

УДК 550.72:579.77.56.9

А.У. Туякбаева^{1*}, А.А. Бектурганова²¹Казахский агротехнический университет им. С.Сейфуллина, Республика Казахстан, г. Астана²Казахский университет технологии и бизнеса, Республика Казахстан, г. Астана

*E-mail: akmaral.t@inbox.ru

Применение иммобилизованных клеток на минеральные сорбенты в аридных условиях Атырауской области

В работе приведены данные по изучению нефтеокисляющей активности свободных и иммобилизованных клеток микроорганизмов-нефтедеструкторов на минеральные сорбенты в аридных условиях на месторождении Косчагыл Атырауской области.

Ключевые слова: нефть, почва, сорбент, иммобилизация клеток, углеводородокисляющие микроорганизмы.

A.U. Tuyakbayeva, A.A. Bekturganova

Application of immobilized cells on mineral sorbents in areid condition of Atyrau region

The article contains information on the use hydrocarbon-oxidizing activity of free and immobilized cells of microorganisms- oil oxidizing mineral sorbents in the arid conditions at the field «Koschagyl» Atyrau region.

Keywords: oil, soil, carrier, immobilization of cells, hydrocarbon-oxidizing microorganisms.

А.О. Туякбаева, А.А. Бектурганова

Атырау облысының аридты жағдайындағы минералды сорбенттерге иммобилизденген микроағзаларды қолдану

Бұл жұмыста Атырау облысы Қосшагыл кен орынының аридтік жағдайында минералдық сорбенттерге иммобилизденген микроорганизмдер клеткалардың мұнай ыдыратушы және еркін мұнай ашытушылық белсенділігін зерттеу бойынша деректер келтірілген.

Түйін сөздер: мұнай, топырақ, сорбент, клеткалар иммобилизациясы, көмірсутектотықтырушы микроорганизмдер.

Введение

Добываемая в Западном Казахстане нефть высокопарафинистая, с повышенным содержанием меркаптановых соединений, что негативно сказывается при разливе нефти на физико-химические показатели почв, формируя в профиле почвы мощные битумные коры [1]. Процесс деструкции нефти в почве в естественных условиях – сложный физико-химический и биохимический процесс, направленность и скорость которого зависят от климата, свойств и режимов почв, сезонной активности микрофлоры, влажности, концентрации и фракционного состава нефти в почве. Процесс биоразложения в почве протекает медленно, в течение длительного времени, более 20-25 лет [2, 3]. Поэтому управление процессами биодegradации углеводородов должно быть

направлено, прежде всего, на активацию микробных сообществ и создание оптимальных условий для их существования. Использование иммобилизованных на различных сорбентах клеток микроорганизмов-нефтедеструкторов и создание на их базе устойчивых, с гарантированной функциональной стабильностью в окружающей среде биодеструкторов нефти позволяет расширить область применения микробиологического метода в ликвидации углеводородных загрязнений и еще больше увеличить эффективность и сократить время очистки почв. Закрепленные на носитель клетки обладают повышенной жизнеспособностью, устойчивостью к действию неблагоприятных факторов окружающей среды, повышенной каталитической и нефтеокисляющей активностью, благодаря высокой концентрации клеток микроорганизмов [4, 5]. А сам носитель,

благодаря сорбционной емкости, позволяет осуществлять быструю адсорбцию токсичного субстрата, предотвращая его миграцию в нижележащие слои, улучшает аэрацию среды и благодаря иммобилизованным на нем микроорганизмам позволяет ассимилировать углевод нефтяных углеводородов путем биохимической трансформации в соединения, безопасные для человека и окружающей среды [6].

В связи с этим целью настоящей работы являлось изучение нефтеокисляющей активности свободных и иммобилизованных клеток микроорганизмов-деструкторов в аридных условиях на месторождении Каражанбас Мангистауской области.

Материалы и методы

Полевой эксперимент по испытанию иммобилизованных на минеральные носители клеток штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis* Кл1 и *Rhodococcus ruber* Кл4 был заложен на стационарном участке в г. Актау Мангистауской области. Для эксперимента использовали сильнозагрязненную почву с месторождения Каражанбас. Участок был нами распланирован на 36 опытных делянок, размеры которых составляли 1x1 м². Эксперимент закладывался в 3-х повторностях с соблюдением рендомизации.

