

УДК 665.637.631.427.2

С.А. АЙТКЕЛЬДИЕВА^{}, Э.Р. ФАЙЗУЛИНА^{*}, О.Н. АУЭЗОВА^{**},
А.А. КУРМАНБАЕВ^{*}, С.Т. ИБРАГИМОВА^{*}, Р. АИПОВА^{*}*

БИОРЕМЕДИАЦИЯ ЗАГРЯЗНЕННОЙ НЕФТЬЮ ПОЧВЫ АССОЦИАЦИЯМИ АКТИВНЫХ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Изучена способность ассоциаций нефтеокисляющих микроорганизмов деградировать нефть месторождения Жанаталап Атырауской области. Модельные эксперименты показали, что при внесении консорциумов в средне- и сильно загрязненные нефтью почвы степень очистки через 3 месяца составила 63,8-72,0% и 60,4-64,4% соответственно, тогда как в контроле только 36,4% и 31,8%. Микробиологический анализ показал, что в обработанных почвах наблюдалось увеличение общего микробного числа (ОМЧ) и численности углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) по сравнению с контрольным вариантом.

Состояние почвенного покрова, являющегося долговременным аккумулятором техногенных загрязняющих веществ, служит ведущим критерием оценки экологического состояния природной среды. Токсические вещества из почвы распространяются по пищевым цепям, в этой связи актуальным становится вопрос о «здоровье» почвы. Особенно остро стоит эта проблема для токсичных углеводородов нефти, которые являются основным источником загрязнения почв в нефтедобывающих регионах страны (1).

В районах нефтегазовых месторождений даже слабое загрязнение почвы углеводородами приводит к падению микробиологической активности, что снижает способность почвы к самоочищению. В районах нефтедобычи происходит техногенное опустынивание почв до 30% и полное уничтожение экосистем до 21,7% дорогами, свалками, карьерами, нефтепроводами.

Нефть является основным компонентом загрязнения почв в Прикаспии, степень загрязнения почв достигает 10-30 г/кг, причем визуально «чистых участков». На старых промыслах замазченность почв достигает глубины 10 м (2).

Загрязнение почв нефтью приводит к глубокому изменению практически всех основных характеристик почвы – морфологических, физических, химических и биологических свойств. Это обуславливает потери почвами плодородия и отторжению их из сельскохозяйственного землепользования, загрязнению углеводородами нефти и сопутствующими веществами сопредельных сред и негативному воздействию на живые организмы (3).

В связи с вышеизложенным проблема очистки нефтезагрязненных почв приобретает все

большую остроту. В решении этой проблемы значительную роль играют технологии биоремедиации почв, основанные на использовании способности почвенных микроорганизмов окислять углеводороды нефти до конечных нетоксичных продуктов.

Одним из методов биоремедиации почв является введение в загрязненную экосистему биопрепараторов на основе монокультуры или ассоциаций нефтеокисляющих микроорганизмов, которые способны активно расщеплять углеводороды нефти до безвредных продуктов. Скорость естественной биодеградации нефти может быть ограничена низкой плотностью углеводородокисляющих микроорганизмов, при внесении же дополнительных штаммов в почву она может значительно повыситься.

Цель данной работы – изучение возможностей применения ассоциаций активных нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки нефтезагрязненных почв.

Материалы и методы.

Модельные эксперименты по деградации нефти проводили на искусственно загрязненной почве (~5 и 10% нефти месторождения Жанаталап Атырауской области) с использованием шести составленных ассоциаций нефтеокисляющих микроорганизмов.

В сосуды вносили по 100 г почвы, 10 г цеолита, азот и фосфор в виде $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, 5 и 10% нефти. Культуры активных нефтеокисляющих микроорганизмов выращивали на косяках РПА, затем стерильной водопроводной водой делали смывы в стерильную посуду. Для каждой ассоциации использовали отдельную колбу. Получен-

ную суспензию вносили по 25 мл в каждый сосуд с загрязненной почвой. В качестве контроля служили нефтезагрязненные почвы с (контроль 1) и без добавления цеолита (контроль 2) и минеральных добавок. Почву периодически взрыхляли и увлажняли.

