

УДК 576.809.558

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

## **ВЛИЯНИЕ АССОЦИАЦИЙ МИКРООГАНИЗМОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ НА ИХ БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ**

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

*Установлено, что применение ассоциаций микроорганизмов для биоремедиации нефтезагрязненных почв существенно влияет на микробиологические показатели почвы, активизирует их ферментативную активность, значительно повышая дегидрогеназную, каталазную и липазную активность почвы и увеличивает активность почвенного дыхания, тем самым, положительно влияет на плодородие почв.*

В настоящее время нефть и нефтепродукты оказывают все большее влияние на биосферу нашей планеты, которое характеризуется увеличением загрязнения окружающей среды. В связи с этим, вопрос борьбы с нефтяным загрязнением почв приобрел особую остроту. Многие почвы практически утратили способность к самовосстановлению. В плане использования естественных механизмов природных процессов самоочищения и самовосстановления нефтезагрязненных почв, наиболее перспективным и научно-обоснованным является усиление в них жизнедеятельности полезной микрофлоры, способствующей восстановлению почвенного плодородия. Микроорганизмы являются единственной группой организмов, представители которой обладают способностью использовать углеводороды в качестве источника углеродного питания, и их роль в процессах превращения нефти в природе уникальна [1, 2].

В Казахстане имеются крупные месторождения нефти и газа, которые в настоящее время интенсивно эксплуатируются. В связи с этим неуклонно возрастает количество нефтезагрязненных почв, выбывающих из практического пользования для нужд человека. Контаминация почв нефтью приводит к утрате почвенного плодородия, загрязнению их углеводородами и сопутствующими токсическими веществами, что негативно влияет на все живые организмы. Существует большое количество микробных препаратов для биоремедиации нефтезагрязненных почв, созданных на основе монокультур и ассоциаций микроорганизмов. В последнее время интенсивно разрабатываются и успешно применяются биопрепараторы на основе ассоциаций микроорганизмов, в состав которых входят разные группы микробов, но чаще всего бактерии и дрожжевые организмы [3-5]. Однако, эффективность биопрепараторов, интродуцируемых в нефтезагрязненные почвы, зависит от конкретного региона и бывает, что введение микроорганизмов - нефтедеструкторов не дает положительного эффекта вследствие антагонизма с аборигенной микрофлорой. В настоящее время для биоремедиации почв в Казахстане используются, в основном, малоэффективные препараты импортного производства. Поэтому создание отечественных биопрепараторов является насущной проблемой восстановления нефтезагрязненных почв. Изучение новых перспективных ассоциаций микроорганизмов, состоящих из аборигенных казахстанских штаммов, адаптированных к местным климатическим и экологическим условиям является перспективной и актуальной задачей современного времени, что и явилось целью данного исследования.

### **Материалы и методы**

Объектами исследования служили ассоциации дрожжей и бактерий, выделенные из нефтезагрязненных почв месторождений Атырауской области в 2009-2011 годах. Бактериальная ассоциация состояла из двух штаммов П1 и К3, ассоциация бактерий и дрожжей, включала два штамма бактерий П1иК3 и один штамм дрожжей ФС-4АТ, показавших наиболее хорошие

результаты в предварительных опытах. Для культивирования и оценки нефтеразлагающей активности ассоциаций дрожжевых и бактериальных организмов использовали жидкие минеральные среды - среду Ворошиловой - Диановой и среду Шкидченко-Аринбасарова, содержащие в качестве единственного источника углерода и энергии нефть [6].

Модельные опыты по изучению влияния ассоциаций дрожжей и бактерий на биологическую активность нефтезагрязненных почв проводили в лабораторных условиях. Для опытов использовали почву - солонец солончак пустынной Атырауской области, количество вносимой нефти составляло 5%. В опытах использовали тяжелую нефть месторождения Косшагыл ( $d = 880\text{-}890 \text{ г}/\text{см}^3$ ).

Общее количество микроорганизмов различных таксономических групп и число микроорганизмов отдельных физиологических групп в почве определяли по общепринятой методике [7]. Определение каталазной активности проводили согласно методике [8] и выражали в мл  $\text{O}_2$ , выделившегося за одну минуту на грамм почвы. Дегидрогеназную активность определяли по методике [8] и выражали в единицах оптической плотности. Оптическую плотность определяли на цифровом ФЭКе АР-101 (Япония) при длине волны 460 нм. Липазную активность почвы определяли по методу Козлова и выражали в мл 0,1 н КОН на 1 г почвы [9]. Дыхательную активность почвы определяли весовым методом Изермайера и выражали в г поглощенного  $\text{CO}_2$  [10].

Микробиологическую характеристику и активность микробных ферментов почвы (каталаза, дегидрогеназа, липаза), а также активность дыхания почв, исследовали в динамике, проводя отбор проб почв через 7, 30 и 60 суток после внесения нефти и культур микроорганизмов.

