

Калбаева А.М., Цуркан Я.С.,
Карпенюк Т.А., Гончарова А.В.

**Микробиологическая оценка
вод Каспия в районе
месторождений
углеводородного сырья
полуострова Бузачи**

Kalbayeva A.M., Tsurkan Y.S.,
Karpenyuk T.A., Goncharova A.V.

**Microbiological evaluation of the
Caspian Sea waters in the area
of hydrocarbon raw materials on
the peninsula Buzachi**

Калбаева Ә.М., Цуркан Я.С.,
Карпенюк Т.А., Гончарова А.В.

**Каспий теңізінің Бозащы
түбегіндегі көмірсутек
шикізаттарын өндіретін кен
орындарының жағалауына
микробиологиялық баға беру**

Для оценки биотехнологического потенциала аборигенных микроорганизмов, адаптированных к воде и почвам Казахстанской территории шельфа Каспийского моря, проведены микробиологические исследования морской воды, отобранной в районах полуострова Бузачи, прилегающих к месторождениям нефти «Каламкас» и «Каражанбас». Численность бактерий в пробах воды определена по росту микроорганизмов на среде МПА, численность микромицетов и дрожжей – на среде Сабуро, численность актиномицетов и бактерий – на среде Чапека. Учет и выделение нефтеокисляющих микроорганизмов проведен с использованием нефти локальных месторождений. Установлено, что нефтеокисляющие микроорганизмы широко распространены в исследуемом районе. Доминирующими являются нефтеокисляющие бактерии. Численность микромицетов, актиномицетов и дрожжей в морской воде данного района на несколько порядков ниже.

Ключевые слова: Каспий, нефть, нефтеокисляющие микроорганизмы.

To assess the biotechnological potential of native microorganisms adapted to water and soils of Kazakhstan area of the Caspian Sea, microbiological tests of sea water in selected areas of the peninsula Buzachi, adjacent to oil fields «Kalamkas» and «Karajanbas» were conducted. The number of bacteria in water samples determined by the growth of microorganisms in the MPA medium, of microscopic fungi and yeasts – on Saburo medium, the number of actinomycetes and bacteria – on Chapek medium. Registration and allocation of oil-oxidizing microorganisms conducted using local oil fields. It was found that the oil-oxidizing bacteria are widely distributed in the study area. Dominating are oil-oxidizing bacteria. Number of micromycetes, actinomycetes and yeast in sea water area are lower on several orders of magnitude.

Key words: Caspian, oil, oil-oxidizing microorganisms.

Қазақстан аумағындағы Каспий теңізі шельфіне бейімделген аборигенді микроорганизмдердің биотехнологиялық потенциалын бағалау үшін Бозащы түбегіндегі «Қаламкас» және «Қаражанбас» кен орындары жағалауынан бөлініп алынған микроорганизмдердің микробиологиялық зерттеулері жүргізілді. Су үлгілеріндегі бактериялар саны, олардың МПА қоректік ортасында өсуі бойынша, микромицеттер мен ашытқылар саны Сабуро қоректік ортасында өсуі бойынша, актиномицеттер мен бактериялардың саны Чапек қоректік ортасында өсуі бойынша анықталды. Көмірсутек тотықтырушы микроорганизмдердің саны мен бөлініп алынуы жергілікті кен орындарының мұнайын қолдану арқылы жасалды. Зерттелуші аймақта көмірсутек тотықтырушы микроорганизмдердің кеңінен таралғаны анықталды. Мұнай тотықтырушы микроорганизмдер басым болды. Теңіз суында микромицеттердің, актиномицеттердің және ашытқылардың саны бірнеше дәрежеге төмен болды.

Түйін сөздер: Каспий, мұнай, мұнай тотықтырушы микроорганизмдер.

**МИКРОБИОЛОГИ-
ЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВОД
КАСПИЯ В РАЙОНЕ
МЕСТОРОЖДЕНИЙ
УГЛЕВОДОРОДНОГО
СЫРЬЯ ПОЛУОСТРОВА
БУЗАЧИ**

Введение

Нефть и нефтепродукты относятся к наиболее распространенным загрязнителям биосферы. Нарастание темпов нефтедобычи, выдвигание правительством Республики Казахстан задачи – войти в число ведущих экспортеров углеводородов делают приоритетным исследование по разработке эффективных способов очистки окружающей среды в местах ее добычи [1, 2].

