

АССОЦИАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ



А.К. САДАНОВ,
доктор биологических наук, профессор,
академик НАН РК, генеральный
директор «НПЦ микробиологии и
вирусологии»



Г.А. СПАНКУЛОВА*,
научный сотрудник лаборатории
экологической
и сельскохозяйственной микробиологии

О.Н. АУЭЗОВА,
научный сотрудник лаборатории экологической и сельскохозяйственной
микробиологии

«НПЦ микробиологии и вирусологии»,
Республика Казахстан, 050010, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 105

Из нефтезагрязненных почв месторождения Кумколь Кызылординской области выделено и идентифицировано 12 микроорганизмов, обладающие высокой нефтеде-структурирующей активностью, изучена их биосовместимость. Все культуры были толерантны друг к другу. На основе отобранных штаммов составлены ассоциации, способные активно утилизировать нефть месторождения Кумколь, а также мазут и дизельное топливо. Наиболее активными были два ассоциации, состоящие из трех и четырех бактерий. Изученные ассоциации могут быть использованы при биоремедиации нефтезагрязненных почв Кызылординской области.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нефть, нефтепродукты, микроорганизмы-деструкторы, ассоциации микроорганизмов, биосовместимость.

*Автор для переписки. E-mail: gulzhan_aspan@mail.ru

МҰНАЙМЕН ЛАСТАНҒАН ТОПЫРАҚТЫ БИОРЕМЕДИАЦИЯЛАУ ҮШІН МИКРОАҒЗАЛАРДЫҢ ҚАУЫМДАСТЫҚТАРЫ

А.Қ. САДАНОВ, б.ғ.д., профессор, ҚР ҰҒА академигі, «Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығының» бас директоры

Г.А. СПАНКУЛОВА*, экология және ауылшаруашылық микробиология зертханасының ғылыми қызметкері

О.Н. АУЭЗОВА, экология және ауылшаруашылық микробиология зертханасының ғылыми қызметкері

«Микробиология және вирусология ҒӨО» ҚР,
050010, Алматы қ., Бөгенбай батыр көшесі 105

Қызылорда облысы Құмкөл мұнай кен орының мұнаймен ластанған топырағынан мұнайды ыдырататын 12 микроағзалар бөлініп алынып және идентификацияланды. Олардың биосәйкестілігі зерттелді. Барлық дақылдар бір-бірімен төзімді болды. Таңдап алынған штамдардың негізінде Құмкөл мұнай кенінің мұнайын, сондай – ақ мазутты және дизельді отынды белсенді ыдыратуға қабілетті қауымдастықтар құрылды. Үш және төрт бактериядан тұратын екі қауымдастық белсенді болды. Зерттелген қауымдастықтар Қызылорда облысының мұнаймен ластанған топыраған биоремедиациялауда қолдануға болады.

НЕГІЗГІ СӨЗДЕР: мұнай, мұнайөнімдері, микроағзалар-деструкторлар, микроағзалар қауымдастығы, биосәйкестілік.

ASSOCIATIONS OF MICROORGANISMS FOR BIOREMEDIATION OF OIL CONTAMINATED SOIL

A.K. SADANOV, doctor of biological sciences, professor, academician NAS RK, Director General of the MLP «Research and Production Center of Microbiology and Virology»

G.A. SPANKULOVA*, Researcher of the laboratory of ecological and agricultural microbiology, Master Limited Partnership

O.N. AUEZOVA, Researcher of the laboratory of ecological and agricultural microbiology, Master Limited Partnership

«RPC of Microbiology and Virology»
Republic of Kazakhstan, 050010, Almaty, Bogenbai batyr street 105

From oil-contaminated soils of the Kumkol field of the Kyzylorda region, 12 microorganisms having with high oil destructive activity were isolated and identified, studied their biocompatibility. All cultures were tolerant of each other. Based on the selected strains, associations were compiled that could actively utilize the oil of the Kumkol field, as well as fuel oil and diesel fuel. The most active were two associations consisting of three and four bacteria. The associations studied can be used in bioremediation of oil-contaminated soils of Kyzylorda.