В качестве контроля взята загрязненная нефтью почва и почва с внесением только носителей (керамзита или цеолита). При закладке полевого эксперимента соблюдалась рендомизация [7].

Из 2-х активных штаммов рода *Rhodococcus* углеводородокисляющих микроорганизмов наработана биомасса с титром клеток 3-5×10⁹ КОЕ/г. Эксперимент закладывался в 3-х повторностях, в следующих вариантах: с внесением свободных, иммобилизованных на цеолит и керамзит клеток углеводородокисляющих микроорганизмов.

Почву до и после инокуляции ее свободными и иммобилизованными на носитель клетками микроорганизмов тщательно рыхляли и увлажняли.

Для определения содержания нефти проводили отбор проб почвы вначале, в середине и по окончании полевого эксперимента.

Отбор проб почвы проводили согласно установленным методам отбора и подготовки проб почвы для микробиологического и химического анализа [8].

Содержание нефти в почве определяли весовым методом после экстракции ее хлороформом [9].

Динамику численности углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) определяли в почвенных образцах методом предельных разведений с последующим высевом на агаризованной среде Ворошилова-Диановой, в качестве единственного источника углерода и энергии была использована нефть месторождения Каражанбас [8].

Активность каталазы в почве определяли газометрическим методом по Галстяну А.Ш. [10].

Результаты и обсуждение

При определении исходного содержания нефти в почве на экспериментальном участке месторождения Косчагыл Атырауская область показало высокую степень ее загрязнения, содержание нефти в почве составило от 58,2 до 69,2 г/кг почвы, тогда как в незагрязненной фоновой почве нефть не обнаружена.

Контролем служила нефтезагрязненная почва без внесения микроорганизмов и с внесением в загрязненную нефтью почву минеральных носителей (цеолита или керамзита).

Наработанную в виде пасты биомассу активных штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis* Кл1 и *Rhodococcus ruber* Кл4 вносили в нефтезагрязненную почву в виде суспензии со свободными клетками и иммобилизованными на цеолит или керамзит. На участках проводили рыхление и увлажнение почвы.

Остаточное содержание нефти в почве полевого эксперимента на 30 и 60 сутки определяли гравиметрическим методом, помимо этого определяли изменение общей микробной численности (ОМЧ) и численности углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ), изменение активности почвенного фермента каталазы.

В почве на контрольных участках в ходе эксперимента наблюдалось снижение содержания углеводов нефти, что можно объяснить деятельностью почвенного микробного сообщества, и частичным испарением фракций нефти.

В почве на опытных участках с внесением суспензии со свободными клетками микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis* Кл1 и *Rhodococcus ruber* Кл4 деструкция нефти за 30 суток составила 48,2 и 43,4%, а после 60 суток 62,7% и 58,6% соответственно.

При инокуляции почвы иммобилизованными на цеолит клетками штаммов микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis* Кл1 и *Rhodococcus ruber* Кл4 на 30 суток наблюдалась деструкция нефти 60 и 57,7%, а на 60 суток 75,8 и 71,8% соответственно.

Высокий процент деструкции нефти наблюдался в вариантах при внесении в почву иммобилизованных на керамзит клеток углеводородокисляющих микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis* Кл1 и *Rhodococcus ruber* Кл4. Так за 30 суток деструкция нефти этими штаммами микроорганизмов составила 64,9 и 61,1%, а после 60 суток 80,2 и 76,8% соответственно.

По результатам полевого эксперимента через 60 суток наибольшей нефтеокисляющей активностью обладали иммобилизованные на керамзит клетки штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis* Кл1 и *Rhodococcus ruber* Кл4, снижение концентрации углеводородов в почве по сравнению с исходным показателем отмечено в 5,4 и 4,3 раза соответственно. В варианте при внесении иммобилизованных на цеолит клеток этих штаммов микроорганизмов наблюдалось уменьшение содержания нефти по сравнению с исходным показателем в 4,1 и 3,5 раза, тогда применение их в свободном состоянии снижало содержание нефти в 2,6 и 2,4 раза соответственно.

Также проведен отбор проб почвы со всех участков полевого эксперимента для анализа изменения ОМЧ и УОМ. Вначале эксперимента ОМЧ почвы экспериментального участка была низкая – $1,3 \times 10^3$ КОЕ/г почвы и численность УОМ – $1,2 \times 10^2$ КОЕ/г почвы.

