

УДК 504.062.4
МРНТИ 87.15.03

DOI: <https://doi.org/10.54859/kjogi108745>

Получена: 12.04.2024.

Одобрена: 27.08.2024.

Опубликована: 30.09.2024.

Оригинальное исследование

Исследование биотехнологического потенциала углеводородокисляющих бактерий из нефтезагрязнённых грунтов месторождения Узень

Д.М. Мақсұт, С.Х. Биджиева, М.А. Бисенова, Е.О. Аяпбергенов, В.В. Сабалдаш
Филиал КМГ Инжиниринг «КазНИПИМунайгаз», г. Актау, Казахстан

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Загрязнённые нефтью и нефтепродуктами грунты являются одной из значительных экологических проблем Западного Казахстана, и очистка таких грунтов приобретает исключительную актуальность. Среди всего спектра применяемых в настоящее время технологий (биологические, физические, химические), биологическая очистка грунтов, предполагающая микробиологическую рекультивацию углеводородокисляющими бактериями, является более экологичным и щадящим методом очищения грунтов. Одним из важных аспектов микробиологической рекультивации является применение эндомичных для обрабатываемой почвы бактерий, что гарантирует наиболее эффективную очистку почвы, поскольку бактерии в ней функционируют в относительно оптимальных для себя условиях. Уникальностью грунта Мангистауской области, в частности, прибрежных регионов, является высокая минерализация и низкая увлажненность, что способствовало формированию определенной, приспособленной к данным условиям микрофлоры.

Цель. Исследование направлено на поиск и выделение высокоэффективных углеводородокисляющих бактерий, которые являются аборигенами высокоминерализованных грунтов месторождения Узень.

Материалы и методы. В работе используются микробиологические культивирование аэробных бактерий на жидких и плотных средах в условиях (минерализация и температура), приближенных к условиям их природных экотопов, культивирование накопительных и чистых культур, микроскопирование, а также аналитические методы, такие как анализ химического состава воды, инфракрасная спектрометрия.

Результаты. Получены четыре накопительные культуры углеводородокисляющих аэробных бактерий, выделены три чистые культуры нефтеокисляющих галофильных бактерий, исследована их углеводородокисляющая эффективность на основе тяжелой, высоковязкой парафинистой нефти месторождения Узень.

Заключение. В работе получены активные накопительные культуры галофильных и умеренно термофильных углеводородокисляющих аэробных бактерий, характеризующиеся высоким биотехнологическим потенциалом, способные окислять широкий спектр углеводородов, в т.ч. высокомолекулярные полициклические и серосодержащие соединения, а также новые штаммы галофильных углеводородокисляющих бактерий, потенциал которых предстоит исследовать в дальнейшей работе. Исследованные культуры в течение короткого времени способствовали значительному эмульгированию нефти, меняя ее структуру, физические и химические свойства.

Ключевые слова: нефтезагрязнённый грунт, углеводородокисляющие бактерии, нефть, культивирование, нефтедеструкция.

Как цитировать:

Мақсұт Д.М., Биджиева С.Х., Бисенова М.А., Аяпбергенов Е.О., Сабалдаш В.В. Исследование биотехнологического потенциала углеводородокисляющих бактерий из нефтезагрязнённых грунтов месторождения Узень // Вестник нефтегазовой отрасли Казахстана. 2024. Том 6, №3. С. 112–123.
DOI: <https://doi.org/10.54859/kjogi108745>.

UDC 504.062.4
CSCSTI 87.15.03

DOI: <https://doi.org/10.54859/kjogi108745>

Received: 12.04.2024

Accepted: 27.08.2024.

Published: 30.09.2024.

