 нм [11].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

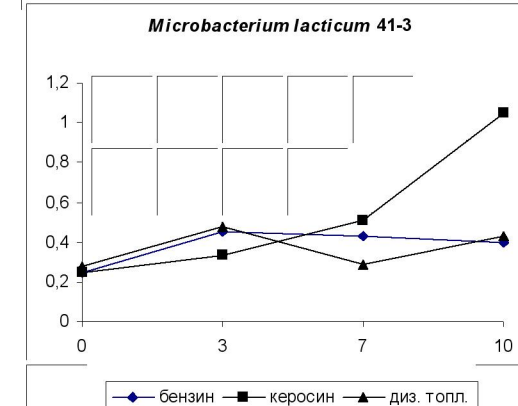
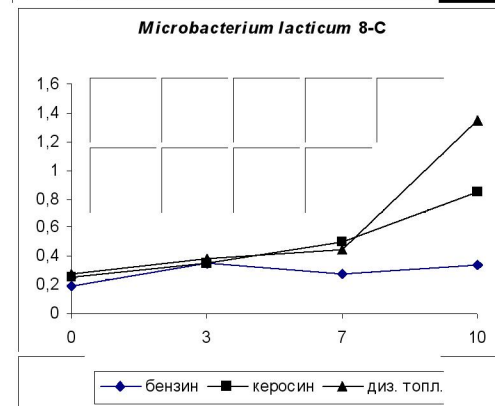
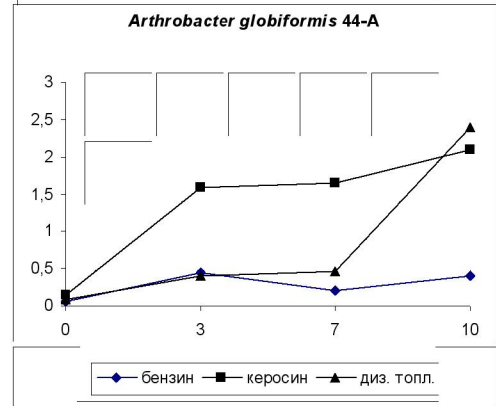
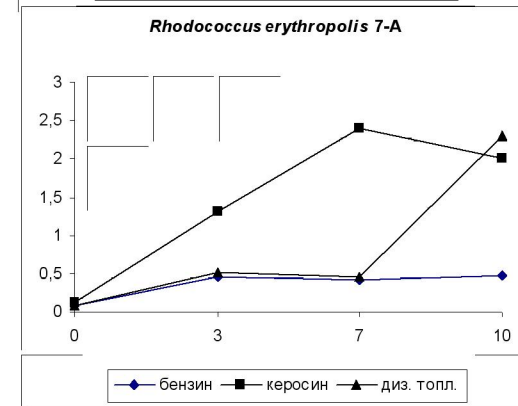
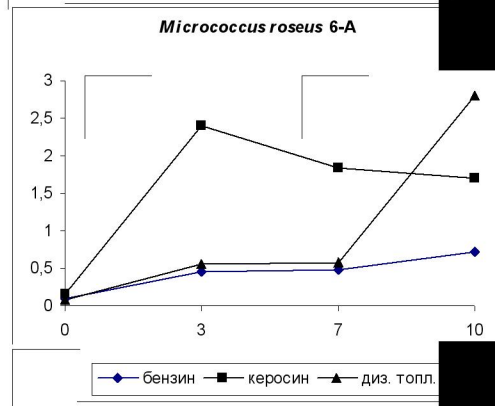
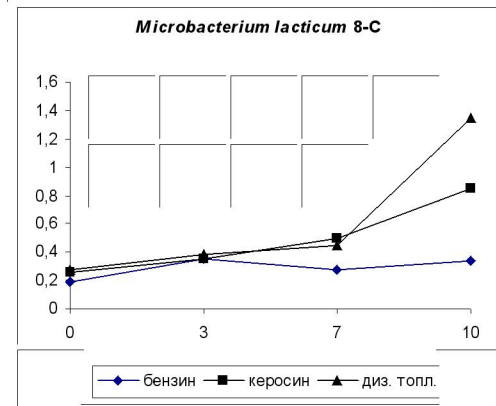
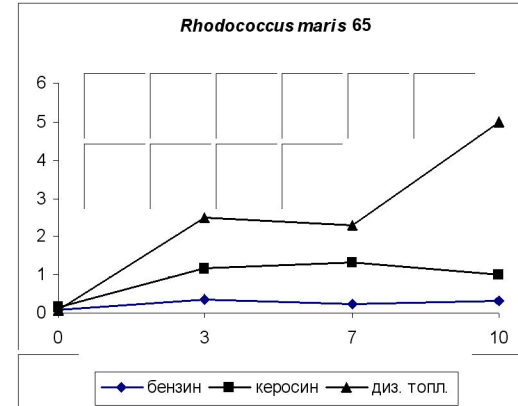
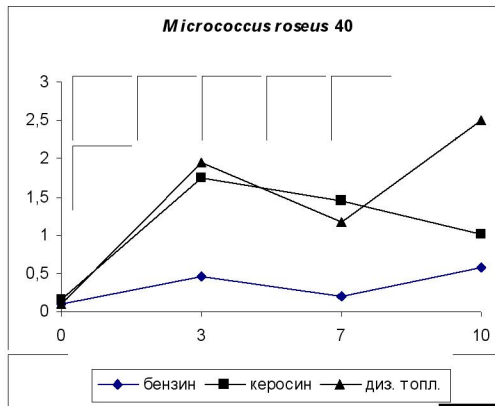
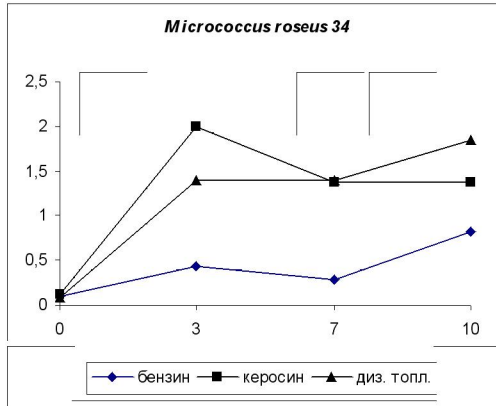
Процессы самовосстановления нефтезагрязненных почв Атырауской области затруднены из-за недостаточности почвенной влаги и неболь-