Через 30 и 60 суток проведен анализ проб почвы полевого эксперимента на ОМЧ и численность УОМ. В почве контрольного участка (без внесения в почву микроорганизмов) ОМЧ и численность УОМ не изменяется. При внесении в почву только минеральных сорбентов через 30 и 60 суток эксперимента наблюдали увеличение численности ОМЧ и УОМ на 1 порядок по сравнению с исходным показателем.

В вариантах с внесением суспензии свободных клеток углеводородокисляющих микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis* Кл1 и *Rhodococcus ruber* Кл4 через 30 суток

наблюдалось увеличение ОМЧ и УОМ на 1 порядок, через 60 суток ОМЧ увеличивалась на 3 порядка, УОМ – на 2 порядка по сравнению с исходными показателями.

В вариантах с внесением иммобилизованных на цеолит и керамзит клеток изучаемых микроорганизмов через 30 суток наблюдалось увеличение как ОМЧ, так численности УОМ на 1 порядок по сравнению с исходными показателями, после 60 суток отмечали значительное увеличение как ОМЧ, так численности УОМ на 3 порядка.

В контрольном варианте без внесения микроорганизмов отмечено увеличение численности УОМ в 1,2 раза, а на опытных участках с внесением иммобилизованных на минеральные сорбенты клеток микроорганизмов численность УОМ увеличилась в 3 раза (таблица 1).

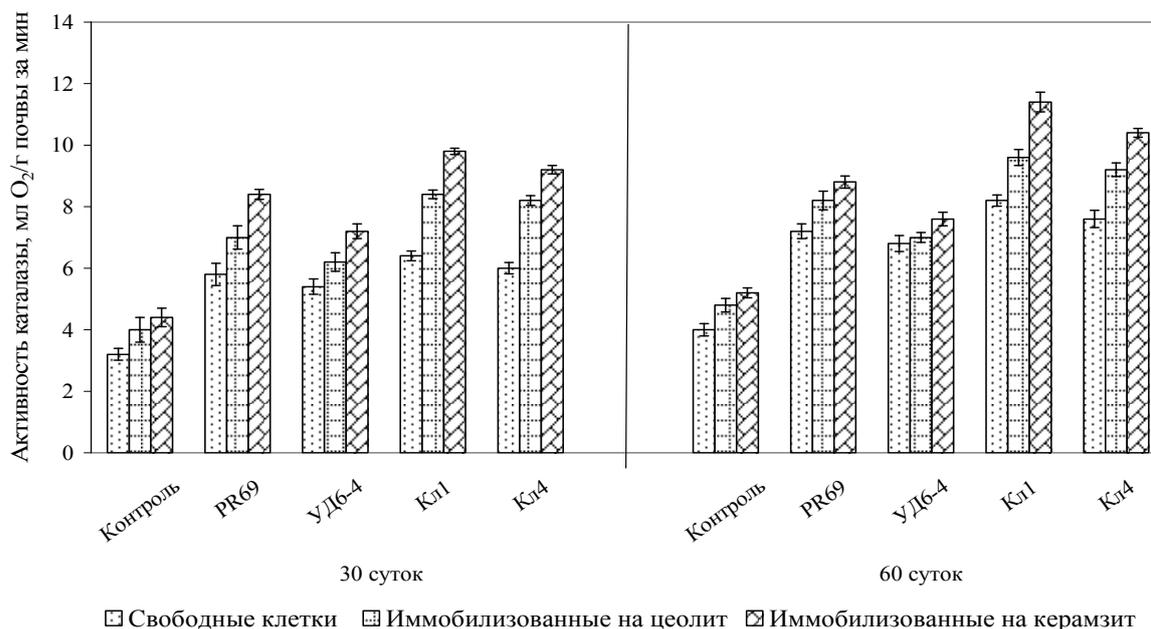
Определение ОМЧ и УОМ на экспериментальных участках в процессе очистки почвы с применением свободных и иммобилизованных клеток штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis* Кл1 и *Rhodococcus ruber* Кл4 через 60 суток эксперимента показало возрастание ОМЧ на 3 порядка, а численности УОМ при внесении свободных клеток на 2 и иммобилизованных на минеральные носители УОМ на 3 порядка.