Original article

Study of biotechnological potential of hydrocarbon-oxidizing bacteria from oil-contaminated soils of the Uzen oil field

Dinara M. Maksut, Salimat Kh. Bidzhiyeva, Miua A. Bissenova,
Yerbolat O. Ayapbergenov, Valentina V. Sabaldash

Branch of KMG Engineering KazNIPImunaigaz, Aktau, Kazakhstan

ABSTRACT

Background: Oil-contaminated soils are one of the significant environmental concerns in Western Kazakhstan. Cleaning soils from oil contamination is becoming extremely important. Biological soil treatment, which uses hydrocarbon-oxidizing bacteria for microbiological remediation, is a more environmentally friendly and delicate method of soil treatment than any other currently used technology (physical, chemical, biological). One of the important aspects of microbiological remediation is the use of bacteria endomimic to the treated soil. This guarantees the most effective soil purification, as the bacteria perform in relatively optimal conditions for themselves. The soil of the Mangistau region, especially the coastal regions, is distinctive due to its high mineralisation and low moisture content, which have helped to form a specific microflora that is adapted to these conditions.

Aim: The study aims to search and isolate highly effective hydrocarbon-oxidizing bacteria that are native to highly mineralized soils of the Uzen oil field.

Materials and methods: The research employs a variety of analytical techniques, including water chemistry analysis and infrared spectrometry, as well as the microbiological culture of aerobic bacteria on liquid and dense media in environments (temperature and salinity) that closely resemble their native ecotopes.

Results: Four enrichment cultures of hydrocarbon-oxidizing bacteria were obtained, and three pure cultures of oil-oxidizing bacteria were isolated. Their hydrocarbon-oxidizing efficiency has been studied. On the basis of heavy, extremely viscous paraffinic oil from the Uzen field, their hydrocarbon-oxidizing efficiency was examined.

Conclusion: In this study, active enrichment cultures of halophilic hydrocarbon-oxidizing bacteria as well as active accumulative cultures of halophilic and moderately thermophilic aerobic bacteria were obtained. These bacteria are capable of oxidising a wide range of hydrocarbons, including high-molecular polycyclic and sulfur-containing compounds. Their high biotechnological potential will be studied in further studies.

Keywords: *oil-contaminated soil; hydrocarbon-oxidizing bacteria; oil, cultivation; oil destruction.*

To cite this article:

Maksut DM, Bidzhiyeva SK, Bissenova MA, Ayapbergenov YO, Sabaldash VV. Study of biotechnological potential of hydrocarbon-oxidizing bacteria from oil-contaminated soils of the Uzen oil field. *Kazakhstan journal for oil & gas industry*. 2024;6(3):112–123. DOI: <https://doi.org/10.54859/kjogi108722>.

ӨОЖ 504.062.4
FTAХР 87.15.03

DOI: <https://doi.org/10.54859/kjogi108745>

Қабылданды: 12.04.2024

Мақұлданды: 27.08.2024.

Жарияланды: 30.09.2024.

Түпнұсқа зерттеу

Өзен кең орнының мұнаймен ластанған топырақтарынан көмірсутектікті тотықтырғыш бактериялардың биотехнологиялық әлеуетін зерттеу

Д.М. Мақсұт, С.Х. Биджиева, М.А. Бисенова, Е.О. Аяпбергенов, В.В. Сабалдаш
ҚМГ Инжиниринг «ҚазмұнайгазФЗЖИ» филиалы, Ақтау қаласы, Қазақстан

АННОТАЦИЯ

Негіздеу. Мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған топырақтар Батыс Қазақстанның маңызды экологиялық проблемаларының негізгі көздерінің бірі болып табылады, сондықтан мұндай топырақтарды мұнай ластануынан тазарту ерекше маңызға ие. Қазіргі уақытта қолданылатын технологиялардың (биологиялық, физикалық, химиялық) барлық спектрінің ішінде көмірсутекті тотықтырғыш бактериялармен микробиологиялық ремедиацияны көздейтін топырақты биологиялық тазарту анағұрлым экологиялық және жұмсақ әдіс болып табылады. Микробиологиялық рекультивацияның маңызды аспектілерінің бірі - өңделетін топыраққа эндемикалық бактерияларды қолдану, бұл топырақты тиімді тазартуға кепілдік береді, өйткені ондағы бактериялар өздері үшін салыстырмалы түрде оңтайлы жағдайда жұмыс істейді. Маңғыстау облысының, атап айтқанда жағалау аймақтарының топырағының бірегейлігі жоғары минералдану және төмен ылғалдылық болып табылады, бұл осы жағдайларға бейімделген белгілі бір микрофлораның қалыптасуына ықпал етті.

