

- 2 Терещенко Н.Н., Лушников С.В., Бубина А.Б. Цеолиты и нефтяные загрязнения почвы // Энергия: Экономика, техника, экология. – 2007. - № 1. – С. 24-30.
- 3 Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – С. 59-75.
- 4 Коновалова Е.В. Влияние цеолитов и фитомелиоранта на агроэкологические показатели нефтезагрязненных почв в криоаридных условиях Забайкалья.- Диссертация на соискание ученой степени канд. сельскохозяйственных наук. – Улан-Удэ, 2009. – 142 с.
- 5 Белоусов С.В. Применение цеолитсодержащей породы как сорбента аммиака и пестицидов из водных сред // Агрохимия. – 2005.- № 8. – С.65-69.
- 6 Терещенко Н.Н., Лушников С.В., Русских И.В., Франк Ю.А. Эффективность бактериального препарата «S-607» и цеолита при очистке почвы и водной среды от нефти// Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2010. - № 5. – С.13-19.
- 7 Baran S. Bielinsko J.E., Oleazek P. Enzymatic activity in an air field soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons // Geoderma. – 2004. – V. 118. – P. 221-232.
- 8 Voopathy R. Factors limiting bioremediation technologies // Bioresur. Technol. – 2000. –V.74. – P.63-67.

УДК 579.695

Г.К. Кайырманова*, А.А. Жубанова, А.К. Ерназарова, Н.Ш. Акимбеков,
Г.Ж. Абдиева, П.С.Уалиева, Д.А. Жусипова
Казахский национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан
*e-mail: kaiyrman@mail.ru

Конструирование активных микробных ассоциаций-деструкторов нефти

Сконструированы 4 активные микробные ассоциации на основе одной коллекционной и 2 аборигенных культур микроорганизмов, обладающих высокой нефтеокисляющей и эмульгирующей активностями. Для дальнейших полевых ремедиационных работ рекомендованы 2 ассоциации, состоящих из 2-х культур – *Ps. ssp.БШС-1:Ps.aeruginosa* H14; и состоящая из 3-х культур микроорганизмов - *Ps. ssp.ЗГ-2:БШС-1:Ps. aeruginosa* H14.

Ключевые слова: ассоциация, углеводородокисляющие микроорганизмы, биоремедиация, биodeградация, полигон-накопитель.

Г.К. Кайырманова, А.А. Жубанова, А.К. Ерназарова, Н.Ш. Акимбеков, Г.Ж. Абдиева,
П.С.Уалиева, Д. Жусипова

Белсенді микробтық мұнай деструкторларының ассоциацияларын құрастыру

Коллекциялық және екі аборигенді микроорганизмдер дақылдарының негізінде мұнай тотықтырушы және эмульгирлеуші белсенділіктері жоғары төрт белсенді микробтық ассоциациялар құрастырылды. Далалық ремедиациялық жұмыстар үшін екі ассоциациялар ұсынылды: екі дақылдан тұратын - *Ps. ssp.БШС-1:Ps.aeruginosa* H14 және үш микроорганизмдер дақылынан тұратын – *Ps. ssp.ЗГ-2:БШС-1:Ps. aeruginosa* H14.

Түйін сөздер: ассоциация, көмірсутек тотықтырушы микроорганизмдер, биоремедиация, биodeградация, полигон-жинақтаушы.

G.K. Kaiyrmanova, A.A. Zhubanova, A.K. Yernazarova, N.S. Akimbekov,
G.J. Abdieva, P.S. Ualieva, D. Zhusipova

Design of Active Microbial Associations Destructor-Oil

Designed 4 active microbial associations on the basis of one collector and two aboriginal cultures of microorganisms that have a high oil-oxidizing and emulsifying activity. To further the field of remediation works recommended two associations, consisting of 2 cultures – *Ps. ssp.БШС-1:Ps.aeruginosa* H14, and consists of 3 cultures of microorganisms – *Ps. ssp.ЗГ-2:БШС-1:Ps. aeruginosa* H14.