KEY WORDS: oil, oil products, microorganisms-destructors, associations of microorganisms, biocompatibility.

Загрязнение почв нефтью и нефтепродуктами, особенно в регионах интенсивной разработки месторождений углеводородного сырья, является одной из серьезных экологических проблем современного Казахстана. Рост добычи нефти сопровождается увеличением нагрузок на природные экосистемы. В первую очередь это негативно сказывается на химические, физические и биологические свойства почвы. Нефтяное загрязнение приводит к необратимым изменениям биологического равновесия и разнообразия. В результате разливов нефти почвы могут превращаться в типичные техногенные пустыни, в которых практически полностью подавляется жизнедеятельность биоты. В различных почвенно-климатических условиях концентрации нефтепродуктов, при которых почвы можно считать загрязненными, различны. Это зависит от сочетания многих факторов, таких как тип, состав и свойства почв, от вида и скорости распада нефти и нефтепродуктов, их токсичности, от способности конкретного типа почв к самоочищению [1–3]. Самоочищение почвы является сложным и относительно длительным биологическим процессом.

Среди различных способов, позволяющих снизить концентрацию нефтяного загрязнения в окружающей среде, наиболее перспективным, как в экологическом, так и в экономическом плане, является микробиологический метод. Он основан на использовании различных групп микроорганизмов, отличающихся повышенной способностью к биодegradации компонентов нефти и нефтепродуктов [4–6].

Сложность биодеструкции нефти микроорганизмами заключается в многокомпонентности и разнородности составляющих ее веществ, поэтому создание ассоциаций, состоящих из микроорганизмов, способных разрушать разные фракции нефти, безусловно, является перспективным направлением при биоремедиации.

Поиск и изучение новых перспективных казахстанских штаммов микроорганизмов, а также ассоциаций, созданных на их основе, будет способствовать созданию эффективных биопрепаратов, применение которых в биоремедиационных целях положительно скажется на оздоровлении экосистем нефтедобывающих регионов [7–9].

Цель работы – выделение почвенных аборигенных нефтеокисляющих микроорганизмов-деструкторов, создание на их основе активных ассоциаций, способных эффективно утилизировать нефть месторождения Кумколь, а также мазут и дизельное топливо.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования – активные штаммы нефтеокисляющих бактерий, выделенные из нефтезагрязненных почв месторождения Кумколь, Кызылординская область [10], а также сырая нефть этого месторождения, мазут и дизельное топливо.

Выделение нефтеокисляющих микроорганизмов-деструкторов проводили методом накопительных культур. В колбы Эрленмейера со 100 мл минеральной среды вносили по 10 г нефтезагрязненной почвы месторождения Кумколь и добавляли по 10 мл нефти этого же месторождения. Колбы помещали в термостатируемые шейкеры при температуре 28°C на 14 суток. После этого производили высев культуральной жидкости в чашки Петри с питательным агаром. Выросшие морфологически раз-

личные колонии проверялись на чистоту истощающим посевом и затем отсеивались на скошенный питательный агар.

Для определения видовой принадлежности выделенных культур изучали их морфологические, культуральные и физиолого-биохимические свойства [11]. Кроме того, была проведена молекулярно-генетическая идентификация этих культур методом секвенирования по Сенгеру [12].

Изучение биологической совместимости штаммов нефтеокисляющих бактерий-деструкторов проводили методом перпендикулярных штрихов [13]. Для этого культуры выращивали на агаризованной среде РПА (рыбо-пептонный агар). Исследуемую культуру бактерий наносили штрихом по центру чашки, а тест-культуры высевали перпендикулярно к штриху, через 3–5 дней определяли наличие или отсутствия антагонистических отношений между исследуемыми штаммами.