Проблема очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений приобретает все большую остроту еще и в связи с ограниченностью возможностей (а иногда и экологического вреда) применения для этих целей механических и физико – химических способов очистки, поэтому внимание экологов привлекает биологический метод очистки от нефтяных загрязнений. Метод основан на применении микроорганизмов, способных использовать углеводороды нефти в качестве источников углерода. Это дает возможность удалить нефть до фоновых значений концентрации при относительно низких эксплуатационных затратах. При этом предполагается не только активизация аборигенной микрофлоры загрязненных объектов, но и внесение биопрепаратов, содержащих штаммы активных нефтедеструкторов. Практически все углеводороды, входящие в состав нефти, могут разлагаться в результате жизнедеятельности микроорганизмов. В связи с этим особую значимость представляет изучение микроорганизмов, участвующих в процессе самоочищения от нефтяных углеводородов в районах разведки, бурения и эксплуатации нефтяных скважин в шельфовой зоне морских вод, так как для данных экосистем наиболее остро стоит проблема сохранения их целостности в условиях возрастающей антропогенной нагрузки [3-5].

Материалы и методы

Микробиологические исследования морской воды, отобранной в районах полуострова Бузачи, прилегающих к месторождениям нефти «Каламкас» и «Каражанбас», проводились весной 2015 г. Отбор проб производился с поверхностного горизонта в соответствии с ГОСТами и общепринятыми методи-

ками [6-8]. 3-5 поверхностных точечных проб массой 0,2 л отбирали в прибрежной части Каспийского моря (глубина 0-20 см от поверхности). Путем перемешивания из них составлялась средняя проба массой 0,5 л. Пробы воды отбирали на одной площадке через одинаковые расстояния. Расстояние между площадками отбора – 200-300 м. Пробы снабжали этикетками с информацией о месте, дате, метеоусловиях сбора. До проведения анализов пробы хранили на льду.

Температура воды в весенний период (апрель-май) в исследуемом районе колебалась от 12 до 18°C в поверхностном горизонте. Соленость воды была в интервале от 1,6 до 12,9 промилле. Было исследовано 6 проб воды, порядковые номера которых приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Места отбора проб

Место отбора	Вода					
	Каражанбас	1	2			
Каламкас			3	4	5	6

Для выделения разных таксономических групп микроорганизмов пробы воды высевали методом Коха на различные плотные питательные среды: мясо-пептонный агар (МПА), Сабу-ро, Чапека, минеральную среду Ворошиловой – Диановой (ВД) с нефтью [8, 9]. Для выделения углеводородокисляющих микроорганизмов использовали метод накопительной культуры [8]. Для этого в 98 мл минеральной среды ВД, вносили 1 мл пробы и 1 мл простерилизованной нефти полуострова Бузачи с плотностью 890,4 кг/м³, с малым содержанием бензиновых фракций, высокой вязкостью в пластовых условиях (18,1–19,1 МПа*с) и относительно невысоким содержанием растворенного парафина (до 3%). Количественный учёт углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) в накопительной культуре (титр клеток) производили по методу Коха – высевом на плотную минеральную среду с нефтью. Определение количества микроорганизмов этим методом включало три этапа: приготовление разведений, посев на плотную среду в чашки Петри, подсчёт выросших колоний [8].

Для учета численности углеводородокисляющих дрожжей и грибов в среду добавляли стрептомицин и тетрациклин по 50 мкг/мл каждого [10-12].

Колонии микроорганизмов в зависимости от скорости роста подсчитывали через 2-10 суток инкубации. Подсчет, как правило, проводили, не открывая чашек Петри. Для удобства каждую просчитанную колонию отмечали точкой на наружной стороне дна чашки. При большом количестве колоний дно чашки Петри делили на секторы, просчитывали колонии в каждом секторе и суммировали результаты. Лучшим разведением считали то, из которого при высеве в чашке Петри вырастает от 30 – 50 до 100 – 150 колоний. Если число выросших колоний меньше 10, то эти результаты для расчета количества клеток в исходном материале не использовали. Результаты параллельных высевов из одного и того же разведения суммировали и определяли среднее число колоний, выросших при высеве из разведения на одной чашке.

Количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата вычисляли по формуле:

$$M = a \cdot 10^n / V,$$

где, M – количество клеток в 1 мл; a – среднее число колоний, выросших после посева из данного разведения; V – объем суспензии, взятый для посева, мл; 10ⁿ – коэффициент разведения.

Результаты и обсуждение

Для проведения микробиологического анализа, изучения группового состава микроорганизмов, выделения нефтеокисляющих микроорганизмов был осуществлен сбор проб воды Каспийского моря, в районе месторождений нефти «Каламкас» и «Каражанбас».

Месторождения Каламкас и Каражанбас в географическом отношении находятся в пределах северо-восточной прибрежной части Каспийского моря на северо-западе полуострова Бузачи в Мангистауской области Казахстана. Климат района месторождений характеризуется резкими колебаниями температуры воздуха – от плюс 45° С летом, до минус 30° С зимой, среднегодовая температура – плюс 10,4°С. Атмосферные осадки незначительные и, в основном, приходятся на осенне-зимний период. Рельеф района представляет собой равнину с отметками от 17 м до 28 м ниже уровня моря. В срединной части полуострова широко развиты барханные пески, отдельные массивы которых по площади превышают 1000 км², а также останцы коренных пород разной величины. Почва, полностью лишенная плодородного слоя, непригодна для

сельскохозяйственных нужд. Гидрографическая сеть отсутствует за исключением соров – соляных озерков, временами заполняемых атмосферными осадками.

Месторождение «Каламкас» – газонефтяное месторождение. Относится к Северо-Бузашинской нефтегазоносной области. Открыто в 1976. Освоение началось в 1979 году. Залежи на глубине 0,5-1,1 км. Начальные дебиты нефти 26,4-62,1 м³/сут. Плотность нефти 902-914 кг/м³, содержание серы 0,1-0,3%. Характерной особенностью нефтей является наличие в них ванадия и никеля. Геологические запасы нефти – 500 млн тонн. В настоящее время разработку месторождения ведёт компания ОАО «Мангистаумунайгаз». Месторождение «Каражанбас» – нефтяное месторождение. Относится к Северо-Бузашинской нефтегазоносной области. Открыто в 1974. Залежи на глубине 228-466 м. Дебиты нефти 1,2-76,8 м³/сут. Плотность нефти 939-944 кг/м³, содержание серы 1,6-2,2. Характерной особенностью нефтей является наличие в них ванадия и никеля. Начальные запасы нефти оцениваются в 70 млн. тонн. В настоящее время месторождение разрабатывается АО «Каражанбасмунай» [13].

По росту микроорганизмов на среде МПА нами была определена численность бактерий в пробах воды. Учет выросших колоний проведен на 3-5 сутки. Численность микроорганизмов оп-

ределена по показателю колоний образующих единиц (КОЕ).

На среде Сабуро учитывали численность микромицетов и дрожжей на 2-5 сутки, на среде Чапека определена численность актиномицетов и бактерий на 3-5 сутки.

На минеральной среде ВД с нефтью определяли численность углеводородокисляющих микроорганизмов на 7-10 сутки.

Численность бактерий в отобранных пробах воды варьировала в пределах одного порядка (таблица 2). Помимо бактерий во всех пробах были представлены грибы и дрожжи. На МПА численность микроорганизмов составила от $0,8 \pm 1,1 \times 10^4$ до $8,1 \pm 3,7 \times 10^4$ КОЕ /мл воды. Численность разных групп микроорганизмов при росте на среде Чапека была сопоставима с численностью микроорганизмов, выросших на среде МПА. Так, количество микроорганизмов на этой среде варьировало от $1,2 \pm 1,4 \times 10^2$ до $1,5 \pm 0,8 \times 10^5$ КОЕ /мл воды. На среде Сабуро численность микроорганизмов была на два порядка ниже и варьировала в пределах $0,8 \pm 0,5 \times 10^2$ до $8,8 \pm 0,6 \times 10^2$. Численность микроорганизмов на минеральной среде ВД с добавлением в качестве источника углерода нефти локальных месторождений варьировала в пределах от $2,1 \pm 0,2 \times 10^2$ до $8,9 \pm 0,5 \times 10^3$ КОЕ /мл воды.