Keywords: association, the hydrocarbon-oxidizing microorganisms, bioremediation, biodegradation, cyanobacteria, polygon.

На современном этапе развития технологии нефтедобычи при эксплуатации нефтяных месторождений образуются большие объемы отходов: нефтяные шламы, буровые химреагенты, замазученный грунт [1, 2]. Действенные способы очистки высоко-загрязненных нефтью и нефтепродуктами экосистем является комплекс работ, включающий механическое или физико-химическое удаление нефтепродуктов с последующей очисткой остающейся в грунте, почве или воде нефти биологическими методами при помощи биодеструкции нефтеокисляющими микроорганизмами.

В то же время существующие в настоящее время препараты оказываются недостаточно эффективными в различных экстремальных почвенно-климатических условиях нашей страны [1, 3-5], в связи, с чем для ликвидации масштабных последствий разливов нефти и ликвидации отходов нефтедобычи на полигонах-накопителях в настоящее время необходима разработка новых препаратов, способных в конкретных условиях деструктировать высококонцентрированные загрязнения органической природы.

Цель работы – создать на основе аборигенных и коллекционных культур микробные ассоциации, обладающие высокой нефтеокисляющей и эмульгирующей активностью.

В работе были использованы 3 углеводородокисляющие культуры микроорганизмов: из коллекции кафедры биотехнологии Казахского национального университета им. аль-Фараби: *Pseudomonas aeruginosa* H14 и выделенные из нефтяных отходов полигона-накопителя месторождения «Жанажол» Актюбинской области *Ps. ssp.*БШС-1, *Ps. ssp.*ЗГ-2.

Для конструирования ассоциации использовались следующие варианты ассоциаций: ЗГ-2:*Ps. aeruginosa* H14; БШС-1:*Ps. aeruginosa* H14; БШС-1:ЗГ-2:*Ps. aeruginosa* H14; БШС-1: ЗГ-2.

Суспензия бактерий готовилась в МПБ в течении 24-48 часов. Затем инокулят добавляли в количестве 10% объемных в минимальную синтетическую среду Е8 с 30% содержанием нефти с расчетом 1:1, в случае использования 2 культур и 1:1:1, в случае использования 3 культур. Были сконструированы

Нефтеокисляющую активность сконструированных ассоциаций микроорганизмов изучали по росту культур на жидкой среде Е-8 с добавлением нефти в условиях аэрации в течении 12-15 суток при комнатной температуре. Нефть вносили непосредственно в ростовую среду в качестве единственного источника углерода и энергии. При составлении ассоциаций микроорганизмов численность подсеваемых микроорганизмов определяли методом Коха путем подсчета КОЕ на МПА, бактерии вносили в количестве 0,4-0,5 ед. оптической плотности, что соответствовало количеству 12-16 млн. кл/мл.

Скорость роста культур в жидкой синтетической среде контролировали нефелометрически на фотоколориметре КВК 2МП в стандартных кюветах с длиной оптического пути 1 см при длине волны 540 нм. Также проводили корреляцию количества клеток в ферментируемой жидкости модифицированным методом Коха с периодичностью 24 часа, т.е. пробы ежедневно отбирались по 2 мл, которые отсеивались на МПА для подсчета ОМЧ и изучения макро- и микроморфологических свойств УОМ.

Изучение роста углеводородокисляющих монокультур: аборигенных - *Ps. ssp.*БШС-1, *Ps. ssp.*ЗГ-2; коллекционной – *Ps. aeruginosa* H14 и созданных на их основе ассоциаций микроорганизмов-деструкторов проводилось в среде с содержанием нефти 30%, где нефть использовалась в качестве единственного источника углерода и энергии.

В качестве контроля для вариантов с содержанием 30% нефти использовались варианты с содержанием сахарозы - единственного источника углерода и энергии в среде.

Нефтеокисляющую способность монокультур и ассоциаций определяли косвенно, по двум коррелирующим показателям: оптической плотности (прирост биомассы) и количества микробных клеток в суспензии.

