

7. Методы почвенной микробиологии и биохимии //Под ред. Звягинцева Д.Г. - М.: МГУ, 1991. – 304 с.
8. Богомолов А.И. Современные методы исследования нефти. - Л.: Недра, 1984. - 431 с.
9. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. – М.: Наука, 1991. – 304 с.
10. 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.
11. 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.

Summary

The present paper presents the results of studies on the oxidizing activity of free and immobilized cells on mineral sorbents microorganisms oil destructors conducted under field conditions at Karazhanbas Mangistau region. The greatest oil destructor activity was observed in oil destructor microorganisms immobilized on a concrete block.

Тұжырым

Бұл жұмыста минералды сорбенттерде иммобилизделген және бос күйінде мұнай тотықтырушы микроорганизмдердің мұнайды ыдырату белсенділігін анықтау барысында далалық жағдайда Маңғыстау облысы Қаражанбас кен орнында жүргізілген тәжірибенің қорытындысы келтірілген. Мұнайды ыдырату белсенділігі бойынша жоғары көрсеткіш көрсеткен керамзитта иммобилизделген мұнай ыдыратушы микроорганизмдер.

УДК 577.3.001.57

Чукпарова А.У.

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ДЕГРАДАЦИИ НЕФТЯНЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОКУЛЬТУР И КОНСОРЦИУМОВ МИКРООРГАНИЗМОВ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ

(РГП «Государственная вневедомственная экспертиза проектов» АДС ЖКХ)

В работе приведены данные по изучению углеводородокисляющей активности монокультур и консорциумов микроорганизмов-нефтедеструкторов на нативной почве месторождения Жанаталап в лабораторных условиях. Наибольшая нефтедеструкционная активность отмечена при внесении консорциума из 4 штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов.

Нефть и нефтепродукты являются одними из приоритетных загрязнителей окружающей природной среды. Уже сейчас территории, где проводится добыча нефти по состоянию окружающей среды, приближаются к районам экологического бедствия, так как наблюдаются глубокие изменения практически всех компонентов: воздуха, почв, поверхностных и подземных вод, биоты. Нефтяная промышленность по опасности воздействия на окружающую среду занимает третье место в числе 130 отраслей современного производства.

Одним из основных нефтедобывающих районов в Западном Казахстане является Атырауская область. В процессе добычи, транспортировки и переработки нефти происходит сильное загрязнение почвенного покрова, усиливает эти процессы аридность климата, засоление почв и вод. Нефть, добываемая в Западном Казахстане высокопарафинистая, с повышенным содержанием меркаптановых соединений, что негативного сказывается при разливе нефти на функционировании физико-химических показателей почв, формируя в профиле почвы мощные битумные коры.

В процессах самоочищения почв от нефтяного загрязнения микроорганизмы играют определяющую роль [1]. Эффективность интродуцируемой микрофлоры зависит от условий конкретного региона и зачастую оказывается недостаточно результативной. Кроме того, интродукция нефтедеструкторов в конкретно сложившийся микробиоценоз может оказаться неэффективной вследствие возможного антагонизма с аборигенной микрофлорой либо индивидуального характера нефтезагрязнений, поскольку добываемая в разных регионах нефть существенно различается по своему составу. Предпочтительнее при ликвидации региональных нефтезагрязнений выделение адаптированных к конкретным условиям микроорганизмов - нефтедеструкторов. В то же время, снижается риск, связанный с возможной гибелью в почве или длительным периодом адаптации к данной почве интродуцируемых микроорганизмов [2].

В связи с этим целью настоящей работы являлось изучение углеводородокисляющей активности монокультур и консорциумов микроорганизмов-нефтедеструкторов на нативной почве месторождения Жанаталап в лабораторных условиях.

Материалы и методы

Для постановки модельного эксперимента использовали нативную нефтезагрязненную почву с месторождения Жанаталап Атырауской области. Почву просеивали через сито с диаметром отверстий 1 мм, отбирали растительные остатки и твёрдый кристаллический материал (мелкие камешки, ракушки). Эксперимент закладывали в 3-х повторностях.