Подтверждением ускорения процесса деградации нефти и в качестве тест-системы снижения содержания нефти в почве может служить показатель активности почвенного фермента каталазы. Уровень активности окислительно-восстановительных ферментов, в том числе и каталазы – один из критериев самоочищающейся способности почвы от нефтяных углеводородов [3, 4]. Каталаза, осуществляющая катализ реакции разложения перекиси водорода на воду и молекулярный кислород, приносит доступный активный кислород микроорганизмам, участвующим в процессах разложения нефти [11, 12].

Исходная активность каталазы в нефтезагрязненной почве полевого эксперимента составила 2,0 мл O_2 /г почвы за мин. После 30 и 60 суток эксперимента в варианте без внесения клеток микроорганизмов активность каталазы по сравнению с исходным показателем увеличилась в 1,2 и 1,6 раз соответственно.

Таблица 1 – Микробиологический анализ почвы полевого эксперимента месторождения Косчагыл, КОЕ/г почвы

Варианты опыта	30 суток		60 суток	
	ОМЧ	УОМ	ОМЧ	УОМ
Свободные клетки				
Фон	$(1,03 \pm 0,14) \times 10^4$	$(3,67 \pm 0,14) \times 10^3$	$(1,42 \pm 0,23) \times 10^4$	$(1,25 \pm 0,42) \times 10^3$
Контроль (загр.почва)	$(1,84 \pm 0,42) \times 10^5$	$(1,32 \pm 0,24) \times 10^4$	$(2,04 \pm 0,16) \times 10^5$	$(3,37 \pm 0,73) \times 10^4$
<i>Micrococcus varians</i> PR69	$(3,32 \pm 0,28) \times 10^5$	$(2,57 \pm 0,32) \times 10^4$	$(4,52 \pm 0,41) \times 10^5$	$(1,84 \pm 0,62) \times 10^5$
<i>Micrococcus roseus</i> УД6-4	$(2,93 \pm 0,45) \times 10^5$	$(1,74 \pm 0,25) \times 10^4$	$(2,28 \pm 0,27) \times 10^5$	$(1,78 \pm 0,16) \times 10^5$
<i>Rhodococcus erythropolis</i> Кл1	$(4,76 \pm 0,17) \times 10^5$	$(3,16 \pm 0,52) \times 10^4$	$(5,52 \pm 0,26) \times 10^5$	$(2,04 \pm 0,18) \times 10^5$
<i>Rhodococcus ruber</i> Кл4	$(3,14 \pm 0,41) \times 10^5$	$(2,73 \pm 0,71) \times 10^4$	$(4,84 \pm 1,03) \times 10^5$	$(1,92 \pm 0,22) \times 10^5$
Иммобилизованные на керамзит				
Загр. почва + керамзит	$(3,36 \pm 0,14) \times 10^4$	$(3,26 \pm 0,24) \times 10^3$	$(5,06 \pm 0,38) \times 10^4$	$(4,43 \pm 0,13) \times 10^3$
<i>Micrococcus varians</i> PR69	$(5,18 \pm 1,21) \times 10^5$	$(4,75 \pm 0,26) \times 10^4$	$(2,47 \pm 0,74) \times 10^6$	$(3,28 \pm 0,29) \times 10^5$
<i>Micrococcus roseus</i> УД6-4	$(4,67 \pm 0,37) \times 10^5$	$(3,37 \pm 0,57) \times 10^4$	$(1,86 \pm 0,40) \times 10^6$	$(2,05 \pm 0,37) \times 10^5$
<i>Rhodococcus erythropolis</i> Кл1	$(5,77 \pm 0,45) \times 10^5$	$(7,53 \pm 0,48) \times 10^4$	$(3,82 \pm 0,38) \times 10^6$	$(4,73 \pm 0,52) \times 10^5$
<i>Rhodococcus ruber</i> Кл4	$(4,93 \pm 0,13) \times 10^5$	$(5,32 \pm 0,61) \times 10^4$	$(2,75 \pm 0,40) \times 10^6$	$(4,08 \pm 0,61) \times 10^5$
Иммобилизованные на цеолит				
Загр. почва + цеолит	$(2,16 \pm 0,36) \times 10^4$	$(2,12 \pm 0,13) \times 10^3$	$(3,19 \pm 0,21) \times 10^4$	$(2,13 \pm 0,18) \times 10^3$
<i>Micrococcus varians</i> PR69	$(2,72 \pm 0,47) \times 10^5$	$(4,65 \pm 0,26) \times 10^4$	$(5,73 \pm 0,22) \times 10^5$	$(2,07 \pm 0,23) \times 10^5$
<i>Micrococcus roseus</i> УД6-4	$(2,31 \pm 0,52) \times 10^5$	$(2,94 \pm 0,14) \times 10^4$	$(4,85 \pm 1,17) \times 10^5$	$(1,84 \pm 0,21) \times 10^5$
<i>Rhodococcus erythropolis</i> Кл1	$(4,58 \pm 0,63) \times 10^5$	$(6,82 \pm 1,34) \times 10^4$	$(2,57 \pm 0,49) \times 10^6$	$(3,76 \pm 0,57) \times 10^5$
<i>Rhodococcus ruber</i> Кл4	$(3,04 \pm 0,19) \times 10^5$	$(4,74 \pm 0,13) \times 10^4$	$(2,06 \pm 0,65) \times 10^6$	$(2,14 \pm 0,77) \times 10^5$