Показано, что все культуры размножаются на среде с высоким содержанием нефти, причем адаптационная фаза клеток не превышает 24 часов. Для клеток *Ps. aeruginosa* H14, *Ps. ssp.*ЗГ-2 в монокультуре наблюдается явление диауксии, что показывает переключение бактерий с одного источника углерода на другой в составе нефти. Следует отметить активное размножение коллекционной культуры клеток *Ps. aeruginosa* H14 с первых суток, пик наибольшего показателя количества клеток в среде составил 490×10^6 кл/мл на 5-ые сутки, аборигенные культуры *Ps. ssp.*БШС-1 и *Ps. ssp.*ЗГ-2 показали более низкие результаты 330×10^6 кл/мл 880×10^6 кл/мл, соответственно. В экспериментах лучшие результаты наблюдались для ассоциаций на основе *Ps. ssp.*БШС-1:*Ps. aeruginosa* H14 и *Ps. ssp.*ЗГ-2: *Ps. ssp.* БШС-1:*Ps. aeruginosa* H14, так на 5-7 сутки культивирования и показатель ОМЧ составлял 550×10^6 кл/мл, 760×10^6 кл/мл, соответственно, при исходном показателе равном $12-14 \times 10^6$ кл/мл.

Установлено, что, исходные среды с содержанием 30% нефти представляют собой эмульсии типа «масло-вода», причем нефть образует на поверхности однородную пленку толщиной 3-5 мм темно-коричневого цвета. На 6-ые сутки ферментации микроорганизмами среда превращается в

однородную вязкую массу от коричневого до светло-коричневого цвета, жидкая фракция практически отсутствует. К концу эксперимента происходит осветление среды до светло-коричневого цвета, среда становится жидкой, на дно выпадает хлопьевидный осадок.

Такие визуальные изменения ферментируемых сред наблюдались во всех вариантах с культурами, но с различной интенсивностью, наблюдается прямая корреляция с результатами роста монокультур и ассоциаций микроорганизмов на среде высоким содержанием нефти.

В результате проведения макро- и микро-морфологических исследований углеводород-окисляющих культур микроорганизмов выявлено, что в процессе культивирования на среде с высокой концентрацией нефти происходит уменьшение, как колоний, так и клеток микроорганизмов. Мы полагаем, морфологические изменения в виде уменьшения клеток, связаны с механизмами резистентности клеток к ксенобиотикам.

В результате изучения индекса эмульгирования 3 углеводородокисляющих монокультур: аборигенных - *Ps. ssp.*БШС-1, *Ps. ssp.*ЗГ-2; коллекционной – *Ps. Aeruginosa H14* и созданных на их основе 4 вариантов ассоциаций микроорганизмов - *Ps. ssp.*ЗГ-2 : *Ps. ssp.*БШС-1; *Ps. ssp.*ЗГ-2 : *Ps. aeruginosa H14*; *Ps. ssp.*БШС-1 : *Ps. aeruginosa H14*; *Ps. ssp.*ЗГ-2 : *Ps. ssp.*БШС-1 : *Ps. aeruginosa H14*, соединенных в соотношении 1:1 установлено, что, на всех используемых субстратах (нефть, дизельное топливо, гексан, бензол и бензин), монокультуры и ассоциации микроорганизмов показали индекс эмульгирования выше 50%, что является показателем потенциальной перспективности микроорганизмов как продуцентов биоПАВ [6-8]. Среди ассоциации микроорганизмов лучшие показатели индекса эмульгирования выявлены для 2-х ассоциаций на основе *Ps. ssp.*БШС-1 : *Ps. aeruginosa H14* и *Ps. ssp.*ЗГ-2хБШС-1 : *Ps. aeruginosa H14*, и показатель этот составил 88% и 89%.