Мақсаты. Зерттеу Өзен кен орнының жоғары минералданған топырағына тән жоғары тиімді көмірсутекті тотықтырғыш бактерияларды іздеуге және бөліп алуға бағытталған.

Материалдар мен әдістер. Жұмыста аэробты бактерияларды сұйық және қатты орталарда олардың табиғи экотоптарының жағдайына жақын жағдайларда (минералдану және температура) микробиологиялық өсіру, кумулятивтік және таза дақылдарды өсіру, микроскопия, сондай-ақ аналитикалық әдістер, мысалы, химиялық судың құрамын талдау, инфрақызыл спектрометрия қолданылады.

Нәтижелері. Өзен кен орнындағы ауыр, тұтқырлығы жоғары парафинді мұнай негізінде көмірсутекті тотықтырғыш аэробты бактериялардың төрт аккумуляциялық өсіндісі алынды, мұнай тотықтыратын галофильді бактериялардың үш таза өсіндісі бөлініп, олардың көмірсутекті тотықтырғыштық тиімділігі зерттелді.

Қорытынды. Бұл жұмыста көмірсутектердің кең спектрін, соның ішінде жоғары молекулалы полициклді және құрамында күкірті бар қосылыстарды тотықтыруға қабілетті, жоғары биотехнологиялық әлеуетімен сипатталатын галофильді және орташа термофильді көмірсутектерді тотықтырғыш бактериялардың белсенді жинақ түрлері, сондай-ақ галофильді көмірсутектердің жаңа штамдары алынды, олардың әлеуеті кейінгі жұмыста зерттеледі. Зерттелген өсінділер қысқа уақыт ішінде оның құрылымын, физикалық және химиялық қасиеттерін өзгерту арқылы мұнайдың айтарлықтай эмульсиялануына ықпал етті.

Негізгі сөздер: мұнаймен ластанған топырақ, көмірсутекті тотықтырғыш бактериялар, мұнай, культивация, мұнайды жою.

Дәйексөз келтіру үшін:

Мақсұт Д.М., Биджиева С.Х., Бисенова М.А., Аяпбергенов Е.О., Сабалдаш В.В. Өзен кең орнының мұнаймен ластанған топырақтарынан көмірсутектікті тотықтырғыш бактериялардың биотехнологиялық әлеуетін зерттеу // Қазақстанның мұнай-газ саласының хабаршысы. 2024. 6 том, №3. 112–123 б.

DOI: <https://doi.org/10.54859/kjogi108745>.

Введение

Одной из важнейших экологических проблем Мангистауской области являются негативные последствия нефтедобычи в регионе: выбросы нефти в процессе бурения скважин, техногенные аварии на месторождении с возникновением открытых фонтанов, разливы при транспортировках, течь в нефтепроводах и пр. Попадая таким образом в окружающую среду, нефть способствует загрязнению литосферы, гидросферы и атмосферы.

Нефть, попавшая в грунт, становится причиной нарушения физико-химических свойств почвы, нарушается естественная гидратация и аэрация почвы, что приводит к нарушению или даже гибели экосистем. Загрязнённый грунт может служить источником вторичного загрязнения: испарение нефти приводит к попаданию в воздух токсичных соединений, при этом в почве остаются наиболее сложные высокомолекулярные соединения, и отдельные фракции способны просачиваться в глубину грунта. Это приводит к заражению токсинами грунтовых вод, которые могут быть разнесены на большие расстояния и попасть в моря, реки и озера, что повлечёт отравление природных экосистем, нарушая их естественное функционирование. Потенциальную опасность для живых организмов также представляет накопление в них полициклических ароматических соединений нефти, которые имеют канцерогенное и мутагенное влияние [1].