шого количества осадков в летний период. Серьезной проблемой является естественная засоленность большинства степных почв, к которым добавляется еще и вторичное засоление пластовыми водами. Внедрение в почвенно-поглощающий комплекс почв большого количества солей, особенно хлоридно-натриевого состава, способствует быстрой деградации структуры почвы и превращению ее в монолитную структуру [12].

Биоремедиация *in situ* таких почв может происходить эффективно только с помощью микроорганизмов, адаптированных к такому типу засоления. Выделенные из нефтезагрязненных почв микроорганизмы-деструкторы проверяли на способность утилизировать нефть при различных концентрациях хлористого натрия в 3-кратной повторности. Данные, приведенные в таблице, показывают, что большинство исследованных штаммов наиболее интенсивно утилизировали нефть при концентрации NaCl 1 и 2%. Несколько ниже эта способность была при содержании соли 3%. Только два штамма (*Rhodococcus maris* 65 и *Microbacterium lacticum* 41-3) были способны активно (свыше 60%) потреблять нефть на среде без соли. При этом для штамма 65 с увеличением концентрации NaCl в среде деструкционная активность резко снижается. Штамм *Arthrobacter globiformis* 44-A утилизирует нефть практически на одном уровне при всех концентрациях NaCl. Штамм 41-3 потребляет нефть как в присутствии соли, так и без нее, но при высокой концентрации (3%) потребление нефтяной смеси заметно снижается.

Учитывая видовую принадлежность исследуемых культур, можно отметить, что у микрококков при наличии соли в среде утилизирующая способность возрастает. Родоккокки способны потреблять нефть как в отсутствие NaCl, так и при различных ее концентрациях. Для *Microbacterium lacticum* наличие в среде 3% соли является лимитирующим фактором. При этом отсутствие хлористого натрия не сказалось на активности штамма 41-3, тогда как штамм 8-C в этих условиях не показал высокой степени утилизации нефти. *Acinetobacter calcoaceticus* 2-A интенсивно потреблял нефть только при 1 и 2% NaCl.

Помимо нефтяной смеси изучали также рост активных нефтеокисляющих культур микроорга-



Рост активных нефтеокисляющих штаммов на нефтепродуктах

## Потребление нефтяной смеси активными культурами микроорганизмов с различной концентрацией NaCl

Штаммы	Степень утилизации нефти, %			
	без соли	1% NaCl	2% NaCl	3% NaCl
<i>Micrococcus roseus</i> 34	49,58	53,86	65,82	61,18
<i>Micrococcus roseus</i> 40	35,89	52,37	52,05	61,01
<i>Rhodococcus maris</i> 65	77,94	51,24	30,94	27,80
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 2-А	45,16	70,92	65,34	48,72
<i>Rhodococcus erythropolis</i> 7-А	44,94	58,09	64,99	61,00
<i>Arthrobacter globiformis</i> 44-А	50,54	62,43	56,31	53,07
<i>Microbacterium lacticum</i> 8-С	35,39	50,56	71,52	36,23
<i>Microbacterium lacticum</i> 41-3	68,76	76,07	63,42	36,19
Контроль	5,01	4,95	5,43	5,72

низмов на нефтепродуктах (бензин, керосин, дизельное топливо).

Результаты, представленные на рисунке, показывают, что все исследуемые штаммы лучше всего растут на керосине и дизельном топливе, на бензине все они проявляли слабую активность.