Для изучения деструкционной активности созданных ассоциаций использовали среду Ворошиловой-Диановой следующего состава (г/л): NH_4NO_3 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; KH_2PO_4 – 1,0; MgSO_4 – 0,2; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; NaCl – 10,0; FeCl_3 – следы; pH – 7,0–7,2.

В качестве единственного источника углеводорода в среду вносили 3%, 5% и 7% нефти и нефтепродуктов (мазут, дизельное топливо). Культивирование микроорганизмов проводили в колбах Эрленмейера, содержащих 100 мл среды, на круговом шейкере-встряхивателе (180 об/мин) при температуре 28°C в течение 14 суток. Количественное определение остаточного содержания нефти и нефтепродуктов в среде проводили гравиметрическим методом с использованием аналитических весов «ОНАУС» Explorer EX 124 (США) при экстрагировании хлороформом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из нефтезагрязненных почв месторождения Кумколь было выделено 84 углеводородокисляющие культуры. После проведения последовательного скрининга отобрано 12 наиболее активных изолятов. После идентификации выше указанными методами они были отнесены к следующим видам:

Rhodococcus sp. 1D/1

Gordonia sp. 12/5

Microbacterium arabinogalactanolyticum 12/6

Dietzia sp. 12/7

Dietzia sp. 13/4

Tessaracoccus sp. 13/8

Rhodococcus erythropolis 14/1

Pseudomonas sp. 14/2

Rhodococcus sp. 14/3

Arthrobacter sp. 15/3

Microbacterium sp. 16/1

Alcanovorax sp. 16/3

Известно, что штаммы, входящие в ассоциации, должны быстро расти, легко культивироваться, показывать высокую резистентность к поллютантам, а также

не являться патогенными. Все выделенные и отобранные нами штаммы отвечали этим требованиям.

При создании ассоциаций микроорганизмов необходимо учитывать характер взаимоотношений между микроорганизмами, который зависит от физиологических особенностей каждого конкретного штамма. При совместном культивировании микроорганизмы одного вида могут угнетать другие.

Высев изучаемых штаммов на чашки Петри со средой РПА перпендикулярными штрихами показал, что не было появления зон задержки роста или лизиса клеток. Т. е. все изучаемые штаммы не проявляли антагонизма и были толерантны друг к другу (рисунки 1). Это качество способствует их совместному культивированию.

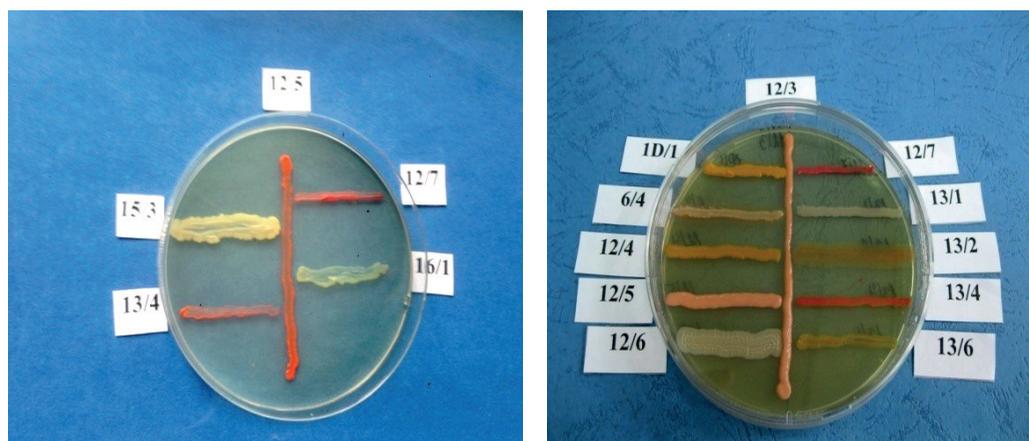


Рисунок 1 – Высев изучаемых штаммов методом перпендикулярных штрихов

Проверка деструкционной способности всех выделенных и отобранных отдельных штаммов показала, что все они активно утилизировали как нефть месторождения Кумколь, так и нефтепродукты [10].

