

УДК 550.72:579.77.56.9

<sup>1</sup>А.У. Туякбаева\*, <sup>2</sup>А.А. Бектурганова

<sup>1</sup>Казахский агротехнический университет им. С.Сейфуллина, Казахстан, г. Астана

<sup>2</sup>Казахский университет технологии и бизнеса, 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.

А.О. Тұяқбаева, А.А. Бектұрғанова

### Атырау облысының аридты жағдайындағы минералды сорбенттерге иммобилизденген микроағзаларды қолдану

Бұл жұмыста Атырау облысы Қосшағыл 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, иммобилизденген клеткалар, көмірсутектотықтырғыш микроорганизмдер.

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.

**Key words:** oil, soil, sorbent, immobilization of cells, hydrocarbon-oxidizing microorganisms.

### 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 биодеградации углево-

дородов 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 углерод 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 м<sup>2</sup>. Эксперимент закладывался в 3-х повторностях с соблюдением рендоминизации.

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

Из 2-х активных штаммов рода *Rhodococcus* углеводородокисляющих микроорганизмов наработана биомасса с титром клеток 3-5×10<sup>9</sup> 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 сутки наблюдалась деструкция нефти 60 и 57,7%, а на 60 сутки 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 углеводов 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, че-

рез 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.

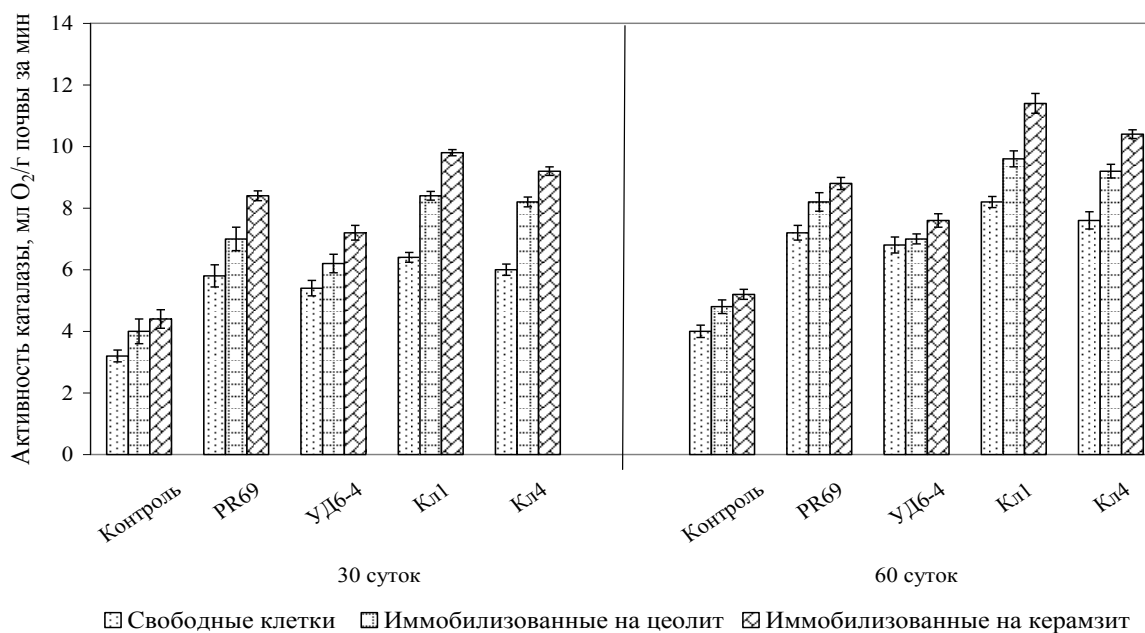
Подтверждением ускорения процесса деградации нефти и в качестве тест-системы снижения содержания нефти в почве может служить показатель активности почвенного фермента каталазы. Уровень активности окислительно-восстановительных ферментов, в том числе и каталазы – один из критериев самоочищающейся способности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

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

**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

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 сутки 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 углеводородокисляющих 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 микрооргани-

мов *Rhodococcus erythropolis* Кл1 и *Rhodococcus ruber* Кл4 активность каталазы по сравнению с исходным показателем на 30 сутки 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 углеводородокисляющих 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., Inskeep 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 Богомоллов 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.

### Reference

- 1 Murzagaliev R.S. Osobennosti geologicheskogo stroeniya i razrabotki nefryanogo mestorozhdeniya Karazhanbas // *Geologiya nefiti i gaza*. – 2003. – # 2. – S. 26–29.
- 2 Kireeva A.N., Vodopyanov V.V., Miftahova A.M. Biologicheskaya aktivnost neftezagryaznennykh pochv. – М.: Gilem. – 2001. – 377 s.
- 3 Kireeva N.A., Novoselova N.I., Onegova T.S. Aktivnost katalazy i degidrogenazy v pochvakh, zagryaznennykh neftyu i nefteproduktami // *Agrokhimiya*. – 2002. – # 8. – S. 64–72.
- 4 Kabirov T.R. Ispolzovanie mnogourovnevnoy sistemy indikatsii biologicheskoy aktivnosti pochv dlya otsenki effektivnosti metodov biorekultivatsii neftezagryaznennykh territoriy: avtoref. ... kand. biol. nauk: 03.00.23. – Ufa. – 2009. – 24 s.
- 5 Hamamura N., Olson S.H., Ward D.M., Inskeep 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. Ispolzovanie fermentativnoy aktivnosti dlya monitoringa bioremediatsii neftezagryaznennykh pochv // *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta*. – 2007. – # 75. – S. 246–247.
- 7 Dospheov B.A. Metodika polevogo opyita. – М.: Kolos, 1979. – 415 s.
- 8 Metody pochvennoy mikrobiologii i biohimii // Pod red. Zvyagintseva D.G. – М.: MGU. – 1991. – 304 s.
- 9 Bogomolov A.I. Sovremennyye metody issledovaniya neftey. – L.: Nedra, 1984. – 431 s.
- 10 Zvyagintsev D.G. Metody pochvennoy mikrobiologii i biohimii. – М.: Nauka. – 1991. – 304 s.
- 11 Suleymanov R.R., Abdrahmanov T.A., Zhabbarov Z.A., Tursunov L.T. Fermentativnaya aktivnost i agrohimicheskie svoystva lugovo-allyuvialnoy pochvy v usloviyakh nefyanogo zagryazneniya // *Izvestiya RAN*. – 2008. – # 2. – S. 294–298.
- 12 Koronelli T.V., Komarova T.I., Ilinskiy V.V. Introduktsiya bakteriy roda *Rhodococcus* v tundrovuyu pochvu, zagryaznennuyu neftyu // *Prikladnaya biohimiya i mikrobiologiya*. – 1997. – # 2. – S. 198–201.