Количественное определение утилизации нефти проводили стандартным гравиметрическим методом по суммарному показателю убыли нефти в жидкой среде.

Статистическую достоверность полученных результатов определяли по коэффициенту Стьюдента для доверительной вероятности  $p < 0,01$ .

## Результаты и их обсуждение

В лабораторных условиях были поставлены модельные опыты по изучению влияния ассоциаций дрожжей и бактерий на биологическую активность нефтезагрязненных почв.

Для оценки микробного разнообразия почвы были выбраны такие показатели как качественный состав микроорганизмов основных таксономических групп, а также численность бактерий различных физиологических групп (гетеротрофы, олиготрофы, споровые).

Из табл. 1 видно, что в начале поведения опытов (7 сут.) микробный состав контрольной, загрязненной и рекультивированной с помощью ассоциаций микроорганизмов почв был разнообразен и в нем присутствовали все таксономические группы микроорганизмов: бактерии, актиномицеты, дрожжи и грибы. Однако с течением времени микрофлора нефтезагрязненной почвы существенно менялась. Так, через 30 суток практически исчезли из микрофлоры загрязненной почвы грибные и дрожжевые организмы, их отсутствие отмечали и через 60 суток. Численность актиномицетов осталась практически без изменения. Исследование бактериальной микрофлоры показало, что количество гетеротрофных и олиготрофных бактерий в нефтезагрязненной почве несколько увеличилось по сравнению с контролем.

Проведение биоремедиации с помощью нефтеокисляющих ассоциаций существенно изменило микробный пейзаж почвы. Так, при биоремедиации почв сохранился состав всех таксономических групп микроорганизмов, однако существенно изменилось их количество. Значительно увеличилось число бактерий разных физиологических групп на 1 г почвы, таких как гетеротрофы, олиготрофы и споровые бактерии, что свидетельствует о значительной активизации почвенных процессов. При проведении биоремедиации в течение 60 суток значительно снизилось число актиномицетов. Так, если количество актиномицетов в загрязненной почве составляло  $2,0 \times 10^7 \text{ КОЕ}/\text{г}$ , то в вариантах опытов с ассоциациями П1+К3 и П1+К3+ФС-4АТ оно составляло  $5,1 \times 10^2$  и  $2,0 \times 10^2 \text{ КОЕ}/\text{г}$  почвы соответственно. Отмечено, что в процессе биоремедиации почвы число микроскопических грибов снижается на порядок, а в вариантах опытов с ассоциацией П1+К3+ФС-4АТ выявлено увеличение содержания дрожжей на три порядка по сравнению с исходной почвой на фоне значительного возрастания числа нефтеокисляющих микроорганизмов.

Таблица 1. Динамика изменения численности микроорганизмов различных таксономических групп

Длительность опыта	Варианты опыта	Бактерии, КОЕ/г почвы			Актиномицеты, КОЕ/г почвы	Дрожжи, КОЕ/г почвы	Грибы, КОЕ/г почвы	Нефтеокисляющие, КОЕ/г почвы
		гетеротрофные	олиготрофы	споровые				
7 сут.	Контроль (почва)	$2,1 \times 10^9$	$1,4 \times 10^5$	$5,4 \times 10^3$	$3,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^3$	0
	Контроль 1 (почва + нефть)	$1,3 \times 10^{10}$	$2,4 \times 10^7$	$4,8 \times 10^3$	$2,7 \times 10^7$	$1,3 \times 10^3$	$5,2 \times 10^3$	0
	Ассоциация П1+К3	$7,4 \times 10^9$	$1,1 \times 10^8$	$4,1 \times 10^3$	$2,1 \times 10^7$	$0,9 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$	+
	Ассоциация П1+К3+ФС-4АТ	$2,5 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^7$	$3,8 \times 10^3$	$1,8 \times 10^7$	$3,8 \times 10^5$	$2,5 \times 10^2$	+
30 сут.	Контроль (почва)	$2,8 \times 10^9$	$2,5 \times 10^5$	$5,7 \times 10^3$	$3,2 \times 10^7$	$0,2 \times 10^2$	$2,8 \times 10^3$	0
	Контроль 1 (почва + нефть)	$1,2 \times 10^{10}$	$4,8 \times 10^7$	$5,0 \times 10^3$	$2,9 \times 10^7$	0	0	0
	Ассоциация П1+К3	$9,2 \times 10^9$	$5,9 \times 10^8$	$5,8 \times 10^3$	$1,1 \times 10^7$	$2,6 \times 10^2$	$2,1 \times 10^3$	с.р.г*
	Ассоциация П1+К3+ФС-4АТ	$6,8 \times 10^{10}$	$4,9 \times 10^7$	$5,6 \times 10^3$	$1,5 \times 10^7$	$6,0 \times 10^5$	$2,7 \times 10^2$	с.р.г
60 сут.	Контроль (почва)	$2,8 \times 10^9$	$2,8 \times 10^5$	$5,5 \times 10^3$	$3,5 \times 10^7$	$1,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^3$	0
	Контроль 1 (почва + нефть)	$1,3 \times 10^{10}$	$2,4 \times 10^7$	$5,4 \times 10^3$	$2,0 \times 10^7$	0	0	0
	Ассоциация П1+К3	$9,2 \times 10^{12}$	$8,0 \times 10^8$	$7,2 \times 10^3$	$5,1 \times 10^2$	$0,5 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	с.р.г
	Ассоциация П1+К3+ФС-4АТ	$8,2 \times 10^{10}$	$6,8 \times 10^7$	$6,5 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	$7,6 \times 10^5$	$2,5 \times 10^2$	с.р.г