В модельном эксперименте заложено несколько вариантов опыта: внесено в почву только минеральное удобрение с органикой, внесены монокультуры каждого из 4 штаммов микроорганизмов *Micrococcus varians* PR69 *Bacillus subtilis* PR28 *Bacillus firmus* S20, *Micrococcus roseus* УД 6-4. Для сравнения вносили консорциумы из 2 и 4 штаммов микроорганизмов. Контролем служила нативная нефтезагрязненная почва. Инкубирование почвы проводили в течение 60 суток при комнатной температуре +28-30°C.

Для получения биомассы, УОМ культивировали на питательном бульоне при +28°C в течение 2 суток на перемешивающем устройстве ПЭ-6300 М (Россия, 2004). После культивирования полученную биомассу микроорганизмов центрифугировали при 5 тыс. об./мин в течение 10 мин. на центрифуге «Beckman» (США, 1985). Перед инокуляцией микроорганизмов, в почву вносили минеральное удобрение «Нитроаммофоска» – 5 г и органику (навоз) – 15 г. Почву инокулировали суспензией микроорганизмов-нефтедеструкторов с титром 10^6 кл/мл и тщательно перемешивали стерильным шпателем. Перед внесением консорциума культуры микроорганизмов перемешивали.

Отбор проб почвы проводили согласно установленным методам отбора и подготовки проб почвы для микробиологического и химического анализа [3].

Содержание нефти в почве определяли весовым методом после экстракции ее трихлорметаном [4].

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 Жанаталап [3].

Активность каталазы в почве определяли газометрическим методом по Галстяну А.Ш. [5]. Фитотоксичность почвы определяли по проценту всхожести семян редиса розово-красного с белым кончиком (*Raphanus sativa L.*) [6].

Результаты и их обсуждение

Для постановки модельного эксперимента нами была использована нативная почва, отобранная на месторождении Жанаталап Атырауской области. Нефть и ее фракции, проникая в растения, нарушают строение клеточных мембран, регулирующих обмен веществ. Содержание нефти свыше 500 мг/кг оказывает губительное действие на растения. Одной из главных причин торможения развития растений и их гибели в нефтезагрязненных почвах является влияние ее тяжелых фракций, создающих механический барьер между семенами, корневой системой и окружающей средой. Нарушается водно-воздушный обмен и пищевой режим растений, затрудняется поступление воды и питательных веществ, наблюдается кислородное голодание. Внесение в почву УОМ ускоряет деструкцию углеводородов нефти и активизирует биологические процессы в почве [7].

Исходное содержание нефти в почве модельного эксперимента составило 29 г/кг почвы. В эксперименте заложены 9 вариантов. Контролем служила нефтезагрязненная почва без внесения микроорганизмов и удобрений. Длительность модельного эксперимента составила 60 суток, в течение которых контролировали деструкцию нефти в почве, активность каталазы, численность УОМ и снижение фитотоксичности почвы.

Через 15 суток содержание нефти в почве контрольного варианта осталось без изменений, тогда как в варианте с внесением органо-минерального удобрения снизило содержание нефти в 1,04 раза, что связано с активизацией естественной углеводородокисляющей микрофлоры. По литературным данным [8,9] известно, что обработка азотно-фосфорным удобрением стимулирует аборигенную нефтеокисляющую микрофлору. Обеспеченность почв биогенными элементами: азотом, фосфором и калием - важный фактор, определяющий интенсивность разложения нефти и нефтепродуктов.

Интродукция монокультур углеводородокисляющих микроорганизмов в нативную почву способствовала снижению содержания нефти в течение 15 суток в 1,7-1,9 раза по сравнению с контрольным вариантом. Наиболее активным оказался штамм *Micrococcus roseus* УД6-4. Результаты представлены в таблице 1.