Поскольку нефть является сложным комплексным субстратом, для наиболее эффективной очистки нефтезагрязненной почвы перспективным является использование ассоциаций микроорганизмов, состоящих из нескольких активных штаммов. После последовательного проведения подбора комбинаций изучаемых нефтеокисляющих микроорганизмов, состоящих из двух, трех и четырех культур было составлено девять ассоциаций.

Изучена деструкционная активность составленных ассоциаций при 3% содержании нефти, мазута и дизельного топлива (таблица 1).

Результаты показали, что степень деструкции нефти при этом составила 44,5–83,9%, мазута – 38,7–81,9%, дизельного топлива – 38,3–74,5%. Наибольшую активность проявили четыре ассоциации: 2, 4, 5 и 7. Остальные были менее активны. Ассоциация 2, состоящая из трех штаммов и ассоциация 4, состоящая из четырех штаммов утилизировали нефть и нефтепродукты примерно на одном уровне: нефть и мазут – свыше 80%, дизельное топливо – свыше 70% за 14 дней инкубирования. Утилизация нефти, мазута и дизельного топлива ассоциацией 5 составляла 78,1;

Таблица 1 – Деструкционная активность ассоциаций при 3% содержании нефти, мазута и дизельного топлива

№ № асс.	Ассоциации	Степень утилизации, %		
		нефть	мазут	ДТ
1	Gordonia sp. 12/5 + Microbacterium sp. 16/1 + Alcanovorax sp. 16/3	49,7	48,4	42,2
2	Rhodococcus sp. 1D/1 + Tessaracoccus sp. 13/8 + Dietzia sp. 13/4	82,8	81,8	70,1
3	Arthrobacter sp. 15/3 + Microbacterium arabinogalactanolyticum 12/6 + Rhodococcus sp. 14/3	47,8	39,1	51,7
4	Gordonia sp. 12/5 + Rhodococcus erythropolis 14/1 + Arthrobacter sp. 15/3 + Dietzia sp. 12/7	83,9	81,9	74,5
5	Dietzia sp. 12/7 + Tessaracoccus sp. 13/8 + Dietzia sp. 13/4	78,1	69,5	60,7
6	Gordonia sp. 12/5 + Microbacterium sp. 16/1 + Rhodococcus sp. 14/3 + Tessaracoccus sp. 13/8	58,7	53,3	47,2
7	Rhodococcus erythropolis 14/1 + Gordonia sp. 12/5	66,2	61,5	56,8
8	Rhodococcus sp. 1D/1 + Gordonia sp. 12/5 + Microbacterium arabinogalactanolyticum 12/6	50,9	41,2	42,8
9	Rhodococcus erythropolis 14/1 + Rhodococcus sp. 14/3 + Alcanovorax sp. 16/3	44,5	38,7	38,3
	Контроль	21,7	23,1	18

69,5 и 60,7%, а ассоциацией 7–66,2; 61,5 и 56,8% соответственно за этот же период времени. При этом естественная убыль нефти в среде составила 21,7%, мазута 23,1% и дизельного топлива 18%.

При дальнейшем повышении концентрации нефти и нефтепродуктов в среде исследовали только четыре наиболее активные ассоциации (2, 4, 5 и 7).

Исследования количественного потребления нефти и нефтепродуктов при 5% их содержании в среде показали, что утилизация нефти составила 63,4–82,2%, мазута – 58,2–78,3% и дизельного топлива – 47,1–72,5% (рисунки 2). Отмечено, что активность ассоциаций 2 и 4 при 5% загрязнении практически не изменилась и оставалась на том же уровне, что и при 3% загрязнении. Несколько снизилась активность ассоциаций 5 и 7 при инкубировании с дизельным топливом до 54,3 и 47,1 соответственно.