\* с.р.г – сплошной рост по всему газону.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о высокой реакции микроорганизмов на присутствие в ней загрязняющих веществ, что дает возможность интерпретировать результаты микробиологических исследований как биодиагностические показатели. Кроме того, проведение биоремедиации с ассоциациями нефтеокисляющих микроорганизмов приводит к значительному увеличению количества бактерий разных физиологических групп, что свидетельствует об активизации почвенных процессов.

Одним из показателей отображающих экологическое состояние почвы, является ферментативная активность почв, рассматриваемая как совокупность процессов, катализируемых ферментами почвенной биоты. С этой целью изучали динамику изменения почвенных ферментов (каталазы, дегидрогеназы, липазы), а также дыхательную активность почв. Полученные данные представлены в табл. 2.

Из данных табл. 2 видно, что исходная почва солонец солончак пустынной Атырауской области характеризуется крайне низкой активностью почвенных ферментов. Это объясняется высокой засоленностью данного типа почвы, которая отрицательно сказывается на ее ферментативной активности. При внесении в почву нефти в количестве 5 % активность дегидрогеназы через 30 суток увеличивается в 2,5 раза, через 60 суток в 4,0 раза по сравнению с этими показателями у исходной почвы, при этом активность каталазы несколько увеличивается с течением времени, а активность липазы практически не меняется. Эти данные хорошо коррелируют с увеличением численности гетеротрофных и олиготрофных бактерий, которые являются одними из основных физиологических групп микроорганизмов, отвечающих за биологическую активность почв.

При проведении биоремедиации нефтезагрязненных почв с использованием ассоциаций микроорганизмов установлено, что активность почвенных ферментов значительно возрастает по сравнению с их уровнем как в исходной, так и в нефтезагрязненной почве. Показано незначительное снижение активности микробных ферментов почвы во всех вариантах опытов после 30 суток биоремедиации, видимо, это связано с тем, что микроорганизмы к этому времени

**Таблица 2. Динамика изменения ферментативной активности почвы с нефтяным загрязнением в процессе биоремедиации**

Длгт. опыта	Варианты опыта	Активность почвенных ферментов		
		Дегидрогеназа	Катализ	Липаза
7 сут.	Контроль (почва)	0,12	2,2	3,6
	Контроль 1 (почва + нефть)	0,30	2,4	3,6
	Ассоциация П1+К3	0,75	2,0	3,8
	Ассоциация П1+К3+ФС-4АТ	0,87	2,8	3,6
1 мес.	Контроль (почва)	0,12	2,2	3,6
	Контроль 1 (почва +нефть)	0,60	2,6	3,3
	Ассоциация П1+К3	0,35	1,8	3,7
	Ассоциация П1+К3+ФС-4АТ	0,65	1,5	4,3
2 мес.	Контроль (почва)	0,12	2,2	3,6
	Контроль 1 (почва +нефть)	0,49	2,5	3,4
	Ассоциация П1+К3	0,71	2,8	8,0
	Ассоциация П1+К3+ФС-4АТ	0,82	3,0	4,8

утилизируют легкие фракции нефти и перестраиваются для усвоения трудноутилизируемых фракций нефти. После 60 суток биоремедиации максимальное повышение активности микробных ферментов почвы отмечали в варианте с использованием ассоциации, состоящей из бактерий и дрожжей (П1+К3+ФС-4АТ). Так, активность дегидрогеназы превышала в 1,7 раза, каталазы в 1,2 раза, а липазы в 1,3 раза аналогичные показатели нефтезагрязненной почвы.

Почвенное дыхание является не только показателем биохимических и биологических процессов, но также и показателем плодородия почвы в целом. В этой связи изучали влияние ассоциаций дрожжей и бактерий на активность дыхания в нефтезагрязненных почвах в течение двух месяцев. Полученные данные представлены в табл. 3.