Через 1 и 3 месяца проверяли утилизирующую способность, как спонтанной микрофлоры (контроль), так и внесенных ассоциаций. С этой целью почвенные образцы экстрагировали гексаном и хлороформом. Количество остаточной нефти определяли гравиметрическим методом (4).

Одновременно проводили микробиологический анализ. Учитывали следующие группы микроорганизмов: общее микробное число (ОМЧ); спорообразующие бактерии; углеводородокисляющие микроорганизмы (УОМ); микроскопические грибы.

Готовили почвенную суспензию (10 г почвы вносили в колбу со 100 мл стерильной воды), затем делали разведения до 1:10⁸. Для учета ОМЧ высевы производили из разведений 10⁴-10⁶ на чашки Петри с РПА, спорообразующих бактерий – из разведений 10², 10³ на чашки Петри с РПА, предварительно пастеризовав их при 80°C в течение 10 минут. УОМ учитывали на жидкой среде ВД с нефтью высевом из разведений 10²-10⁸. Наличие микроскопических грибов определяли на среде Ворт-агар, высевы производили из разведений 10-10³ (5, 6).

Были использованы следующие консорциумы:

1. 1A – штаммы П1, П5, ТТ26, ТТ29
2. 2R – штаммы 34, 65, 44-А
3. 3W – штаммы 2-А, 41-3
4. 4M – штаммы 2-А, 41-3, Т11-25, Т11-26
5. 5N – штаммы 1ЕА, 2 ЕА, 3 ЕА, 4 ЕА, 5 ЕА, 6 ЕА

6. 6Х – штаммы Т1/12, Т6/1, Т10/77, Т10/79, ВВ28

Эксперимент включал следующие варианты: почва + 5 и 10 % нефти (контроль 1); почва + 5 и 10% нефти + цеолит + NPK (контроль 2);

почва + 5 и 10% нефти + цеолит + NPK + ассоциации.

Титр внесенных клеток составил 10⁹ кл/г. Раз в неделю проводилось рыхление почвы, влажность поддерживалась на уровне 60%.

Результаты и обсуждение.

Исследовали возможность очистки почвы, загрязненной нефтью м. Жанаталап, шестью ассоциациями нефтеокисляющих микроорганизмов, которые были составлены на основании изучения их антагонистических свойств.

Через 1 и 3 месяца был произведен отбор проб почвы и экстракция остаточной нефти гексаном и хлороформом. Результаты анализа представлены в таблицах 1 и 2. Через 1 месяц в контроле 1 в почве с 5% загрязнения естественная утилизация составила 26,6%, а при добавлении цеолита и удобрений (контроль 2) – 31,7%. Внесение ассоциаций активных нефтеокисляющих микроорганизмов в почву способствовало снижению содержания нефти на 18-30% по отношению к контролю 2. Через 3 месяца остаточное количество нефти в контрольных вариантах составило 63,6 и 55,4%, соответственно, тогда как в опытных образцах – всего лишь 28-36,2%, т.е. практически в 2 раза меньше. Наилучшую деструкционную способность показали ассоциации 2R, 3W, 4M, при этом через один месяц наиболее активной была ассоциация 4M, а по истечении трех месяцев – 2R.

Таблица 1. Утилизация нефти ассоциациями микроорганизмов в почве с 5%-м загрязнением

Ассоциация	Кол-во внесенной нефти, г	Кол-во остаточной нефти, г	% утилизации нефти	Кол-во внесенной нефти, г	Кол-во остаточной нефти, г	% утилизации нефти
1A	5,0524	2,4000	52,5	5,1361	1,7565	65,8
2R	5,2668	2,4500	53,5	4,9196	1,3648	72,0
3W	5,1158	2,3430	54,2	5,1288	1,5489	69,8
4M	5,0132	1,8180	63,7	5,0721	1,6845	66,8
5N	5,1162	2,4628	51,9	5,1194	1,8523	63,8
6Х	5,0314	2,3938	52,4	4,9209	1,6977	65,5
Контроль 1	5,0724	3,7240	26,6	4,9800	3,1673	36,4
Контроль 2	5,3100	3,5370	33,4	5,0478	2,7965	44,6

