

Разработанный спектрофотометрический метод определения плотности клеток представляет собой удобный вариант для скрининговых исследований.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бутенко Р.Г. Биология культивируемых клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-Пресс, 1999. 159 с.
2. Носов А.М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент // Физиология растений. 1999. Т. 46, № 6. С. 834-844.
3. Максимова Н.И., Мерзляк М.Н., Гусев М.В. Культура клеток и тканей в изучении взаимодействий патогена и растения-хозяина // Биол. науки. 1990. № 2. С. 6-19.
4. Сапко О.А., Утарбаева А.Ш., Кунаева Р.М. Использование культивируемых *in vitro* клеток картофеля для оценки биологической активности изолятов *Fusarium solani* // Биотехнология. Теория и практика. 2005. №3. С. 128-135.
5. Сапко О.А., Утарбаева А.Ш., Кунаева Р.М., Лугай Г.Л.

Получение культивируемых *in vitro* клеток *Solanum tuberosum* и использование их в фитовирусологических исследованиях // Изв. НАН РК. Серия биологическая и медицинская. 2004. № 2. С. 76-83.

6. Основы биотехнологии растений. Культура клеток и тканей: Учебное пособие. Уфа, 2002. 78 с.

## Резюме

Суспензиядағы картоп (*Solanum tuberosum*) клеткаларының тыңыздығын метилен көк бояуын пайдаланып спектрофотометриялық әдіспен анықтау сипатталған.

## Summary

In this article was described the spectrophotometrical method of density definition of potato *Solanum tuberosum* suspension cells with use of dye methylene dark blue.

УДК 576.88; 581.192.7

Институт молекулярной биологии  
и биохимии им. М. А. Айтхожина,  
г. Алматы

Поступила 20.12.08г.

С. А. АЙТКЕЛЬДИЕВА<sup>1</sup>, Э. Р. ФАЙЗУЛИНА<sup>1</sup>, О. Н. АУЭЗОВА<sup>2</sup>,  
А. А. КУРМАНБАЕВ<sup>1</sup>, С. Т. ИБРАГИМОВА<sup>1</sup>, Н. С. ДАМЕНОВА<sup>3</sup>

## ОЧИСТКА НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ МЕСТОРОЖДЕНИЯ ЖАНАТАЛАП АКТИВНЫМИ ШТАММАМИ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Большую опасность для окружающей среды представляет загрязнение почв нефтью в процессе ее добычи и транспортировки, так как происходит комплексное загрязнение токсичными углеводородами, буровыми растворами, пластовыми засоленными водами и тяжелыми металлами. На трассах трубопроводов зона разрушения может достигать 400 м. На предприятиях нефтепереработки, нефтехимии и нефтебазах почва загрязняется на значительную глубину, в грунтах под почвой могут образовываться линзы нефтепродуктов, которые могут попасть в грунтовые воды и загрязнить другие смежные среды. Возникает глобальная проблема загрязнения почвы нефтью и нефтепродуктами [1]. Например, в Атырауской области площади нефтезагрязненных почв составляют 1,3 млн. га, на отдельных промыслах глубина загрязнения составляет 10 м [2].

В результате негативного воздействия нефти на почву происходит ее деградация, ухудшение

свойств, возрастает содержание негидролизуемого остатка, засоление почвы, снижается порозность, падает содержание илестых частиц [3]. При этом происходит интенсивное затухание микробиологических процессов, поддерживающих ее плодородие.

В связи с этим все более актуальной становится разработка эффективных способов санации очагов техногенного загрязнения углеводородными соединениями.

Современная практика рекультивационных работ насчитывает довольно большое разнообразие способов очистки почвы от нефтепродуктов, однако полное восстановление биоценоза обеспечивают технологии, которые имеют своим завершением биоремедиацию. Технология биоремедиации основана на биодеградации углеводородов нефти под воздействием углеводородокисляющих микроорганизмов, способных усваивать нефтепродукты в качестве единственного источника углерода и энергии.

Цель настоящей работы – изучение возможности использования активных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки нефтезагрязненной почвы месторождения Жанаталап Атырауской области.

**Материалы и методы.** Для модельных экспериментов по очистке нативной нефтезагрязненной почвы использовали активные культуры нефтеокисляющих микроорганизмов *Micrococcus roseus* 34, *Rhodococcus maris* 65, *Acinetobacter calcoaceticus* 2-А, *Arthrobacter globiformis* 44-А, *Microbacterium lacticum* 41-3 и ртутьустойчивые штаммы Т1/12, Т6/1, Т10/77, Т10/79, ВВ28.