Нефтеокисляющие микроорганизмы присутствовали во всех пробах воды (таблица 2, 3).

Таблица 2 – Численность микроорганизмов в пробах Каспийской воды

Проба	Группы микроорганизмов, кл/мл воды			
	среда МПА	среда Чапека	Среда Сабуро	среда ВД
1	$0,86 \times 10^4 \pm 1,1$	$1,2 \times 10^4 \pm 1,4$	$6,3 \times 10^2 \pm 1,5$	$1,3 \times 10^3 \pm 0,9$
2	$4,1 \times 10^4 \pm 5,8$	$9,4 \times 10^4 \pm 0,7$	$8,8 \times 10^2 \pm 0,6$	$2,1 \times 10^2 \pm 0,2$
3	$2,9 \times 10^4 \pm 1,9$	$1,5 \times 10^5 \pm 0,8$	$6,3 \times 10^2 \pm 1,1$	$3,6 \times 10^2 \pm 0,7$
4	$8,1 \times 10^4 \pm 3,7$	$3,7 \times 10^4 \pm 1,6$	$0,8 \times 10^2 \pm 0,5$	$8,9 \times 10^3 \pm 1,7$
5	$1,1 \times 10^4 \pm 1,7$	$5,7 \times 10^4 \pm 1,8$	$7,0 \times 10^2 \pm 1,2$	$6,3 \times 10^3 \pm 0,9$
6	$1,1 \times 10^4 \pm 3,1$	$6,4 \times 10^4 \pm 3,4$	$3,6 \times 10^2 \pm 0,9$	$2,5 \times 10^2 \pm 0,7$

На среде МПА численность нефтеокисляющих микроорганизмов варьировала в зависимости от пробы в интервале от $3,2 \pm 0,8 \times 10^6$ (проба №5) до $2,2 \pm 0,4 \times 10^9$ (проба №1) кл/мл. Добавление в среду культивирования антибиотиков подавляло рост микроорганизмов на

99% в четырех из шести проб, что свидетельствует о преобладании среди выросших микроорганизмов нефтеокисляющих бактерий. Только в пробах воды №5 и №4 рост колоний подавлялся антибиотиками на 66 и 93% соответственно.

Таблица 3 – Титр клеток водных нефтеокисляющих микроорганизмов в накопительной культуре

Проба	ОМЧ, кл/мл		
	среда МПА без антибиотиков с антибиотиками	среда Чапека без антибиотиков с антибиотиками	среда Сабуро без антибиотиков с антибиотиками
1	$1,3 \pm 0,2 * 10^9$ $5,5 \pm 0,7 * 10^4$	$1,5 \pm 0,3 * 10^8$ $3,4 \pm 0,9 * 10^4$	$8,7 \pm 2,4 * 10^6$ $5,0 \pm 1,7 * 10^4$
2	$3,1 \pm 0,2 * 10^8$ $4,0 \pm 2,4 * 10^4$	$1,0 \pm 0,3 * 10^8$ $4,3 \pm 0,9 * 10^4$	$1,4 \pm 0,6 * 10^7$ $2,3 \pm 0,9 * 10^4$
3	$5,2 \pm 3,35 * 10^7$ $3,7 \pm 0,6 * 10^5$	$1,1 \pm 0,1 * 10^8$ $1,5 \pm 0,8 * 10^5$	$1,0 \pm 0,4 * 10^7$ $3,2 \pm 1,4 * 10^5$
4	$4,9 \pm 1,5 * 10^6$ $3,3 \pm 0,4 * 10^5$	$3,9 \pm 1,8 * 10^7$ $2,1 \pm 0 * 10^5$	$5,5 \pm 2,4 * 10^6$ $3,9 \pm 0,3 * 10^3$
5	$3,2 \pm 0,8 * 10^6$ $1,1 \pm 0,7 * 10^6$	$2,8 \pm 1,9 * 10^8$ $3,6 \pm 1,3 * 10^6$	$8,0 \pm 3,0 * 10^7$ $1,9 \pm 0,2 * 10^5$
6	$2,2 \pm 0,4 * 10^9$ $4,0 \pm 1,2 * 10^5$	$3,1 \pm 0 * 10^7$ $6,5 \pm 0 * 10^4$	$2,7 \pm 0,7 * 10^7$ $2,2 \pm 0,7 * 10^5$