Таблица 2. Утилизация нефти ассоциациями микроорганизмов в почве с 10%-м загрязнением

Ассоциация	Кол-во внесенной нефти, г	Кол-во остаточной нефти, г	% утилизации нефти	Кол-во внесенной нефти, г	Кол-во остаточной нефти, г	% утилизации нефти
	через 1 месяц			через 3 месяца		
1A	9,7243	5,1093	47,4	10,2043	3,6838	63,9
2R	10,0749	5,2065	48,3	10,1857	3,6465	64,2
3W	10,3233	5,1760	49,8	10,5315	3,7478	64,4
4M	10,3064	5,3653	47,9	10,4766	3,9595	62,2
5N	9,6998	5,3463	44,7	10,3226	4,0878	60,4
6X	10,4736	5,5673	46,8	10,2799	3,9535	61,2
Контроль 1	10,4757	7,6585	26,9	10,7637	7,4308	31,8
Контроль 2	11,0134	7,5242	31,7	10,5931	6,6419	37,3

Таблица 3. Численность микроорганизмов в нефтезагрязненной почве через 1 месяц после внесения ассоциаций

Ассоциация	ОМЧ, кл/г	Грибы, кл/г	Споровые бактерии, кл/г	УОМ, НВЧ кл/г
5% нефти				
1A	(1,53 ± 0,18) × 10 ⁸	ед.	(6,10 ± 0,45) × 10 ⁴	1,4 × 10 ⁶
2R	(9,37 ± 0,56) × 10 ⁷	ед.	(9,67 ± 1,79) × 10 ³	1,4 × 10 ⁶
3W	(7,63 ± 0,50) × 10 ⁸	ед.	(4,0 ± 0,36) × 10 ⁴	1,1 × 10 ⁶
4M	(4,34 ± 0,12) × 10 ⁸	ед.	(8,20 ± 0,52) × 10 ⁵	4,5 × 10 ⁵
5N	(1,53 ± 0,71) × 10 ⁸	ед.	(8,13 ± 0,52) × 10 ⁴	1,4 × 10 ⁶
6X	(3,04 ± 0,10) × 10 ⁸	0	(2,79 ± 0,10) × 10 ⁵	1,4 × 10 ⁶
Контроль 1	(2,90 ± 0,10) × 10 ⁷	0	(1,93 ± 0,25) × 10 ⁴	1,4 × 10 ⁵
Контроль 2	(2,04 ± 0,08) × 10 ⁸	ед.	(7,0 ± 1,24) × 10 ³	1,4 × 10 ⁶
10% нефти				
1A	(1,36 ± 0,07) × 10 ⁸	0	(2,45 ± 0,35) × 10 ⁴	1,4 × 10 ⁶
2R	(3,63 ± 0,35) × 10 ⁸	ед.	(8,67 ± 1,70) × 10 ³	1,4 × 10 ⁵
3W	(3,57 ± 0,35) × 10 ⁸	0	(2,07 ± 0,26) × 10 ⁴	4,5 × 10 ⁵
4M	(7,43 ± 0,50) × 10 ⁸	ед.	(2,87 ± 0,31) × 10 ⁴	4,5 × 10 ⁵
5N	(1,78 ± 0,08) × 10 ⁸	ед.	(1,07 ± 0,19) × 10 ⁴	1,5 × 10 ⁵
6X	(4,0 ± 0,36) × 10 ⁷	ед.	(2,31 ± 0,09) × 10 ⁵	1,1 × 10 ⁶
Контроль 1	(1,31 ± 0,08) × 10 ⁷	ед.	(6,33 ± 1,45) × 10 ³	1,5 × 10 ⁴
Контроль 2	(2,70 ± 0,30) × 10 ⁸	ед.	(4,0 ± 0,36) × 10 ⁴	1,1 × 10 ⁵