Более значительные изменения активности исследуемых ассоциаций произошли при увеличении концентрации нефти и нефтепродуктов при 7% содержании их в среде (рисунки 3). Деструкция нефти составила 58,7–78,0%, мазута 54,1–74,5% и дизельного топлива 44,1–67,1%. При 7% содержании нефти и нефтепродуктов в среде наиболее заметное снижение активности с увеличением концентрации отмечено при культивировании ассоциации 7. Под ее воздействием утилизация

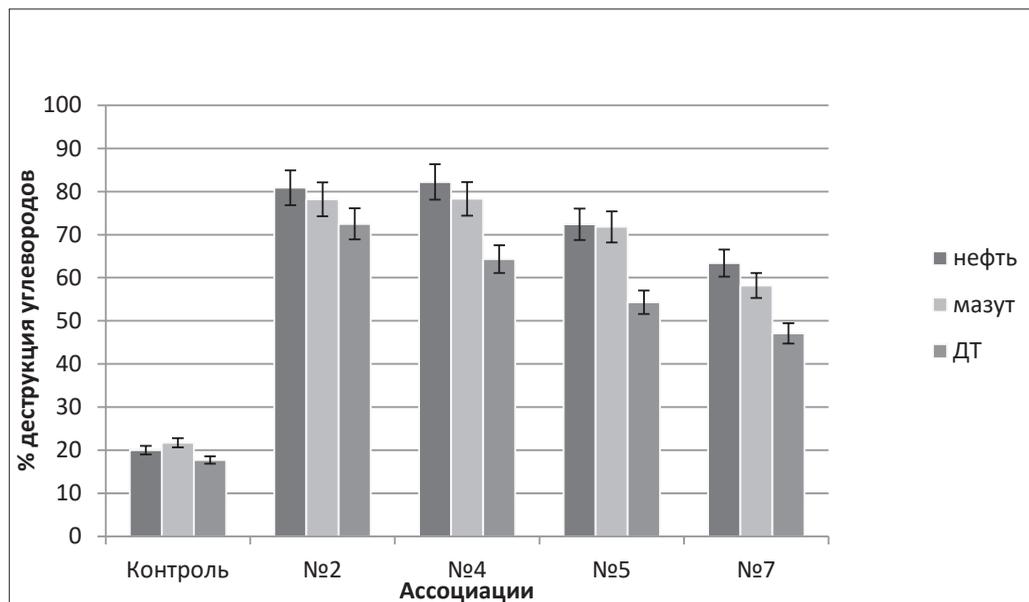


Рисунок 2 – Деструкционная активность ассоциаций при 5% содержании в среде нефти, мазута и дизельного топлива