На среде Чапека, предназначенной для выделения преимущественно бактерий и актиномицетов, количество КОЕ варьировало в пределах $1,1 \pm 0,1 * 10^7 - 2,8 \pm 1,9 * 10^8$ кл/мл. Добавление в среду культивирования антибиотиков вызывало уменьшение числа КОЕ до значений $3,4 \pm 0,9 * 10^4 - 3,6 \pm 1,3 * 10^6$ (на 98-99%).

На среде Сабуро, предназначенной для выделения микромицетов и дрожжей количество КОЕ было сопоставимо с таковым на других средах ($5,5 \pm 2,4 * 10^6 - 8,0 \pm 3,0 * 10^8$ кл/мл. Численность КОЕ уменьшалась при высеве на среду с антибиотиками на 96-99%.

В целом в пробах воды, отобранных в районе месторождений Каражамбас и Каламкас численность нефтеокисляющих бактерий была значительно выше, чем грибов и дрожжей.

Таким образом, полученные результаты показали, что нефтеокисляющие микроорганизмы широко распространены в исследуемом районе. Во всех отобранных пробах воды при росте на нефти месторождений, прилегающих к месту сбора проб, доминирующими являются нефтеокисляющие бактерии. Численность микромицетов, актиномицетов и дрожжей в морской воде данного района на несколько порядков ниже.

Литература

- 1 Бигалиев А.Б., Фаизов К.Ш., Асанбаев И.К. О нефтехимическом загрязнении почв Мангышлак-Прикаспийского региона // Вестник КазНУ. – 2003. – № 3. – С. 25-31.
- 2 Саулебекова А.К., Саданов А.К., Айткельдиева С.А., Чукпарова А.Т. Химические и физико-химические свойства нефтей и их влияние на почвы Прикаспия // Известия НАН РК. Серия биологическая. – 2006. – №5. – С. – 68-71.
- 3 Жакишева А.А. Пути преодоления воздействия нефтегазовых производств на окружающую среду // Вестник Челябинского государственного университета. – 2011. № 32 (247). – С. 142-149.
- 4 Сихимбаев М.Р., Ханов Т.А. Пути обеспечения экологической безопасности в нефтедобывающих регионах Казахстана // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – № 8 – С. 101-105.
- 5 Айткельдиева С.А., Файзулина Э.Р., Ауэзова О.Н., Курманбаев А.А., Татаркина Л.Г., Зайтова Т.Ш., Саданов А.К. Приемы активации биодеструкции нефти в почве // Материалы VII Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва, 2013. – С. 242-243.
- 6 ГОСТ 17.4.3.01-83. Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб. – Введ. 1984-30-06. – М.: ИПК Издательство стандартов, 2008. – 4 с.
- 7 ГОСТ 31861-2012 Вода. Общие требования к отбору проб. – Введ. 2013-10-28. – М.: Стандартинформ, 2013. – 36 с.
- 8 Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М., Колотилова Н.Н. и др. Практикум по микробиологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
- 9 Файзулина Э.Р., Ауэзова О.Н., Татаркина Л.Г., Свирко Е.А., Даулетова А.А., Айткельдиева С.А. Нефтеокисляющая активность и идентификация микроорганизмов, выделенных из Каспийского моря // Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская. – 2014. – №3. – С. – 25-29.