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

При 10% загрязнении содержание остаточной нефти через месяц после внесения ассоциаций составило 50,2-55,3%, а через три месяца – 35,6-39,6% (таблица 2). Наилучшую утилизирующую способность также проявили ассоциации 2R, 3W, 4M и 1A. В контрольных вариантах 1 и 2 через 3 месяца в почве, загрязненной как 5%, так и 10% нефти, естественная убыль была выше на 0,5 г по сравнению с 1 месяцем инкубации.

Таким образом, ассоциации 2R, 3W, 4M являлись наиболее перспективными для очистки загрязненных почв м. Жанаталап Атырауской области.

Таблица 4. Численность микроорганизмов в нефтезагрязненной почве через 3 месяца после внесения ассоциаций

Ассоциация	ОМЧ, кл/г	Грибы, кл/г	Споровые бактерии, кл/г	УОМ, НВЧ кл/г
5% нефти				
1A	(1,51 ± 0,10) × 10 ⁸	(6,27 ± 0,19) × 10 ³	(1,44 ± 0,03) × 10 ⁶	2,0 × 10 ⁷
2R	(7,2 ± 0,99) × 10 ⁸	(1,01 ± 0,12) × 10 ⁴	(9,73 ± 1,70) × 10 ⁴	2,0 × 10 ⁶
3W	(1,57 ± 0,20) × 10 ⁹	(1,77 ± 0,35) × 10 ³	(8,37 ± 1,13) × 10 ⁴	2,0 × 10 ⁶
4M	(1,34 ± 0,12) × 10 ⁷	(2,01 ± 0,40) × 10 ⁴	(8,77 ± 0,53) × 10 ⁵	1,1 × 10 ⁵
5N	(2,85 ± 0,02) × 10 ⁸	(7,93 ± 1,30) × 10 ⁴	(7,83 ± 0,48) × 10 ⁴	7,5 × 10 ⁴
6X	(2,54 ± 0,03) × 10 ⁸	(1,33 ± 0,09) × 10 ⁵	(2,84 ± 0,07) × 10 ⁶	2,0 × 10 ⁶
Контроль 1	(4,19 ± 0,17) × 10 ⁷	(7,33 ± 2,41) × 10 ²	(3,17 ± 0,32) × 10 ⁴	1,5 × 10 ⁴
Контроль 2	(2,0 ± 0,03) × 10 ⁸	(1,84 ± 0,11) × 10 ⁴	(6,93 ± 0,18) × 10 ⁴	2,0 × 10 ⁵
10% нефти				
1A	(1,28 ± 0,04) × 10 ⁸	(4,33 ± 0,32) × 10 ⁵	(1,35 ± 0,58) × 10 ⁶	1,5 × 10 ⁷
2R	(1,98 ± 0,17) × 10 ⁹	(6,1 ± 0,47) × 10 ³	(1,01 ± 0,05) × 10 ⁵	1,5 × 10 ⁶
3W	(1,49 ± 0,03) × 10 ⁹	(4,7 ± 0,49) × 10 ³	(1,37 ± 0,09) × 10 ⁴	1,5 × 10 ⁶
4M	(1,15 ± 0,16) × 10 ⁹	(1,87 ± 0,08) × 10 ⁴	(7,83 ± 1,58) × 10 ⁴	1,5 × 10 ⁶
5N	(1,70 ± 0,15) × 10 ⁸	(1,40 ± 0,07) × 10 ⁴	(2,04 ± 0,12) × 10 ⁵	4,5 × 10 ⁵
6X	(2,47 ± 0,21) × 10 ⁸	(4,12 ± 0,13) × 10 ⁵	(2,64 ± 0,05) × 10 ⁶	7,5 × 10 ⁵
Контроль 1	(2,85 ± 0,09) × 10 ⁷	(1,61 ± 0,22) × 10 ⁴	(4,20 ± 0,17) × 10 ⁴	1,1 × 10 ⁴
Контроль 2	(4,78 ± 0,09) × 10 ⁸	(1,73 ± 0,86) × 10 ⁴	(2,67 ± 0,33) × 10 ³	7,5 × 10 ⁴
Примечание НВЧ кл/г – наиболее вероятное число клеток в 1 г почвы				