Внесение в нефтезагрязненную почву биогенных элементов обуславливается как повышением численности микроорганизмов, так и значительным изменением соотношения C:N и снижением содержания в почве подвижных форм фосфора и калия [8].

Применение бактериальных консорциумов, состоящих как из модельных сочетаний селекционированных штаммов, так и целиком изолированных из природных источников, по мнению многих авторов, является более целесообразным по сравнению с использованием монокультур [10,11], что подтвердилось и нашими данными.

Так интродукция консорциумов на основе двух штаммов микроорганизмов способствовала снижению содержания нефти в 2 раза по сравнению с контрольным вариантом и в 1,2 раза по сравнению с монокультурами углеводородокисляющих микроорганизмов. Однако нами установлено, что внесение консорциума из 4 штаммов микроорганизмов способствовало снижению содержания нефти в 3,12 раза по сравнению с контролем.

Таблица 1 - Угледородоокисляющая активность монокультур и консорциумов микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти в модельном эксперименте

Варианты опыта	Сутки					
	15		30		60	
	содержание нефти, г/кг почвы	деструкция, %	содержание нефти, г/кг почвы	деструкция, %	содержание нефти, г/кг почвы	деструкция, %
Контроль	29,00±1,04	0	28,10±1,14	3,10	26,90±1,54	7,24
Минеральные удобрения+органика	27,85±1,51	3,96	27,50±1,07	5,17	24,50±1,40	15,52
<i>Micrococcus varians</i> PR69	15,78±1,41	45,58	9,80±0,31	66,21	7,20±0,16	75,17
<i>Bacillus subtilis</i> PR28	17,57±0,32	39,41	10,00±0,44	65,52	7,50±0,19	74,12
<i>Bacillus firmus</i> S20	17,13±0,95	40,93	10,70±0,58	63,10	7,80±0,23	73,10
<i>Micrococcus roseus</i> УД 6-4	14,90±0,87	48,62	9,60±0,35	66,89	6,80±0,31	76,55
<i>Micrococcus varians</i> PR69+ <i>Micrococcus roseus</i> УД6-4	13,86±0,76	52,21	8,40±0,50	71,03	5,00±0,44	82,76
<i>Bacillus firmus</i> S20+ <i>Bacillus subtilis</i> PR28	14,00±0,68	51,72	9,10±0,39	68,62	5,80±0,23	80,00
<i>Micrococcus varians</i> PR69+ <i>Micrococcus roseus</i> УД6-4+ <i>Bacillus firmus</i> S20+ <i>Bacillus subtilis</i> PR28	9,30±0,22	68,00	4,20±0,11	85,52	1,80±0,07	93,79

Анализ содержания нефти через 30 суток показал, что в почве контрольного варианта содержание нефти снизилось на 0,9 г/кг почвы, а по истечении 60 суток на 2,1 г/кг почвы. Тогда как в варианте с внесением органо-минерального удобрения снижение содержания нефти произошло на 1,5 и 4,5 г/кг почвы, соответственно.

В вариантах, где были внесены только монокультуры микроорганизмов деструкция нефти за 30 суток составила от 63,1 до 66,89%, за 60 суток от 73,1 до 76,5%.

Внесение консорциумов из двух штаммов микроорганизмов способствовало деструкции нефти до 71,0% за 30 суток и до 82,7% за 60 суток. Наибольший процент деструкции нефти в почве нами наблюдался в варианте с внесением консорциума из 4 штаммов углеводородоокисляющих микроорганизмов. Так, за 30 суток деструкция нефти составила 85,5%, а за 60 суток - 93,8%.

В течение всего эксперимента нами проводился анализ численности УОМ и активности почвенного фермента – каталазы. Исходная численность УОМ в нефтезагрязненной почве составила $(2,43 \pm 0,57) \times 10^3$ кл/г почвы. В почве контрольного варианта через 15 суток численность УОМ возросла в 1,2 раза, через 30 и 60 суток увеличилась на 1 порядок по сравнению с исходным показателем. В варианте с внесением органо-минерального удобрения через 15 суток наблюдалось увеличение численности УОМ на 1 порядок и через 30 и 60 суток на 2 порядка по сравнению с исходной численностью УОМ (таблица 2).

