

УДК 576.809.558

С. А. АЙТКЕЛЬДИЕВА, И. Э. СМИРНОВА, М. Г. САУБЕНОВА, Е. А. ОЛЕЙНИКОВА,
Р. Ш. ГАЛИМБАЕВА, Т. В. КУЗНЕЦОВА, Л. Т. СМАЙЛОВА, А. К. САДАНОВ

НЕФТЕОКИСЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ АССОЦИАЦИЙ МИКРООРГАНИЗМОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ АТЫРАУСКОЙ ОБЛАСТИ

(РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, г. Алматы)

Созданы ассоциации из аборигенных штаммов дрожжей и бактерий, выделенных из нефтезагрязненных почв Атырауского месторождения нефти, изучена их нефтеокисляющая способность, исследована динамика изменения их количественного состава в процессе деструкции нефти. Отобраны ассоциации с высокой степенью утилизации углеводородов нефти, перспективные для практического применения.

Нефть и нефтепродукты относятся к наиболее распространенным загрязнителям биосферы. В настоящее время в Казахстане интенсивно эксплуатируются крупные месторождения нефти (Атырауское, Мангистауское, Актюбинское, Кызылординское и Чимкентское), в этой связи неизбежны разливы нефти и увеличение количества нефтезагрязненных почв. В результате контаминации почв нефтью и нефтепродуктами происходит не только их загрязнение, но и утрата почвенного плодородия, и они выбывают из практического использования. Процесс самовосстановления загрязненных почв является очень длительным и продолжается более 15-25 лет [1]. Важное место при очистке почв занимает интенсификация микробной деструкции нефтезагрязненных почв. При этом следует иметь в виду не только естественную активацию аборигенной микрофлоры загрязненных почв, но и внесение биологических препаратов, содержащих штаммы микроорганизмов, являющихся активными нефтедеструкторами.

В естественных биоценозах численность нефтеокисляющих бактерий зависит от климатических условий региона, типов почв, их водного режима, степени обработки и составляет в среднем менее 0,1 % от общей численности микроорганизмов в биоценозах. При попадании нефти или нефтепродуктов в почву численность нефтеокисляющих бактерий резко возрастает. Даже в песках, где микрофлора весьма скучна, при загрязнении ее дизельным топливом численность микроорганизмов деструкторов возрастает до 10^6 КОЕ/г почвы [2]. Поэтому важным для активации микрофлоры загрязненных почв является создание и

внесение в почву микробных ассоциаций и биопрепаратов для ликвидации нефтезагрязнения. При этом следует учитывать, что эффективность применения биопрепаратов и ассоциаций зависит от условий конкретного региона и характера нефтезагрязнений, поскольку нефть существенно отличается по своему составу. Также может оказаться, что сложившийся аборигенный микробиоценоз является антагонистическим по отношению к интродуцированным нефтедеструкторами. Поэтому предпочтительнее выделение активных аборигенных нефтедеструкторов, адаптированных к условиям региона и создание на их основе ассоциаций или биопрепаратов.

В последнее время для создания препаратов для биоремедиации нефтезагрязненных почв активно используются дрожжевые организмы и их ассоциации с бактериальными организмами [3-6]. Положительное влияние дрожжей – нефтедеструкторов связывают как с их способностью к синтезу поверхностно-активных веществ (ПАВ), оказывающих эмульгирующее действие на углеводороды загрязненных почв, так и со способностью к синтезу вторичных метаболитов (витамины группы В, ростовые факторы и др.), положительно влияющих на численность микроорганизмов и, как следствие, повышающих общую активность почвенных ферментов [7]. Целью исследования явилось создание ассоциаций из аборигенных штаммов дрожжей и бактерий, выделенных из нефтезагрязненных почв Атырауского месторождения, изучение их нефтеокисляющей способности, отбор наиболее перспективных и исследование динамики изменения их количественного состава в процессе деструкции нефти.

Материалы и методы

Объектами исследования служили дрожжевые организмы, выделенные из нефтезагрязненных почв месторождения Косшагыл Атырауской области в 2009 году, а также их ассоциации с нефтеокисляющими бактериями. Бактерии были любезно предоставлены лабораторией экологии микроорганизмов РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК.