Установлено, что ассоциации на основе *Ps. ssp.*ЗГ-2 : *Ps. ssp.*БШС-1 и *Ps. ssp.*ЗГ-2:*Ps. aeruginosa H14* показали результаты индекса эмульгирования ниже чем в составляющих их монокультурах – 69% и 71%, соответственно, что возможно является свидетельством отрицательных взаимоотношений культур в ассоциациях. Такие данные коррелируют с результатами, полученными при росте монокультур и ассоциаций микроорганизмов на среде с 30% содержанием нефти.

Следует отметить, что в контрольных вариантах, где монокультуры и ассоциации микроорганизмов, культивировались без нефти с содержанием сахарозы как единственного источника углерода на минимальной синтетической среде на 3-4 сутки, как монокультуры, так и сконструированные на их основе ассоциации образовывали агрегаты клеток в виде плотных шарообразных и ленточных структур.

Таким образом, в результате изучения нефтеокисляющей и эмульгирующей активностей углеводородокисляющих моно-культур: аборигенных - *Ps. ssp.*БШС-1, *Ps. ssp.*ЗГ-2; коллекционной – *Ps. aeruginosa H14* и созданных на их основе 4 ассоциаций микроорганизмов-деструкторов, показано, все монокультуры и ассоциации размножаются на среде с высоким содержанием нефти (30% объемных), причем адаптационная фаза всех микроорганизмов не превышает 24 часов. Наилучшие результаты наблюдались для ассоциаций на основе *Ps. ssp.*БШС-1:*Ps. aeruginosa H14* и *Ps. ssp.*ЗГ-2:*Ps. ssp.*БШС-1:*Ps. aeruginosa H14*, так на 5-7 сутки культивирования и показатель ОМЧ составлял 550×10^6 кл/мл, 760×10^6 кл/мл, соответственно, исходный показатель составлял $12-14 \times 10^6$ кл/мл. Результаты визуальных и микроскопических наблюдений за макро- и микроморфологией колоний нефтеокисляющих микроорганизмов свидетельствуют о том, что в процессе культивирования на среде с высокой концентрацией нефти происходит уменьшение размеров как колоний, так клеток микроорганизмов, что возможно является механизмом резистентности к высоким концентрациям ксенобиотика в среде.

Изучение индекса эмульгирования углеводородокисляющих монокультур и сконструированных на их основе ассоциаций микроорганизмов монокультуры и ассоциации микроорганизмов показали индекс эмульгирования выше 50%, что является показателем потенциальной перспективности микроорганизмов как продуцентов биоПАВ, следовательно, высокоактивных деструкторов. Среди ассоциации микроорганизмов лучший показатель индекса эмульгирования составил 88% и 89% для ассоциаций на основе *Ps. ssp.*БШС-1 : *Ps. aeruginosa H14* и *Ps. ssp.*ЗГ-2хБШС-1 : *Ps. aeruginosa H14*.

Ассоциации на основе *Ps. ssp.*ЗГ-2: *Ps. ssp.*БШС-1 и *Ps. ssp.*ЗГ-2:*Ps. aeruginosa H14* показали результаты индекса эмульгирования ниже чем в монокультурах – 69% и 71%, соответственно, что возможно является свидетельством отрицательных взаимоотношений культур в ассоциациях. Такие

результаты полностью коррелируют с результатами, полученными при росте монокультур и ассоциаций микроорганизмов на среде с 30% содержанием нефти.

Таким образом, сконструированы 4 активные микробные ассоциации на основе одной коллекционной и 2 аборигенных культур микроорганизмов, обладающих высокой нефтеокисляющей и эмульгирующей активностями. Для дальнейших полевых ремедиационных работ рекомендованы 2 ассоциации, состоящих из 2-х культур - *Ps. ssp.*БШС-1:*Ps.aeruginosa H14*; и состоящая из 3-х культур микроорганизмов – *Ps. ssp.*3Г-2:БШС-1:*Ps. aeruginosa H14*.