Таблица 2 – Динамика численности УОМ в почве модельного эксперимента, кл/г почвы

Варианты	Сутки		
	15	30	60
Контроль	$(3,00 \pm 0,05) \times 10^3$	$(5,80 \pm 0,20) \times 10^4$	$(3,20 \pm 0,10) \times 10^4$
Минеральное удобрение+органика	$(1,70 \pm 0,04) \times 10^4$	$(1,26 \pm 0,15) \times 10^5$	$(4,18 \pm 0,29) \times 10^5$
<i>Micrococcus varians</i> PR69	$(2,04 \pm 0,07) \times 10^6$	$(3,03 \pm 0,24) \times 10^6$	$(4,50 \pm 0,40) \times 10^5$
<i>Bacillus subtilis</i> PR28	$(2,75 \pm 0,23) \times 10^6$	$(3,91 \pm 0,37) \times 10^6$	$(2,53 \pm 0,23) \times 10^5$
<i>Bacillus firmus</i> S20	$(1,79 \pm 0,19) \times 10^6$	$(7,24 \pm 0,53) \times 10^6$	$(8,92 \pm 0,48) \times 10^5$
<i>Micrococcus roseus</i> УД6-4	$(1,48 \pm 0,17) \times 10^6$	$(3,01 \pm 0,24) \times 10^6$	$(3,21 \pm 0,21) \times 10^5$
<i>Micrococcus varians</i> PR69+ <i>Micrococcus roseus</i> УД6-4	$(6,17 \pm 0,20) \times 10^6$	$(9,07 \pm 0,35) \times 10^6$	$(2,72 \pm 0,12) \times 10^6$
<i>Bacillus firmus</i> S20+ <i>Bacillus subtilis</i> PR28	$(3,96 \pm 0,11) \times 10^6$	$(5,30 \pm 0,33) \times 10^6$	$(1,85 \pm 0,05) \times 10^5$
<i>Micrococcus varians</i> PR69+ <i>Micrococcus roseus</i> УД6-4+ <i>Bacillus firmus</i> S20+ <i>Bacillus subtilis</i> PR28	$(1,46 \pm 0,09) \times 10^7$	$(1,04 \pm 0,02) \times 10^7$	$(1,84 \pm 0,18) \times 10^6$

Увеличение численности УОМ на 3 порядка по сравнению с исходным показателем нами наблюдалось через 30 суток в вариантах с внесением монокультур и консорциумов на основе двух штаммов микроорганизмов.

При внесении консорциума из 4 штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов на 30 сутки наблюдалось увеличение УОМ на 4 порядка по сравнению с исходной численностью УОМ.

По мере исчерпания углеводородного субстрата к концу модельного эксперимента в вариантах с внесением монокультур и консорциумов микроорганизмов-деструкторов нефти наблюдалось снижение численности УОМ на один порядок.

Активность почвенного фермента - каталазы служила тест-системой снижения содержания нефти в почве. Активность каталазы нативной почвы вначале модельного эксперимента составила 5,2 мл O₂/г почвы за мин. Через 30 и 60 суток в контрольном варианте показатель активности каталазы возрос в 1,06-1,13 раза по сравнению с исходным показателем.

В варианте с внесением органо-минерального удобрения наблюдали увеличение активности каталазы примерно в 1,11-1,23 раза по сравнению с исходным значением (рисунок 1).