Для культивирования и оценки нефтеразлагающей активности дрожжевых и бактериальных организмов и их ассоциаций использовали жидкие минеральные среды – среду Ворошиловой-Диановой и среду Шкидченко-Аринбасарова, содержащие в качестве единственного источника углерода и энергии нефть [8]. В опытах использовали тяжелую нефть месторождения Косшагыл ($d = 880\text{-}890 \text{ г}/\text{см}^3$). Культивирование дрожжевых и бактериальных организмов проводили в колбах на качалке (180-200 об/мин) при температуре 16 и 28-30 °C в течение 14 суток. Определение количественного состава и соотношения микроорганизмов в ассоциациях осуществляли методом предельных разведений с последующим подсчетом выросших колоний на чашках Петри со средами агар Ворта, Ридер и МПА. Количественное определение утилизации нефти проводили стандартным гравиметрическим методом по суммарному показателю убыли нефти в жидкой среде.

Накопление биомассы определяли весовым методом или по оптической плотности и выражали в г/мл и единицах ОП.

Результаты исследований были статистически обработаны с использованием критерия Стьюдента и измерения считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Из нефтезагрязненных почвенных образцов Атырауской области были выделены и отселекционированы 23 штамма дрожжевых организмов, способных к утилизации углеводородов нефти. Установлено, что выделенные дрожжи относятся к родам *Candida*, *Rhodotorula* и *Torula*. Из них отобрали три штамма рода *Candida* (ФС-4АТ, ФС-2Т, ФС-К) и один *Trichosporon sp.* ФС-2Л, обладающих наиболее высокой нефтеокисляющей активностью.

С целью повышения утилизации углеводородов нефти в загрязненных почвах были созданы ассоциации комплексного действия, представляющие смешанные культуры нефтеокисляющих дрожжей и бактерий.

На первом этапе работы провели оценку нефтеокисляющей способности ассоциаций, перспективных для биоремедиации нефтезагрязненных почв. Для этого исследовали нефтеокисляющую активность чистых культур дрожжей и бактерий, ассоциаций, состоящих только из штаммов дрожжей, только из бактериальных культур, а также ассоциаций, представляющих собой смешанные культуры дрожжей и бактерий. В общей сложности исследовано более 40 различных ассоциаций.

В результате проведенных исследований установлено, что нефтеокисляющая активность ассоциаций, состоящих только из бактерий была максимальной у штаммов П1+К3. Установлено, что введение одной или двух дрожжевых культур к бактериальным ассоциациям повышало утилизацию нефти в среднем на 9-13%. Показано, что максимальной нефтеокисляющей способностью (38,0-42,0 %) на среде с 2% нефти обладала ассоциация, состоящая из двух штаммов бактерий П1+К3 и одного штамма дрожжей *Candida sp.* ФС-4АТ.

В связи с тем, что препараты для биоремедиации вносят в нефтезагрязненные почвы в весеннее время года, провели изучение утилизации нефти при температуре 16 °C. Использовали ассоциации нефтеокисляющих микроорганизмов, показавшие лучшие результаты в предыдущем исследовании. Содержание нефти в среде Ворошиловой-Диановой составляло 1 %, длительность культивирования – 14 суток. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Утилизация углеводородов нефти ассоциациями микроорганизмов при температуре культивирования 16 °C

Вариант опыта	Остаточная нефть, г	Убыль нефти, %
Контроль	0,60	35
П1+ К3	0,51	45
П1+ К3+ФС-4АТ	0,40	52
П1+ К3+ФС-4АТ/6	0,30	77
П1+ К3+ ФС-К	0,43	50
П1+ К3+ ФС-2Т	0,48	48
П1+ К3+ ФС-2Л	0,50	46

Из данных табл. 1 видно, что при температуре культивирования 16 °С ассоциации микроорганизмов хорошо утилизируют углеводороды нефти. Максимальную активность окисления нефти, достигающую 77%, отмечали при использовании ассоциации П1+К3+ФС-4АТ/6.

Способность штаммов микроорганизмов к деградации нефти зависит не только от активности их ферментной системы, но и от количества клеток, осуществляющих этот процесс. В связи с этим изучали изменение количества клеток

микроорганизмов и их соотношения в процессе разложения нефти. В качестве единственного источника углерода и энергии использовали нефть в количестве 2 %. Длительность культивирования составляла 14 суток. Для постановки опытов использовали ассоциации, состоящие из двух штаммов бактерий П1+К3 и одного из штаммов дрожжей *Candida sp.* ФС-4АТ, *Candida sp.* ФС-4АТ/6. Общий объем посевной суспензии составлял 1 мл на 100 мл среды. Исходное соотношение клеток бактерий и дрожжей составляло 2:1.