В настоящее время применяется ряд технологий для ликвидации разливов нефти и нефтепродуктов, а именно термические, механические, химические и биологические методы [2]. Одним из наиболее эффективных и экологически безопасных методов является биологическая рекультивация загрязнённых грунтов, которая подразумевает применение методов биостимуляции, предполагающих активацию аборигенной микрофлоры обрабатываемых грунтов и методов биоаугментации, основанных на применении бактериальных препаратов на основе углеводородокисляющих бактерий (далее – УОБ).

Мангистауская область характеризуется резко континентальным и засушливым климатом, продолжительным и жарким летом (температура может достигать 42–47°C). Осадков выпадает крайне мало и преимущественно в тёплое время года. Среднегодовое количество осадков не превышает 130–180 мм. Почва представлена солончаками с содержанием соли до 2–4%, с очень низким содержанием влаги и органических соединений. Особенности региона способствуют формированию уникальной микрофлоры почв, а попадание в почву нефти и нефтепродуктов стимулирует бактерии к развитию специфических свойств, таких как устойчивость к токсичным

соединениям нефти и способность к окислению её компонентов [3].

Поскольку проблема углеводородного загрязнения окружающей среды в настоящее время имеет колоссальные масштабы, охватывая все нефтедобывающие регионы, поиск и изучение новых УОБ является на сегодняшний день сферой фокусировки фундаментальных и прикладных исследований с различной спецификацией.

Настоящая работа посвящена изучению углеводородокисляющей микрофлоры высокоминерализованных, загрязнённых нефтью грунтов месторождения Узень, а также поиску наиболее активных УОБ и исследованию их прикладного потенциала.

Материалы и методы

Объектами исследований были образцы нефти и нефтезагрязнённых грунтов, отобранные на месторождении Узень. Образцы грунта отбирали стерильно в чашки Петри и хранили в холодильнике при температуре 4°C.

Нефтезагрязнённый грунт имел комковатую структуру, обильно пропитанную нефтью, цвет варьировал от светло- до тёмно-коричневого. Некоторые образцы характеризовались глинистой структурой.

Микробиологические методы.

Накопительные культуры УОБ получали путём инкубирования образцов нефтезагрязнённого грунта в аэробные жидкие среды с минерализацией от 20 г/л до 55 г/л. Минерализацию среды варьировали в соответствии с условиями эксперимента. В 100 мл среды вносили 1 г образца грунта и 1 мл нефти. Культивирование проводилось при температуре 40°C в стационарном состоянии и на шейкере (100 об/мин) в течение 5–10 сут.

Для культивирования УОБ применялась среда следующего состава: K_2HPO_4 – 1,5 г/л, KH_2PO_4 – 0,75 г/л, NH_4Cl – 1 г/л, KCl – 0,1 г/л, $MgSO_4 \cdot H_2O$ – 0,1 г/л, $CaCl_2 \cdot H_2O$ – 0,02 г/л. Насыщенным раствором NaOH или 10%-ным раствором HCl доводили pH среды до 7.

Через 12 сут произвели пересев наиболее активных накопительных культур на свежие жидкие питательные среды. На тринадцатые сутки провели микроскопирование образцов грунта.

Для выделения чистых культур наиболее активные накопительные культуры из жидкой среды пересевали на плотные питательные среды с нефтью. При этом использованы среды с минерализацией 20 и 55 г/л, состав которых приведен выше, с добавлением агара (20 г/л). На плотные питательные среды в чашках Петри вносили нефть и распределяли стерильным шпателем по поверхности.

Затем 0,1 мл посевного материала вносили в чашки и распределяли методом истощающего штриха. Чашки культивировали в термостате в течение 5–7 сут при температуре 40°C. Затем из отдельных колоний производили пересев на чистую плотную питательную среду с нефтью с целью выделения чистых культур. Далее проводили микроскопирование чистых культур.