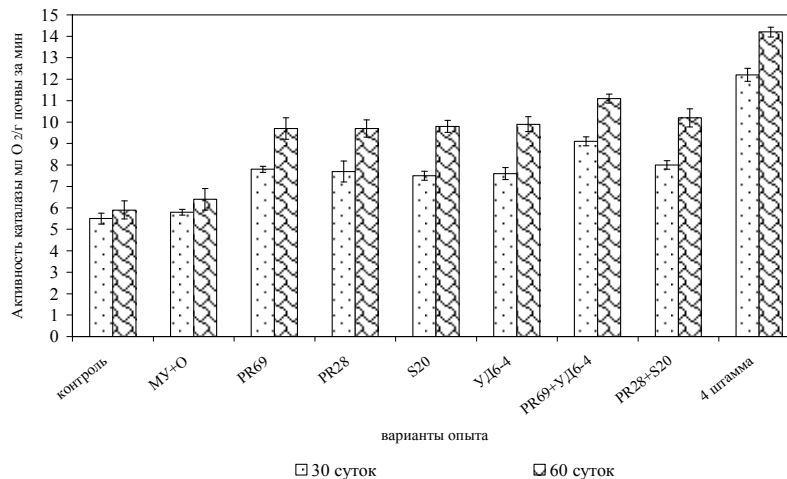


Рисунок 1 - Изменение активности каталазы в почве модельного эксперимента

В вариантах с внесением монокультур и консорциумов микроорганизмов к концу модельного эксперимента отмечалось увеличение активности каталазы в 1,9-2,7 раза по сравнению с исходным показателем, что свидетельствовало об усилении процессов окисления углеводородов нефти, что также отмечает Хазиев Ф.Х и др. в своих исследованиях [12].

Для определения токсикометрических показателей почвы в модельном эксперименте нами проведен тест на фитотоксичность почвы. В качестве тест-объекта был выбран редис розово-красный с белым кончиком (*Raphanus sativa L.*), один из наиболее часто используемых объектов для биотестирования [13].

Фитотоксичность почвы определяли по прорастанию семян редиса в конце модельного эксперимента. Нами отмечена самая низкая всхожесть семян редиса на почве контрольного варианта (нефтезагрязненная почва) – 11%. В варианте с добавлением органо-минерального удобрения процент всхожести семян редиса составил всего 18% (рисунок 2).

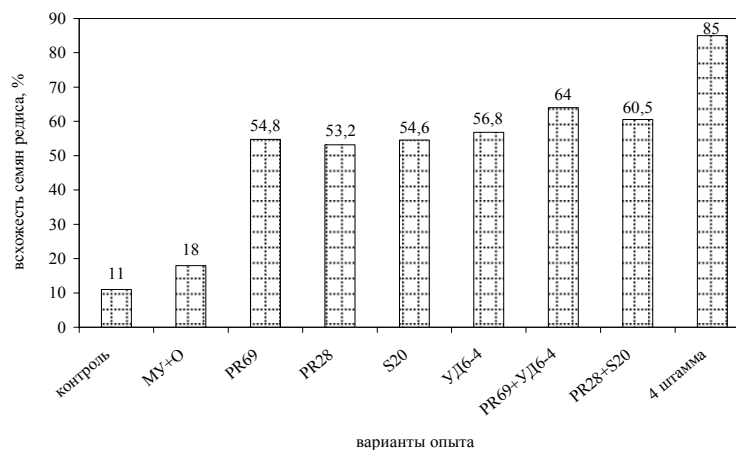


Рисунок 2 – Всхожесть семян редиса в почве модельного эксперимента

В вариантах с внесением монокультур микроорганизмов высокую всхожесть семян редиса наблюдали на почве с внесением культуры микроорганизмов УД6-4 – 56,8%.

Всхожесть семян редиса на почве в вариантах с внесением консорциумов из двух штаммов составила 64% при внесении культур микроорганизмов PR69 и УД6-4 и 60,5% при внесении культур микроорганизмов S20 и PR28.

Наибольшая всхожесть семян редиса - 85% отмечена в варианте с внесением консорциума из 4 штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов.