В сосуды вносили по 100 г почвы, 10 г цеолита, азот и фосфор в виде  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ . Культуры активных штаммов микроорганизмов выращивали на косяках РПА, затем стерильной водопроводной водой делали смывы в стерильную посуду. Для каждой культуры использовали отдельную колбу. Полученную суспензию вносили по 25 мл в каждый сосуд с загрязненной почвой. В качестве контроля служили нефтезагрязненные почвы с и без добавления цеолита и минеральных добавок. Почву периодически (раз в неделю) взрыхляли и увлажняли.

Определение исходного содержания нефти в почве и количество остаточной нефти через 2 мес эксперимента определяли гравиметрическим методом. С этой целью почвенные образцы экстрагировали гексаном и хлороформом.

Для определения численности физиологических групп микроорганизмов использовали стандартные микробиологические среды и методы [4, 5].

**Результаты и обсуждение.** Заложены модельные эксперименты по очистке нативной нефтезагрязненной почвы, отобранной на месторождении Жанаталап Атырауской области, активными культурами нефтеокисляющих микроорганизмов *Micrococcus roseus* 34, *Rhodococcus maris* 65, *Acinetobacter calcoaceticus* 2-А, *Arthrobacter globiformis* 44-А, *Microbacterium lacticum* 41-3 и ртутьустойчивыми штаммами Т1/12, Т6/1, Т10/77, Т10/79, ВВ28. Контролем являлась почва с и без внесения цеолита и минеральных добавок.

До постановки эксперимента в почве определяли исходное содержание нефти гравиметрическим методом. Результаты показали, что количество нефти в почве составило 35026 мг/кг почвы. Одновременно проводили микробиологический анализ используемой почвы. Установлено, что общее микробное число (ОМЧ) составило  $(3,67 \pm 0,35) \times 10^5$  кл/г, численность спорных бактерий была  $(2,79 \pm 0,30) \times 10^4$  кл/г, углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) – 95 кл/г, грибов –  $(1,07 \pm 0,19) \times 10^3$  кл/г.

Через два месяца после внесения активных нефтеокисляющих и ртутьустойчивых культур произошла убыль нефти на 25–60,4% (табл. 1). Тогда как в контроле 1 она составила 4,1%, в контроле 2 (с цеолитом) – 13,8%. Наибольшую активность показал штамм *Microbacterium lacticum* 41-3, наименьшую – штамм Т10/79. Штаммы *Acinetobacter calcoaceticus* 2-А, *Rhodococcus maris* 65, *Arthrobacter globiformis* 44-А, Т1/12 и Т6/1 утилизировали более 40% нефти.

Таблица 1. Содержание нефти в почве после обработки активными культурами нефтеокисляющих микроорганизмов

Культура	Количество нефти, мг/кг почвы		Степень утилизации нефти, %
	исходное	через 2 мес	
<i>Micrococcus roseus</i> 34	35026	21390,0	38,9
<i>Rhodococcus maris</i> 65	35026	19967,5	43,0
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 2-А	35026	19145,0	45,4
<i>Arthrobacter globiformis</i> 44-А	35026	20227,5	42,3
<i>Microbacterium lacticum</i> 41-3	35026	13890,0	60,4
Т1/12	35026	20000,0	42,9
Т6/1	35026	19702,5	43,6
Т10/77	35026	23747,5	32,2
Т10/79	35026	26272,5	25,0
ВВ28	35026	24547,5	30,0
Контроль 1 (загрязненная почва)	35026	33587,5	4,1
Контроль 2 (загрязненная почва с цеолитом)	35026	30210,0	13,8

Таблица 2. Численность физиологических групп микроорганизмов через 2 мес

Культура	ОМЧ, кл/г	Грибы, кл/г	Споровые бактерии, кл/г	УОМ, НВЧ кл/г
<i>Micrococcus roseus</i> 34	$(1,03 \pm 0,12) \cdot 10^7$	$(1,73 \pm 0,78) \cdot 10^3$	$(8,0 \pm 0,49) \cdot 10^4$	$4,5 \cdot 10^5$
<i>Rhodococcus maris</i> 65	$(1,67 \pm 0,67) \cdot 10^7$	$(5,33 \pm 0,33) \cdot 10^2$	$(8,23 \pm 0,54) \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^5$
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 2-A	$(1,98 \pm 0,37) \cdot 10^7$	$(2,57 \pm 0,50) \cdot 10^3$	$(7,70 \pm 1,07) \cdot 10^4$	$4,5 \cdot 10^6$
<i>Arthrobacter globiformis</i> 44-A	$(1,78 \pm 0,31) \cdot 10^7$	$(2,75 \pm 0,94) \cdot 10^3$	$(8,07 \pm 0,35) \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^6$
<i>Microbacterium lacticum</i> 41-3	$(7,0 \pm 0,36) \cdot 10^7$	$(2,45 \pm 0,41) \cdot 10^3$	$(7,20 \pm 0,56) \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^6$
T1/12	$(3,46 \pm 0,49) \cdot 10^8$	$(3,47 \pm 1,09) \cdot 10^3$	$(3,03 \pm 0,10) \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^6$
T6/1	$(2,96 \pm 0,81) \cdot 10^8$	$(2,50 \pm 0,52) \cdot 10^3$	$(3,94 \pm 0,15) \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^6$
T10/77	$(9,30 \pm 0,35) \cdot 10^7$	$(6,57 \pm 1,25) \cdot 10^3$	$(2,73 \pm 0,22) \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^7$
T10/79	$(1,89 \pm 0,34) \cdot 10^8$	$(4,20 \pm 0,36) \cdot 10^3$	$(2,49 \pm 0,35) \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^7$
ВВ28	$(3,65 \pm 0,08) \cdot 10^8$	$(1,77 \pm 0,35) \cdot 10^3$	$(3,07 \pm 0,34) \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$
Контроль 1 (загрязненная почва)	$(5,10 \pm 1,16) \cdot 10^6$	$(7,0 \pm 0,97) \cdot 10^3$	$(1,05 \pm 0,07) \cdot 10^5$	$4,5 \cdot 10^5$
Контроль 2 (загрязненная почва с цеолитом)	$(1,20 \pm 0,06) \cdot 10^7$	$(1,80 \pm 0,38) \cdot 10^3$	$(5,80 \pm 0,53) \cdot 10^4$	$3,0 \cdot 10^5$