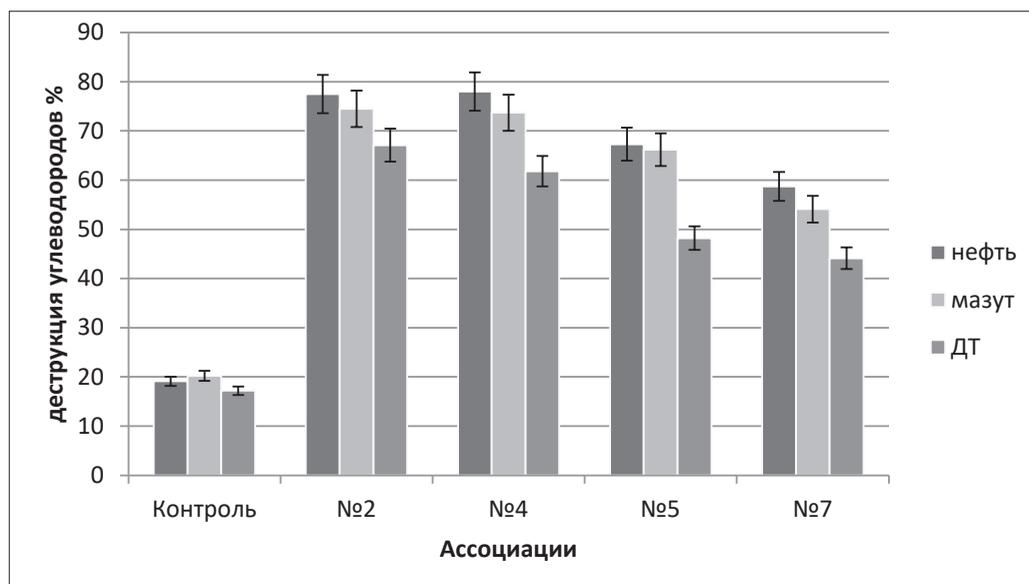


Рисунок 3 – Деструкционная активность ассоциаций при 7% содержании в среде нефти, мазута и дизельного топлива

нефти составила 58,7%, мазута 54,1% и дизельного топлива 44,1%. Наибольшую деструкционную активность, как и при 3% и 5% загрязнении показали ассоциации 2 и 4. Потребление нефти и мазута под их воздействием превышало 70%, а дизельного топлива 60%.

Таким образом, на основе выделенных из нефтезагрязненных почв Кызылординской области микроорганизмов-деструкторов составлены ассоциации, способные активно утилизировать нефть месторождения Кумколь, а также мазут и дизельное топливо. Наиболее эффективными были две ассоциации, состоящие из бактерий *Rhodococcus sp.* 1D/1 + *Tessaracoccus sp.* 13/8 + *Dietzia sp.* 13/4 и *Gordonia sp.* 12/5 + *Rhodococcus erythropolis* 14/1 + *Arthrobacter sp.* 15/3 + *Dietzia sp.* 12/7. Деструкция нефти и мазута при 3% и 5% их содержании в среде составляла свыше или около 80%, дизельного топлива свыше 70% за 14 суток культивирования. При увеличении нефти и нефтепродуктов до 7% активность этих ассоциаций снижается незначительно.

Научные разработки по биоремедиации почв Атырауской области в лаборатории экологической и сельскохозяйственной микробиологии ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии» позволили создать ряд биопрепаратов, способных эффективно восстанавливать нефтезагрязненные участки на этих территориях. Предложенные активные ассоциации микроорганизмов-деструкторов, выделенные из загрязненных почв месторождения Кумколь, позволят создать аналогичные препараты, способные устранять нефтезагрязнения в Кызылординской области, поскольку технологии с применением нефтеокисляющей микробиоты являются наиболее безопасными для окружающей среды. 

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Пиковский Ю.И., Геннадиев А.Н., Чернявский С.С., Сахаров Г.Н. Проблема диагностики и нормирования загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами // Почвоведение. – 2003. – № 9. – С. 1132–1140. [Pikovskij YU.I., Gennadiev A.N., Chernyavskij S.S., Saharov G.N. Problema diagnostiki i normirovaniya zagryazneniya pochv nef't'yu i nefteproduktami // Pochvovedenie. – 2003. – № 9. – С. 1132–1140.]
- 2 Трофимов С.Я., Аммосова Я.М., Орлов Д.С., Осипова Н.Н., Суханова Н.И. Влияние нефти на почвенный покров и проблема создания нормативной базы по влиянию нефтезагрязнения на почвы // Вестник Московского университета. Сер.17. Почвоведение. – 2000. – № 2. – С. 30–34. [Trofimov S.YA., Ammosova YA.M., Orlov D.S., Osipova N.N., Suhanova N.I. Vliyanie nef'ti na pochvennyj pokrov i problema sozdaniya normativnoj bazy po vliyaniyu neftezagryazneniya na pochvy // Vestnik Moskovskogo universiteta. Ser.17. Pochvovedenie. – 2000. – № 2. – С. 30–34.]
- 3 Яковлев А.С., Никулина Ю.Г. Экологическое нормирование допустимого остаточного содержания нефти в почвах земель разного хозяйственного назначения // Почвоведение. – 2013. – № 2. – С. 234–239. [Yakovlev A.S., Nikulina YU.G. Ekologicheskoe normirovanie dopustimogo ostatochnogo sodержaniya nef'ti v pochvah zemel' raznogo hozyajstvennogo naznacheniya // Pochvovedenie. – 2013. – № 2. – С. 234–239.]
- 4 Логинов О.Н., Н.Н. Силищев, Бойко Т.Ф., Галимзянова Н.Ф. Биотехнологические методы очистки окружающей среды от техногенных загрязнений. – Уфа: Гос. изд. научно-тех. литературы «Реактив», 2000. – 100 с. [Loginov O.N., N.N. Silishchev, Wojko T.F., Galimzyanova N.F. Biotekhnologicheskie metody ochistki okruzhayushchej sredy ot tekhnogennykh zagryaznenij. – Ufa: Gos. izd. nauchno-tekhn. literatury «Reaktiv», 2000. – 100 s.]