Таким образом, в результате проведенного модельного эксперимента выявлено, что наибольшая деструкция нефти за 60 суток - 93,79% отмечена при внесении консорциума из 4 штаммов микроорганизмов, при этом активность каталазы увеличивается в 2,73 раза по сравнению с исходным показателем. По результатам всхожести семян редиса в этом варианте установлена 85% всхожесть семян редиса, что свидетельствует о снижении фитотоксичности исследуемой почвы.

Литература

1. 1 Гусев М.В., Коронелли Т.В. Изучение ассоциации цианобактерий и нефтеокисляющих бактерий в условиях нефтяного загрязнения //Микробиология. - 1981. - Т. 50. - Вып. 6. - С. 1092–1097.
2. 2 Лысак Л.В., Лапыгина Е.В. Деструкция нефти монокультурами и природными ассоциациями почвенных бактерий //Вестник МГУ, серия 17. - 1994. - № 1. -С.58-62.
3. 3 Методы почвенной микробиологии и биохимии //Под ред. Звягинцева Д.Г. - М.: МГУ, 1991. – 304 с.
4. 4 Богомолов А.И. Современные методы исследования нефтей. - Л.: Недра, 1984. - 431 с.
5. 5 Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. – М.: Наука, 1991. – 304 с.
6. 6 Петухов В.Н., Фомченко В.М., Чугунов В.А. Биотестирование почвы и воды, загрязненных нефтью и нефтепродуктами с помощью растений // Приклад. микробиол. биохим. – 2000. – Т. 36, № 6. – С. 652-655.
7. 7 Киреева Н.А. Микробиологические процессы в нефтезагрязненных почвах: автореф....докт. биол. наук: 03.00.07. – Санкт-Петербург, 1996. - 25 с.
8. 8 Чугунов В.А., Ермоленко З.М., Жиглецова С.К., Мартовецкая И.И., Миронова Р.И., Холоденко В.П. Разработка и испытания жидких и сухих форм препарата на основе ассоциации углеводородокисляющих бактерий // Сборник тезисов докл. конф. «Экобиотехнология: борьба с нефтяным загрязнением окружающей среды». - Пушино, 2001. - С. 63-64.
9. 9 Гилязов М.Ю. Изменение некоторых агрохимических свойств выщелоченного чернозема при загрязнении его нефтью // Агрохимия. - 1980. - Т. 12.- С. 72-75.
10. 10 Trindade P.V.O., Sobral L.G., Rizzo A.C.L., Leite S.G.F., Soriano A.U. Bioremediation of a weathered and recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study // Chemosphere. – 2005. – Vol. 58. – P. 515-522.
11. 11 Sun Y., Chen Z., Xu S., Cai P. Stable carbon and hydrocarbon isotopic fractionation of individual n-alkanes accompanying biodegradation: evidence from a group of progressively biodegraded oils // Organic Geochemistry. – 2005. - Vol. 36. - P. 225-238.
12. 12 Хазиев Ф.Х., Тишкина Е.И., Киреева Н.А., Кузахметов Г.Г. Влияние нефтяного загрязнения на некоторые компоненты агросистемы // Агрохимия. - 1988. - № 2. - С. 56-61.
13. 13 Stom D.I. Effect of polyphenols on shoot and root growth and on seed germination // Biologia Plantarum. - 1982. – Vol. 24, № 1. – P. 1-6.

Тұжырым

Бұл жұмыста лабораториялық жағдайда Жаңаталап кең орнының нативті топырағында монокультуралар және мұнай ыдыратушы микроорганизмдер консорциумдарын көмірсутектерді тотықтыру белсенділігін зерттеу қорытындысы көрсетілген. Нәтижесінде 4 штамнан тұратын консорциумды енгізгенде мұнайды ыдырату белсенділігі ең жоғары көрсеткішті көрсетті.

Summary

The paper presents data on the study of hydrocarbon activity monocultures and consortia of microorganisms-oil destructors on native soil deposits Zhanatalap under laboratory conditions.

The greatest oil destructor activity noted when introducing a consortium of four strains of hydrocarbon-microorganism.