Аналитические методы

Приготовление водной вытяжки из почвы. Пробы почвы массой 30 г, взвешенные с погрешностью не более 0,1 г, помещали в конические колбы. К пробам приливали по 150 мл дистиллированной воды. Почву с водой перемешивали в течение 3 мин и оставляли на 5 мин для отстаивания [4].

Измерение pH почвы. Для измерения pH почвы также готовили водную вытяжку из почвы. При этом часть почвенной суспензии, полученной из водной вытяжки, объемом 15–20 мл сливали в химический стакан вместимостью 50 мл и использовали для измерения pH.

Настройку pH-метра проводили по трём буферным растворам с pH 4,01, 6,86 и 9,18, приготовленным из стандарт-титров. Показания прибора считывали не ранее, чем через 1,5 мин после погружения электродов в измеряемую среду, после превращения дрейфа измерительного прибора. Во время работы настройку прибора периодически проверяли по буферному раствору с pH 6,86.

Определение ионов карбоната и бикарбоната. Для определения ионов карбоната и бикарбоната отбирали пипеткой 20 мл водной вытяжки в химический стакан и помещали стакан на магнитную мешалку. Бюретку заполняли раствором серной кислоты концентрации 0,02 моль/л. В пробу вытяжки погружали электродную пару и кончик дозирующей трубки бюретки. Пробу титровали до pH 8,3, и регистрировали расход кислоты. Затем продолжали титрование до 4,4. По окончании титрования регистрировали расход кислоты по бюретке. Массовую долю карбонат-иона и бикарбонат-иона вычисляли расчётным методом.

Определение иона хлорида аргентометрическим методом по Морю. Ионы хлорида титровали в водной вытяжке раствором азотнокислого серебра, который образует с ионом хлорида труднорастворимое соединение. Для установления конечной точки титрования в раствор добавляли хромат калия, который образует с избытком ионов серебра осадок, вызывающий переход окраски раствора от желтой к красно-бурой.

Весовое определение иона сульфата. Ионы сульфата осаждали раствором хлористого бария и взвешивали прокаленный

остаток. Для предотвращения осаждения карбоната, фосфата бария и других соединений анализируемую пробу подкисляли соляной кислотой [7].

Определение ионов натрия. С помощью пламенного фотометра определяли интенсивность излучения атомов определяемого элемента. Натрий определяют по аналитическим линиям 589,0 и 589,9 нм.

Определение кальция и магния комплексометрическим методом. Последовательным комплексометрическим методом ионы кальция титровали при pH 12,5–13, ионы магния – при pH около 10, с использованием кислотного хрома тёмно-синего в качестве металлоиндикатора.

Экстракция и разделение нефти на фракции. В 100 мл культуральной жидкости вносили 10 мл n-гексана, которым отмывали нефть со стенок колб и экстрагировали остатки нефти с поверхности жидкой среды. Через 10 мин отбирали 5 мл верхней безводной фракции углеводородов (далее – УВ). С помощью делительной колонки с силикагелем очищали нефть от механических примесей. Гексан служил подвижной фракцией при фильтрации. Отфильтрованные образцы оставляли при комнатной температуре для полного выпаривания гексана, после чего анализировали на инфракрасном (далее – ИК) спектрометре Фурье Agilent Cary 630 FTIR (США) в спектральном диапазоне ZnSe 4000–600 см⁻¹.

Результаты и обсуждения

Результаты исследования физико-химических свойств нефтезагрязнённых грунтов

Химический анализ позволил выявить во всех образцах грунта высокое содержание ионов кальция и сульфата. Образец 4737 характеризовался также высоким содержанием натрий- и хлорид-ионов. В целом образец 4727 имел наибольшую минерализацию среди анализируемых образцов – около 5%. Все образцы имели слабощелочное значение pH (табл. 1).