Через 3 месяца после внесения ассоциаций в почве с 5% нефти ОМЧ осталось на том же уровне, что и через 1 месяц (таблица 4). В почве с 10% нефти наблюдалось увеличение общей численности до 10^9 кл/г в вариантах с ассоциациями 2R, 3W и 4M. В контрольных вариантах эти значения не изменились. Резко увеличилось количество грибов до 10^2 - 10^3 кл/г. В почвах, в которые были внесены ассоциации 1A, 2R и 6X, насчитывалось на один - два порядка больше споровых бактерий, чем наблюдалось через месяц. Численность углеводородокисляющих микроорганизмов повысилась только в опытных образцах почвы с 10% загрязнением.

Таким образом, результаты экспериментов показали, что внесение ассоциаций активных нефтеокисляющих микроорганизмов в загрязненную почву способствовало снижению содержания нефти. Так, при 5% загрязнении количество остаточной нефти через три месяца после внесения ассоциаций составило 28-36,2%, а при 10%-35,6-39,6% (при абсолютном остаточном содержании 1,3648-1,8523 и 3,7478-4,0878 г/100 г почвы, соответственно), при этом наблюдалось увеличение численности гетеротрофной и углеводородокисляющей микрофлоры по сравнению с загрязненной почвой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кожевин П.А. Здоровье почвы как проблема биотехнологии // Мат. 4 международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 12-16 марта 2007. - С.114.

2. Диаров М.Д., Гилажсов Е.Г., Димеева Л.А. и др. Экология и нефтегазовый комплекс. – Алматы, Галым, 2003. -

Т.2. – 340 с.

3. Кураков А.В., Ильинский В.В., Котелевцев С.В., Садчиков А.П. Биондикация и реабилитация экосистем при нефтяных загрязнениях – М.: Изд. «Графикон», 2006. – 336 с.

4. Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. – М.: Химия, 1984. - С. 448-450.

5. Практикум по микробиологии / под ред. Нетрусова А.Н. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.

6. Практикум по микробиологии / под ред. Егорова Н.С. – М.: МГУ, 1976. – 307 с.

Резюме

Атырау облысындағы Жанаталап өңіріндегі ластаңған топырактарды мұнайдың ыдырауына мұнайтотықтырыш микроағзалар қауымдастырының әсері зерттелген. Модельді тәжірибелерде, мұнаймен орташа және катты ластаңған топыракка, микроағзалардың консорциумын косқанда, 3 айдан соң топырактың тазалануы 63,8-72,0% және 60,4-64,4% жеткен, ал бақылау үлгілерінде 36,4-31,8%. Микробиологиялық зерттеулердің нәтижесі бойынша бақылау үлгілеріне қарағанда жалпы микробтық саны және көмірсүтектотықтырыш микроағзалар анағұрлым жоғары екендігі байқалған.

Summary

Ability of associations of oil-oxidizing microorganisms to degrade oil of Zhanatalap deposit of Atyrau region was studied. Modelling experiments have shown, that at entering consortia in middle and strong polluted soils the degree of oil degradation in 3 months has made 63,8-72,0 % and 60,4-64,4 % accordingly, whereas in the control only 36,4 % and 31,8 %. The microbiological analysis has shown, that in processed soils increase of common microbial number and number of hydrocarbon-oxidizing microorganisms in comparison with a control variant is observed.

*ДГП «Институт микробиологии и вирусологии» РГП «ЦБИ» КН МОН РК,

**НИИ почвоведения и агрохимии им. У.У. Успанова АО «КазАгроИнновация».