- 10 Colwell R.R. Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment // *CRC Crit Rev Microbiol.* – 1977. – № 5(4). – P. 423-445.
- 11 Коронелли Т.В., Ильинский В.В. Об учете численности углеводородокисляющих бактерий в морской воде методом предельных разведений // *Вестник МГУ. Серия 16, Биология.* – 1984. – № 3. – С.54-56.
- 12 Сребняк Е.А. Разработка технологии получения нового биопрепарата для восстановления нефтезагрязнённых акваторий на примере Балтийского моря: дис.... канд. тех. наук: 03.00.16, 03.00.23 / Рос. гос. ун-т нефти и газа им. И.М. Губкина. – Москва, 2008. – 124 с.
- 13 Справочник: Месторождения нефти и газа, Алматы. – 2007.

References

- 1 Bigaliev A.B., Faizov K.Sh., Asanbaev I.K. O neftehimicheskom zagraznenii pochv Mangyshlak-Prikaspijskogo regiona // *Vestnik KazNU.* – 2003. – № 3. – S. 25-31.
- 2 Saulebekova A.K., Sadanov A.K., Ajtkel'dieva S.A., Chukparova A.T. Himicheskie i fiziko-himicheskie svojstva neftej i ih vlijanie na pochvy Prikaspija // *Izvestija NAN RK. Serija biologicheskaja.* – 2006. – №5. – S. – 68-71.
- 3 Zhakisheva A.A. Puti preodolenija vozdejstviya neftegazovyh proizvodstv na okruzhajushhuju sredu // *Vestnik Cheljabinskogo gosudarstvennogo universiteta.* – 2011. № 32 (247). – S. 142-149.
- 4 Sihimbaev M.R., Hanov T.A. Puti obespechenija jekologicheskoj bezopasnosti v neftedobyvajushhix regionah Kazahstana // *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij.* – 2014. – № 8 – S. 101-105.
- 5 Ajtkel'dieva S.A., Fajzulina Je.R., Aujezova O.N., Kurmanbaev A.A., Tatarkina L.G., Zaitova T.Sh., Sadanov A.K. Priemy aktivacii biodestrukcii nefti v pochve // *Materialy VII Moskovskogo mezhdunarodnogo kongressa «Biotehnologija: sostojanie i perspektivy razvitija».* – Moskva, 2013. – S. 242-243.
- 6 GOST 17.4.3.01-83. Ohrana prirody. Pochvy. Obshhie trebovanija k otboru prob. – Vved. 1984-30-06. – M.: IPK Izdatel'stvo standartov, 2008. – 4 s.
- 7 GOST 31861-2012 Voda. Obshhie trebovanija k otboru prob. – Vved. 2013-10-28. – M.: Standartinform, 2013. – 36 s.
- 8 Netrusov A.I., Egorova M.A., Zaharchuk L.M., Kolotilova N.N. i dr. Praktikum po mikrobiologii: uchebnoe posobie dlja studentov vysshix uchebnyh zavedenij. – M.: Akademija, 2005. – 608 s.
- 9 Fajzulina Je.R., Aujezova O.N., Tatarkina L.G., Svirko E.A., Dauletova A.A., Ajtkel'dieva S.A. Nefteokisljajushhaja aktivnost' i identifikacija mikroorganizmov, vydelennyh iz Kaspijskogo morja // *Izvestija NAN RK. Serija biologicheskaja i medicinskaja.* – 2014. – №3. – S. – 25-29.
- 10 Colwell R.R. Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment // *CRC Crit Rev Microbiol.* – 1977. – № 5(4). – R. 423-445.
- 11 Koronelli T.V., Il'inskij V.V. Ob uchete chislenosti uglevodородokisljajushhix bakterij v morskoi vode metodom predel'nyh razvedenij // *Vestnik MGU. Serija 16, Biologija.* – 1984. – № 3. – S.54-56.
- 12 Srebnyak E.A. Razrabotka tehnologii poluchenija novogo biopreparata dlja vosstanovlenija neftezagraznjonyh akvatorij na primere Baltijskogo morja: dis.... kand. teh. nauk: 03.00.16, 03.00.23 / Ros. gos. un-t nefti i gaza im. I.M. Gubkina. – Moskva, 2008. – 124 s.
- 13 Справочник: Месторождения нефти и газа, Алматы. – 2007.