Результаты стационарного культивирования

При стационарном культивировании наблюдалось образование бактериальной плёнки на границах фаз «нефть – вода». Плёнка грязно белого цвета, хорошо сохраняла структуру и разрушалась при взбалтывании.

Накопительная культура 4737, полученная на питательной среде с минерализацией 20 г/л, визуально оказывала наиболее значительное влияние на нефть: наблюдали изменение консистенции внесённой нефти, которая хо-

Таблица 1. Физико-химические свойства образцов грунта
Table 1. Physico-chemical properties of soil samples

Показатель Parameter	Ед. изм. УоМ	Образцы / Samples		
		4375	5012	4737
Натрий-ион Sodium ion	ммоль в 100 г почвы mmol per 100 g of soil	17,8	6,8	59,9
Магний-ион Magnesium ion		2,8	1,8	4,5
Кальций-ион Calcium ion		29,0	41,0	47,8
Сульфат-ион Sulphate ion		14,0	10,4	22,2
Хлорид-ион Chloride ion		7,7	12,2	35,5
Бикарбонат ионы Bicarbonate ions		1,3	1,1	1,1
Карбонат ионы Carbonate ions		не обн.	не обн.	не обн.
Суммарная минерализация Total mineralisation		Мг-экв/100 г почвы mg-eq per 100 g soil	2049,0	1997,9
pH водной вытяжки pH of aqueous extract	-	7,5	7,6	7,6

не обн. / n.f. – не обнаружено / not found.

рошо смывалась со стенок, наблюдалось образование мелкодисперсной фракции нефти и остатков неокисленной нефти (рис. 1).

При визуальной оценке накопительных культур 4375 и 5012 значительных изменений в структуре нефти не наблюдали. Нефть со стенок не смывалась. Поскольку культура преимущественно была сформирована в плёнку, мутность среды была невысока.

Результаты культивирования на шейкере

Накопительная культура 4737, полученная при минерализации 55 г/л, демонстрировала значительную, визуально оцениваемую деструкцию нефти. Нефть хорошо смывается со стенок. Существенная часть нефти была представлена в дисперсном состоянии. Наблюдается значительное помутнение среды. Культура светло-коричневого оттенка (рис. 2).

Накопительная культура 5012 имела слабую мутность бежевого цвета, нефть хорошо смывалась со стенок колбы. В среде наблюдалась мелкая дисперсия светлых оттенков. На поверхности среды отмечались сильно деградированные остатки нефти (рис. 3).

Накопительная культура 4375 имела светло-коричневый цвет. Нефть хорошо смывалась со стенок. В среде отмечались крупные остатки деградированной нефти. Среда имела существенную мутность. Наличие мелкодисперсной нефти не отмечалось (рис. 4).

Микроскопирование образцов

Образец 5012. Наблюдаются кокки и короткие, прямые палочки.

Образец 4737 на 20 г/л. Наблюдаются короткие, прямые, неподвижные палочки, кокки, подвижные короткие палочки, длинные и изогнутые палочки, короткие, толстые, двоянные палочки.

Образец 4375. Наблюдаются кокки.

Образец 4737 на 55 г/л. Наблюдаются прямые палочки, кокки, длинные, тонкие, прямые палочки.

Результаты посева

Наиболее активные культуры (4737 на 20 г/л и 55 г/л, 4375 на 55 г/л, 5012 на 55 г/л) были посеяны на чистые жидкие питательные среды с нефтью с целью более эффективной концентрации УОБ. Инкубирование проводили в течение 7 сут при температуре 40°C (рис. 1–4).

Образец 4737 на 55 г/л. Нефть практически полностью смывалась со стенок колбы, остатки присутствовали в среде в виде мелкой дисперсии. Среда светло-коричневого цвета.

Образец 4737 на 20 г/л. Нефть практически полностью смывалась со стенок колбы. При взбалтывании в среде наблюдается мелкая дисперсия нефти. Среда тёмно-коричневого цвета. На поверхности среды наблюдаются комки тяжёлых фракций нефти.