**Рисунок 1** – Динамика изменения активности каталазы почвы на экспериментальном участке месторождения Косчагыл

При внесении в почву полевого эксперимента цеолита или керамзита через 30 суток активность каталазы по сравнению с исходным увеличилась в 1,6 и 1,9 раз и составила 3,2 и 3,8 мл O_2 /г почвы за мин, а через 60 суток она увеличилась в 2,1 и 2,4 раз и составила 4,2 и 4,8

мл O_2 /г почвы за мин. При инокуляции почвы суспензией со свободными клетками углеводородокисляющих микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis* Кл1 и *Rhodococcus ruber* Кл4 активность каталазы по сравнению с исходным показателем через 30 суток увеличивалась в 3

раза и составила 6 мл O_2 /г почвы за мин в обоих вариантах, через 60 суток ее активность увеличилась в 3,6 и 3,4 раза и составила 7,2 и 6,8 мл O_2 /г почвы за мин соответственно (рисунок 2).

Каталазная активность почвы в полевом эксперименте через 30 суток в вариантах при внесении иммобилизованных на цеолит клеток углеводородоокисляющих микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis* Кл1 и *Rhodococcus ruber* Кл4 по сравнению с исходным показателем увеличилась в 3,8 и 3,6 раз и составила 7,6 и 7,2 мл O_2 /г почвы за мин, а через 60 суток в 4,4 и 4,1 раз и составила 8,8 и 8,2 мл O_2 /г почвы за мин соответственно.

В вариантах при внесении иммобилизованных на керамзит клеток штаммов микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis* Кл1 и *Rhodococcus ruber* Кл4 активность каталазы по сравнению с исходным показателем на 30 суток эксперимента возросла в 4,2 и 3,9 раз и

составила 8,4 и 7,8 мл O_2 /г почвы за мин, а после 60 суток в 5,8 и 5,2 раз и составила 11,6 и 10,4 мл O_2 /г почвы за мин соответственно.

Таким образом, проведенные исследования в полевых условиях на месторождений Косчагыл Атырауской области показали, что применение иммобилизованных на минеральные носители штаммов углеводородоокисляющих микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis* Кл1 и *Rhodococcus ruber* Кл4 ускоряет деструкцию нефти в почве причем, более эффективно применение их в иммобилизованном на керамзит виде, деструкция нефти через 60 суток достигала 80,2 и 76,8% соответственно, что в 1,3 раза больше по сравнению со свободными клетками. Также по сравнению с исходным показателем отмечено увеличение численности ОМЧ на 3 порядка и УОМ на 2 порядка, активность каталазы увеличилась в 5,8 и 5,2 раза соответственно.