- sredy ot tekhnogennyh zagryaznenij. – Ufa: Gos. izd. nauchno-tekh. literatury «Reaktiv», 2000. – 100 s.]
- 5 Нуртдинова Л.А. Исследование процессов ремедиации нефтезагрязненных природных объектов с использованием биопрепарата «Ленойл»: дис. ... канд. биол. наук, Уфа, 2005. [Nurtdinova L.A. Issledovanie processov remediacii neftezagryaznennyh prirodnyh ob'ektov s ispol'zovaniem biopreparata «Lenojl»: dis. ... kand. biol. nauk, Ufa, 2005.]
 - 6 Das K., Mukherjee A. K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India 2007 *Bioresource Technol.* 2007. 98 (7), 1339–1345.
 - 7 Брянская А.В., Уварова Ю.Е., Слынько Н.М., Демидов Е.А., Розанов А.С., Пельтек С.Е. Теоретические и практические аспекты проблемы биологического окисления углеводородов микроорганизмами // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 18. – № 4/2. – С. 999–1012. [Bryanskaya A.V., Uvarova YU.E., Slyn'ko N.M., Demidov E.A., Rozanov A.S., Pel'tek S.E. Teoreticheskie i prakticheskie aspekty problemy biologicheskogo okisleniya uglevodorodov mikroorganizmami // Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii. – 2014. – Т. 18. – № 4/2. – С. 999–1012]
 - 8 Andreeva I.S., Emelianova E.K., Zagrebelnyi S.N., Ol'kin S.E., Reznikova I.K., Repin V.E. 2006 *Biotechnology in Russia* 1. – P. 57 – 69
 - 9 Fedorenko V.N., Serezhkin I.N., Lamova Y.A., Kniazyuk M.K., Netrusov A.I., Shestakov A.I. 2015. – *Biotechnologiya* 6. – P. 72 – 8.
 - 10 Спанкулова Г.А., Саданов А.К., Айткельдиева С.А., Ауэзова О.Н. Выделение и отбор микроорганизмов-деструкторов нефти и нефтепродуктов // Вестник НАН РК. – 2016. – № 3. – С. 56–60. [Spankulova G.A., Sadanov A.K., Ajtkel'dieva S.A., Auezova O.N. Vydelenie i otbor mikroorganizmov-destruktorov nefti i nefteproduktov // Vestnik NAN RK. – 2016. – № 3. – С. 56–60.]
 - 11 Егоров Н.С. Микробы антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. – М.: Высшая школа, 1965. – 176 с. [Egorov N.S. Mikroby antagonisty i biologicheskie metody opredeleniya antibioticheskoy aktivnosti. – М.: Vysshaya shkola, 1965. – 176 s.]
 - 12 Sanger F., Niclein S, Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Nat. Sci. USA.* – 1977. – Т. 74. – P. 5463–5467
 - 13 Практикум микробиологии / Под. ред. А.Н. Нетрусова. – М.: Academia, 2005. – 597 с. [Praktikum mikrobiologii / Pod. red. A.N. Netrusova. – М.: Academia, 2005. – 597 s.]