При росте на керосине штаммы 34, 40, 65, 2-А, 6-А и 44-А проявляли наибольшую активность уже на третьи, штамм 7-А – на седьмые, а штаммы 8-С и 41-3 – только на десятые сутки. На дизельном топливе практически все культуры накапливали максимальное количество биомассы на десятые сутки.

На керосине лучше всего росли штаммы 6-А, 7-А, 34, 44-А, 40. Эти же культуры, а также штамм 65 накапливали наибольшую биомассу и на дизельном топливе. Данные штаммы представлены родами *Micrococcus*, *Rhodococcus* и *Arthrobacter*. Представители родов *Acinetobacter* и *Microbacterium* по сравнению с ними проявляли меньшую активность.

Таким образом, показано, что углеводородокисляющие бактериальные штаммы, выделенные из нефтезагрязненных почв с хлоридным засолением, способны утилизировать нефть при различных концентрациях NaCl, но большинство из них наиболее активно проявляют эту способность при 1 и 2% засоления. При этом видовая принадлежность не имеет определяющего значения. Помимо активной утилизации нефти, они способны расти и на отдельных нефтепродуктах, также проявляя определенную избирательность. Все исследуемые штаммы наиболее активно росли на керосине и дизельном топливе.

Изученные активные бактериальные штаммы задепонированы в коллекции микроорганиз-

мов Института микробиологии МОН РК. Четыре штамма (*Micrococcus roseus* 34, *Rhodococcus maris* 65, *Acinetobacter calcoaceticus* 2-А и *Arthrobacter globiformis* 44-А) переданы для депонирования в Республиканскую коллекцию микроорганизмов НЦБ РК (г. Астана).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Диаров М.Д., Сериков Т.П. Проблемы экологии в нефтезагрязненном комплексе // Нефтегазоносность Казахстана: Тр. I Международ. конф. Алматы; Атырау, 2001. С. 153-162.
2. Ергалиев Т.Ж., Диаров М.Д., Юзбеков А.К. и др. Деятельность нефтегазового комплекса и окружающая среда // Международ. научно-практическая конф. «Перспективы устойчивого развития экосистем Прикаспийского региона» (Алматы, 29-30 июня 2004 г.). Алматы, 2004. С. 24-25.
3. Фаизов К.Ш., Раимжанова М.М., Алимбеков Ж.С. Экология Мангышлак-Прикаспийского нефтегазового региона. Алматы, 2003. 237 с.
4. Асанбаев И.К. Антропогенные изменения почв и их экологические последствия. Алматы, 1998. 180 с.
5. Вельков В.В. Биоремедиация: принципы, проблемы, подходы // Биотехнология. 1995. № 3-4. С. 20-27.
6. Пономарева Л.В., Крунчак В.Г., Торгованова В.А. и др. Биоремедиация нефтезагрязненной почвы с использованием биопрепарата «БИОСЭТ» и пероксида кальция // Биотехнология. 1998. № 1. С. 79-84.
7. Фаизов К.Ш. Почвы пустынной зоны Казахстана. Алма-Ата: Наука, 1983. 239 с.
8. Bergey's manual of Systematic Bacteriology. 1986. V. 2.
9. Айткельдиева С.А., Файзулина Э.Р., Тлеулина Ж.А., Ауэзова О.Н. Паспорта штаммов. Алматы, 2006.
10. Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. М.: Химия, 1984. С. 448-450.
11. Стабникова Е.В., Селезнева М.В., Рева О.Н., Иванов В.Н. Выбор активного микроорганизма-деструктора углеводородов для очистки нефтезагрязненных почв // Приклад. биохимия и микробиология. 1995. Т. 31, №5. С. 534-539.
12. Терещенко Н.Н., Лушников С.В., Митрофанова Н.А., Пилипенко С.В. Особенности биологической рекультивации нефтезагрязненных и техногенно засоленных почв // Экология и промышленность России. 2005. №5. С. 33-36.

### **Резюме**

Атырау облысының мұнаймен ластанған топырақтарынан бөлініп алынған бактериалдық штамдардың сұйық ортада NaCl-дың әртүрлі концентрациясында мұнай қоспаларын сіңіру қабілеттілігі зерттелінді. Зерттелінген штамдардың басым көпшілігі мұнайды 1 және 2% хлоридтік тұздану жағдайында белсенді сіңіретінін көрсетті. Осы микробтық дақылдардың өніп-өсуі жеке көмірсутектерінде талданды. Зерттеу нәтижесі олардың керосин мен дизель жанармайларында жақсы, ал бензинде мардымсыз болатынын көрсетті.

### **Summary**

The ability of bacteria strains, isolated from the oil contaminated soils of Atyrau oblast, to utilize oil mixture in a liquid medium under different concentrations of NaCl was studied. The majority of the studied strains were observed as the most active in accumulation of oil under 1-2% of chloride salinization. The analysis of these strains' development was performed on separate hydrocarbons. The best development was determined on kerosene and diesel fuel, the development on gasoline was insignificant.