**Таблица 3. Динамика активности дыхания в нефтезагрязненной почве в процессе биоремедиации**

Варианты опыта	Дыхательную активность почвы				
	Дата отбора проб				
	28.06.	12.07.	26.07.	12.08.	26.08.
Контроль (почва)	0,12	0,13	0,11	0,09	0,11
Контроль 1 (почва +нефть)	0,13	0,13	0,17	0,16	0,15
Ассоциация П1+К3	0,14	0,17	0,16	0,16	0,20
Ассоциация П1+К3+ФС-4АТ	0,13	0,18	0,17	0,17	0,18

Как видно из табл. 3, исходная почва характеризовалась низким уровнем активности дыхания, что указывает на нахождение в ней микроорганизмов в физиологически не активном состоянии. Внесение нефти в количестве 5 % несколько активизировало дыхательную активность, в тоже время применение ассоциаций нефтеокисляющих микроорганизмов приводило к увеличению активности дыхания почвы в 1,6-1,8 раза по сравнению с исходной почвой и в 1,2-1,3 раза по сравнению с нефтезагрязненной почвой.

Таким образом, показано, что применение для биоремедиации нефтезагрязненных почв исследуемых ассоциаций микроорганизмов существенно изменяет микробиологические показатели почвы, активизирует ферментативную активность нефтезагрязненных почв, значительно повышая дегидрогеназную, каталазную и липазную активность почвы и увеличивает активность дыхания и, тем самым, положительно влияя на ее плодородие. Показано, что наиболее высокие показатели биологической активности почвы были при использовании ассоциация бактерий и дрожжей П1+К3+ФС-4АТ.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Квасников Е.И., Клошникова Т.М. Микроорганизмы - нефтедеструкторы нефти в водных бассейнах. – Киев: Наукова думка, 1981. – 132 с.
- 2 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.
- 3 Zinjarde S.S., Pant A.A. Hydrocarbon degraders from tropical marine environments // Marine Population Bulletin. – 2002. – V. 44. Iss. 2. – P. 118-121.
- 4 Патент РФ № 2384616. Консорциум штаммов микроорганизмов для очистки окружающей среды от углеводородов. – Опубл. 23.03.2010, бюл. №8.
- 5 Hung-Soo Joo et al. Bioremediation of oil-contaminated soil using *Candida catenulata* and food waste // Environmental Pollution. – 2008. – V. 156. – Iss. 3. – P. 891-896.
- 6 Шкидченко А.Н., Аринбасаров М.У. Изучение нефтедеструктивной активности микрофлоры прибрежной зоны Каспийского моря // Прикл. биохим. и микроб. – 2002. – Т. 38, № 5. – С. 509-512.
- 7 Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхарда и др. – Т. 1. – М.: Мир. – 536 с.
- 8 Звягинцев Д. Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. – М.: МГУ, 1991. – 304 с.
- 9 Хазиев Ф. Х. Ферментативная активность почв. – М.: Наука, 1976
- 10 Isermeyer H. Eine einfache methode fur Bestimmung der Carbonate im Boden // Z. Pflanzenernahr. Bodenk. – 1952. – Bd. 65. – S. 26-38.

*A. K. Саданов, И. Э. Смирнова, Е. А. Олейникова, Р. Ш. Галимбаева,  
Т. В. Кузнецова, Л. Т. Сmailova, С. А. Айткелдиева*

**МҰНАЙМЕН ЛАСТАНҒАН ТОПЫРАҚТЫҢ БИОРЕМЕДИАЦИЯСЫ ҮШІН МИКРООРГАНИЗМДЕР  
АССОЦИАЦИЯСЫНЫң ОЛАРДЫҢ БИОЛОГИЯЛЫҚ БЕЛСЕНДІЛІГІНЕ ӘСЕРІ**

Мұнаймен ластанған топырақтың биоремедиациясы үшін қолданылатын микроорганизмдер ассоциациясы топырақтың микробиологиялық көрсеткіштеріне әсер етеді, ферментативті белсенділікті көтереді, дегидрогеназдық, каталаздық және липаздық белсенділікті жоғарылатады және топырақ тынысын белсендіреді, осының бәрі топырақ құнарлығына жақсы әсер етеді.

*A. K. Sadanov, I. E. Smirnova, E. A. Oleinikova, R. S. Galimbayeva,  
T. V. Kuznetsova, L. T. Smailova, S. A. Aitkeldieva, S. A. Aitkeldieva,*

**THE EFFECT OF ASSOCIATION MICROORGANISMS, PERSPECTIVE  
FOR BIOREMEDIACTION OF OIL-CONTAMINATED SOIL AT THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY**

The using of associations of microorganisms for bioremediation of contaminated soils significantly effect on soil microbiological parameters, activates their enzymatic activity, considerably increasing the dehydrogenase, catalase and lipase activity of the soil and improving the activity of soil respiration was founded.