Литература

- 1 Королев В.А. Очистка грунтов от загрязнений. – М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. – 365 с.
- 2 Информационно-аналитический отчет по контрольной и правоприменительной деятельности Актобинской экологической инспекции за 2010 год / Министерство охраны окружающей среды Республики Казахстан. Тобыл-Торгайский департамент экологии. – Актобе, 2010. – 200 с.
- 3 Ягафарова Г.Г. Инженерная экология в нефтегазовом комплексе. – Уфа: Изд. УГНТУ, 2007. – 334 с.
- 4 Рекомендации по использованию биопрепарата «Деворойл» для очистки объектов железнодорожного транспорта от загрязнения нефтепродуктами. – Москва: Мир, 1999. - 21 с.
- 5 Сапарбекова А.А., Исаева А.У., Куатбеков А.М., Илялетдинов А.Н. Использование микроорганизмов для биорекультивации нефтезагрязненных земель на территории Южно-Казахстанской области // Известия МОН РК НАН РК. Серия биологическая и медицинская. – 2001. - №6. – С. 14-19.
- 6 Jaysree R.C., Subham B., Priyanka P.S. Isolation of biosurfactant producing bacteria from environmental samples // Pharmacologyonline. – 2011. – P. 1427-1433.
- 7 Palashpriya D., Soumen M., Ramkrishna S. Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium // Bioresource Technology. – 2009. - P. 1015-1019.
- 8 Person A., Molin G. Capacity for biosurfactant production of environmental Pseudomonas and Vibronaceae growing on carbohydrates // Appl.Microbiol. and Biotechnol. – 1987. – V. 26. - N5. – P. 439-442.

УДК 547.458.81:577.15:576.85:547.455.623

С.Г Каманова*, Д.Б Тоймбаева., Н.Л. Нечай, Г.Х. Оспанкулова

ТОО «Казахский научно-исследовательский институт переработки сельскохозяйственной продукции»,

г. Астана, Казахстан

*e-mail: kamanovaveta@mail.ru

Усиление целлюлозолитической активности штаммов продуцентов целлюлаз и β -глюканаз

В данной работе изучалось влияние комплексного воздействия химических и физических мутагенов на штаммы-продуценты целлюлаз и β -глюканаз с целью усиления целлюлозолитической активности. В результате проведенных исследований сделано следующее заключение: проведение комплексного поэтапного воздействия химическим мутагеном, УФ-облучением и дробным рентгеновским облучением является эффективным для получения мутантных штаммов с высокой целлюлозолитической активностью.

Ключевые слова: Штаммы-продуценты, химический мутагенез, УФ, рентген, облучение, целлюлозолитическая активность.

S.G. Kamanova., D.B. Toymbaeva., N.L. Nechay, G.H. Ospankulova

Целлюлаза және β -глюканаза штамм продуценттерінің целлюлозалитикалық белсенділігін арттыру

Берілген жұмыста целлюлаза және β -глюканаза штамм продуценттерінің целлюлозалитикалық белсенділігін арттыру мақсатында химиялық және физикалық мутагендердің құрылымдық әсері зерттелген. Жүргізілген зерттеулер нәтижесінен келесідей қорытынды жасауға болады: жоғары целлюлозалитикалық белсенділігі бар мутантты штамм алу үшін кешенді әрсатылы химиялық мутагенез жүргізу, УФ сәулелендіру мен бөлшекті рентгенді сәулелендіру тиімді болып табылады.

Түйін сөздер: Штамм-продуценттер, химиялық мутагенез, УФ, рентген, сәулелендіру, целлюлозалитикалық белсенділік.

S.G. Kamanova., D.B. Toymbaeva., N.L. Nechay, G.H. Ospankulova

Enhancing of cellulolytic activity of cellulase and β -glucanase producing strains

In this work, we studied the effect of complex influence of chemical and physical mutagens on the cellulase-producing strains and β -glucanases to strengthen cellulolytic activity. The research resulted in the following conclusions: conducting comprehensive phase-effects of chemical mutagenesis, UV radiation and fractional X-ray irradiation is effective to obtain mutant strains with high cellulolytic activity.

Keywords: Producer strains, chemical mutagenesis, UV, X-rays, radiation, cellulolytic activity.