Литература

- 1 Мурзагалиев Р.С. Особенности геологического строения и разработки нефтяного месторождения Каражанбас // Геология нефти и газа. – 2003. – № 2. – С. 26–29.
- 2 Киреева А.Н., Водопьянов В.В., Мифтахова А.М. Биологическая активность нефтезагрязненных почв. – М.: Гилем. – 2001. – 377 с.
- 3 Киреева Н.А., Новоселова Н.И., Онегова Т.С. Активность каталазы и дегидрогеназы в почвах, загрязненных нефтью и нефтепродуктами // Агрохимия. – 2002. – № 8. – С. 64–72.
- 4 Кабиров Т.Р. Использование многоуровневой системы индикации биологической активности почв для оценки эффективности методов биорекультивации нефтезагрязненных территорий: автореф. ... канд. биол. наук: 03.00.23. – Уфа, 2009. – 24 с.
- 5 Hamamura N., Olson S.H., Ward D.M., Inskip W.P. Microbial population dynamic associated with crude-oil biodegradation in diverse soils // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – № 9. – P. 6316–6324.
- 6 Новоселова Е.И. Использование ферментативной активности для мониторинга биоремедиации нефтезагрязненных почв // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2007. – № 75. – С. 246–247.
- 7 Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Колос, 1979. – 415 с.
- 8 Методы почвенной микробиологии и биохимии // под ред. Звягинцева Д.Г. – М.: МГУ. – 1991. – 304 с.
- 9 Богомолов А.И. Современные методы исследования нефтей. – Л.: Недра, 1984. – 431 с.
- 10 Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. – М.: Наука. – 1991. – 304 с.
- 11 Сулейманов Р.Р., Абдрахманов Т.А., Жаббаров З.А., Турсунов Л.Т. Ферментативная активность и агрохимические свойства лугово-аллювиальной почвы в условиях нефтяного загрязнения // Известия РАН. – 2008. – № 2. – С. 294–298.
- 12 Коронелли Т.В., Комарова Т.И., Ильинский В.В. Интродукция бактерий рода *Rhodococcus* в тундровую почву, загрязненную нефтью // Прикладная биохимия и микробиология. – 1997. – № 2. – С. 198–201.

References

- 1 Murzagaliev R.S. Osobennosti geologicheskogo stroeniya i razrabotki nefljanogo mestorozhdeniya Karazhanbas // Geologija nefiti i gaza. – 2003. – № 2. – S. 26–29.
- 2 Kireeva A.N., Vodop'janov V.V., Miftahova A.M. Biologicheskaja aktivnost' neftezagrijaznennyh pochv. – M.: Gilem. – 2001. – 377 s.
- 3 Kireeva N.A., Novoselova N.I., Onegova T.S. Aktivnost' katalazy i degidrogenazy v pochvah, zagrijaznennyh nef'tju i nefteproduktami // Agrohimiya. – 2002. – № 8. – S. 64–72.
- 4 Kabirov T.R. Ispol'zovanie mnogourovnevoj sistemy indikacii biologicheskoy aktivnosti pochv dlja ocenki jeffektivnosti metodov biorekul'tivacii neftezagrijaznennyh territorij: avtoref. ... kand. biol. nauk: 03.00.23. – Ufa. – 2009. – 24 s.
- 5 Hamamura N., Olson S.H., Ward D.M., Inskip W.P. Microbial population dynamic associated with crude-oil

biodegradation in diverse soils // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – № 9. – P. 6316–6324.

6 Novoselova E.I. Ispol'zovanie fermentativnoj aktivnosti dlja monitoringa bioremediacii neftezagrijaznennyh pochv // *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta*. – 2007. – № 75. – S. 246–247.

7 Dosehov B.A. Metodika polevogo opyta. – M.: Kolos, 1979. – 415 s.

8 Metody pochvennoj mikrobiologii i biohimii // Pod red. Zvjaginceva D.G. – M.: MGU. – 1991. – 304 s.

9 Bogomolov A.I. Sovremennye metody issledovanija neftej. – L.: Nedra, 1984. – 431 s.

10 Zvjagincev D.G. Metody pochvennoj mikrobiologii i biohimii. – M.: Nauka. – 1991. – 304 s.

11 Sulejmanov R.R., Abdrahmanov T.A., Zhabbarov Z.A., Tursunov L.T. Fermentativnaja aktivnost' i agrohimicheskie svojstva lugovo-alljuvial'noj pochvy v uslovijah nefljanogo zagrijaznenija // *Izvestija RAN*. – 2008. – № 2. – S. 294–298.

12 Koronelli T.V., Komarova T.I., Il'inskij V.V. Introdukcija bakterij roda *Rhodococcus* v tundrovuju pochvu, zagrijaznennuju neft'ju // *Prikladnaja biohimija i mikrobiologija*. – 1997. – № 2. – S. 198–201.