Таблица 2. Динамика изменения численности микроорганизмов в ассоциациях в процессе разложения нефти

Ассоциации	Количество микроорганизмов в ассоциациях, КОЕ/мл						Убыль нефти, %	
	1 сут.		7 сут.		14 сут.			
	дрожжи	бактерии	дрожжи	бактерии	дрожжи	бактерии		
П1+К3+ФС-4АТ	$3,4 \times 10^4$	$6,8 \times 10^4$	$8,7 \times 10^4$	$2,6 \times 10^6$	$1,110^6$	$4,6 \times 10^8$	57	
П1+К3+ФС-4АТ/6	$3,3 \times 10^4$	$6,6 \times 10^4$	$5,1 \times 10^5$	$3,9 \times 10^8$	$4,0 \times 10^7$	$5,810^8$	67	
П1+К3+ФС-К	$3,5 \times 10^4$	$7,1 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$2,7 \times 10^7$	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^8$	54	

Результаты исследований показали, что динамика изменения численности микроорганизмов варьирует в зависимости от штаммов микроорганизмов, использованных для составления ассоциаций. Так, в двух ассоциациях П1+К3+ФС-4АТ и П1+К3+ФС-4АТ/6 численность как дрожжей, так и бактерий к 14 суткам культивирования увеличивается. Причем в ассоциации П1+К3+ФС-4АТ/6, где численность дрожжей была выше, отмечена максимальная утилизация нефти, которая составляла 67%. При культивировании ассоциации П1+К3+ФС-К отмечали постепенное увеличение численности бактерий, при одновременном снижении количества дрожжей, у этой же ассоциации отмечали меньший процент утилизации нефти, который был достаточно высоким и составлял 54%. Из полученных результатов следует сделать вывод, что при составлении ассоциаций необходим тщательный подбор партнеров и введение дрожжевых культур в ассоциации положительно сказывается на утилизации углеводородов нефти.

Таким образом, созданы ассоциации из аборигенных штаммов дрожжей и бактерий, выделенных из нефтезагрязненных почв Атырауского месторождения нефти, изучена их нефтеокисляющая способность, исследована динамика

изменения их количественного состава в процессе деструкции нефти. Отобраны ассоциации с высокой степенью утилизации углеводородов нефти, перспективные для создания биопрепаратов для использования при очистке нефтезагрязненных почв Атырауской области.

ЛИТЕРАТУРА

- Исмаилов Н.М., Ахмедов А.Г., Ахмедов В.А. Рекультивация нефтезагрязненных земель сухих субтропиков Азербайджана // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М.: Наука, 1988. С. 206-221.
- Лиханова И.А., Хабибуллина Ф.М., Куракова А.В. Характеристика растительности и почв, рекультивируемых песчаных пустошей Устинского нефтяного месторождения (Коми) // Почвоведение. 2008. № 8. С. 1101-1112.
- Предпатент РК №16965. Штамм нефтеокисляющих дрожжей *Candida sp. B2*, используемый для очистки почвы от нефти и нефтепродуктов. Опубл. 15.02.2006, бюл. № 2.
- Предпатент РК № 16964. Штамм нефтеокисляющих дрожжей *Trichosporon sp. P20CO2*, используемый для очистки почвы от нефти и нефтепродуктов. Опубл. 15.02.2006, бюл. № 2.
- Awe S., Micolasch F., Hammer E., Schauer F. Degradation of phenylalcanes and characterization of aromatic intermediates acting as growth inhibiting substances in hydrocarbon utilizing yeast *Candida maltosa* // Int. Biodegradation & Biodegradation. 2008. V. 62. Iss. 4. P. 408-414.
- Sood N., Lal B. Isolation a novel yeast strain *C. digboiensis* TERI ASN6 capable of degrading petroleum hydrocarbons in acidic conditions // J. of Envir. Management. 2009. V. 90. Iss. 5. P. 1728-1736.

7. Ганиткевич Я.В. Поверхностно-активные вещества микробного происхождения // Биотехнология . 1988. Т. 4, № 5. С. 575-583.

8. Шкидченко А.Н., Аринбасаров М.У. Изучение нефте-деструктивной активности микрофлоры прибрежной зоны Каспийского моря // Прикл. биохим. и микроб. 2002. Т. 38, № 5. С. 509-512.

Резюме

Атырау облысының мұнаймен ластанған топырағынан бөлініп алынған ашытқылар мен бактериялардан ассоциациялар шығарылып, олардың мұнай қышқылдан-

дырыш қабілеті мен сандық құрамының өзгеру динамикасы зерттелді. Практика жүзінде қолдануға болатын жоғары дәрежедегі мұнай көмірсуларын ыдырататын ассоциациялар іріктеліп алынды.

Summary

Associations of aboriginal strains of yeast and bacteria from oil-polluted soils of Atyrau oilfield were created. Their oil-oxidizing activity and dynamics of their quantitative compound changes in the process of oil destruction were investigated. The associations, perspective for practical use, with a high level of oil-hydrocarbons utilization were selected.