*Примечание.* НВЧ кл/г – наиболее вероятное число клеток в 1 г почвы.

Микробиологический анализ показал, что через два месяца после внесения нефтеокисляющих штаммов ОМЧ увеличилось на два порядка и колебалось в пределах  $(1,03-9,30) \cdot 10^7$  кл/г, тогда как в контроле 1 – только на один порядок и составило  $5,1 \cdot 10^6$  кл/г (табл. 2).

Численность споровых бактерий осталась примерно на том же уровне для вариантов со штаммами 34, 65, 2-A, 44-A и 41-3, для вариантов с ртутьустойчивыми штаммами она возросла на два порядка. Содержание грибов изменилось незначительно. В то же время резко возросло количество УОМ. В опытных вариантах насчитывалось  $2,5 \cdot 10^5 - 2,0 \cdot 10^7$  кл/г, в контроле 1 и 2 (с цеолитом) –  $4,5 \cdot 10^5$  и  $3,0 \cdot 10^5$  кл/г соответственно.

Таким образом, результаты исследования показали эффективность применения нефтеокисляющих штаммов микроорганизмов для очистки нефтезагрязненных почв. При их внесении наблюдается снижение содержания нефти в почве, увеличивается ОМЧ и численность УОМ.

Наиболее активным оказался штамм *Microbacterium lacticum* 41-3, при внесении которого степень утилизации нефти составила 60,4%.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Мазур И.И., Молдаванов И.О. Курс инженерной экологии. М.: ВШ, 1999. 447 с.
2. Национальная экологическая стратегия Республики Казахстана. МПРиООС РК.
3. Ахметова К.К. Экологические последствия нефтехимического загрязнения / Мат. межд. научной конф. «Состояние и перспективы развития почвоведения». Алматы: Тетис, 2005. С. 192.

4. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардта и др. М.: Мир, 1983. 536 с.

5. Практикум по микробиологии / Под ред. Н. С. Егорова. М.: МГУ, 1976. 307 с.

#### Резюме

Атырау облысындағы Жаңаталап кен орындарында мұнаймен ластанған топырақты тазарту үшін мұнайотықтырғыш микроорганизмдердің белсенді штамдары қолданылып зерттелді. Модельді зерттеулер нәтижесі көрсеткіші бойынша, екі ай өткен соң көмірсу-төктотықтырғыш микроорганизмдерді енгізгеннен кейін топырақта мұнайдың төмендеуі 25–60,4% болса, ал өңделмеген топырақта тек 4,1% құрады. *Microbacterium lacticum* 41-3 штаммы біршама белсенділігін көрсетіп, топыраққа енгізгеннен кейін мұнайдың ыдырау дәрежесі 60,4% -ке жоңарылады.

#### Summary

The opportunity of using the active strains of oiloxidizing microorganisms for purification of oilpolluted soils of the deposit Zhanatalap of Atyrau region was studied. The results of the model experiments have shown, that in two months after entering hydrocarbonoxidizing microorganisms the loss of oil in soil was 25–60,4%, whereas in the non-treated soil only 4,1%. The strain *Microbacterium lacticum* 41-3 was the most active, it degraded 60,4 % of oil.

УДК 665.637

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии  
МОН РК, г. Алматы;

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт  
почвоведения и агрохимии им. У. У. Успанова»  
АО «КазАгроИнновация», г. Алматы;

<sup>3</sup>Казахский национальный аграрный  
университет, г. Алматы

Поступила 25.12.08г.