Образец 4375 на 55 г/л. Нефть практически полностью смылась со стенок колбы. Среда коричневого цвета. Комков на поверхности среды не наблюдается. Нефть в виде мелкой дисперсии растворена в среде.

Образец 5012. Нефть плохо отмылась от стенок. Наблюдается слабое помутнение среды. Нефть крупными комками распределена на поверхности среды.

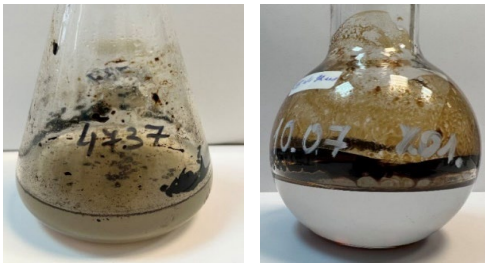
Результаты посева на плотные питательные среды

Посев произведен методом серийных разведений. Культуры выедали нефть в виде зон просветления.

Образец 4375 (II) на 55 г/л. На чашках отмечалось появление зон просветления на нефти. Кроме того, сплошным газоном выросли мелкие прозрачные колонии. Наблюдаются мелкие коричневые колонии округлой формы с ровным краем.

Образец 4737 (II) на 20 г/л. Отмечались выеденные островки на нефти. Видны мелкие, прозрачные, круглые колонии.

Образец 5012 (II) на 55 г/л. Наблюдалось формирование сплошного газона мелких, прозрачных колоний. Также присутствовали колонии светло-коричневого цвета в малых количествах и колонии, похожие на пузырьки на нефти.

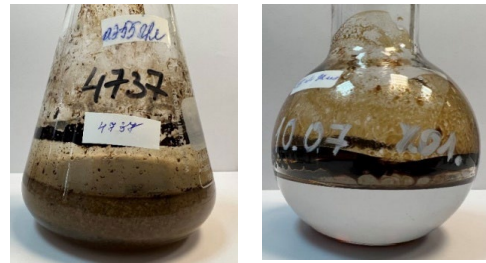


а)

б)

Рисунок 1. Накопительная культура 4737, полученная на питательной среде с минерализацией 20 г/л
Figure 1. Enrichment culture of 4737 obtained on nutrient medium with salinity 20 g/l

а) опытный вариант / trial;
 б) контрольный вариант / reference



а)

б)

Рисунок 2. Накопительная культура 4737, полученная при минерализации 55 г/л
Figure 2. Enrichment culture of 4737 obtained with salinity 55 g/l

а) опытный вариант / trial;
 б) контрольный вариант / reference

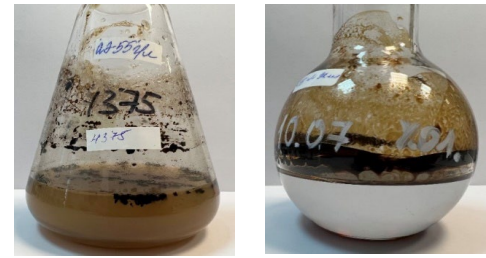


а)

б)

Рисунок 3. Накопительная культура 5012, полученная при минерализации 55 г/л
Figure 3. Enrichment culture of 5012 with salinity 55 g/l

а) опытный вариант / trial;
 б) контрольный вариант / reference

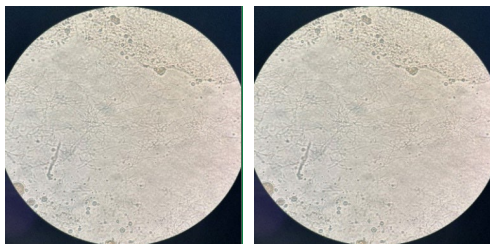


а)

б)

Рисунок 4. Накопительная культура 5012, полученная при минерализации 55 г/л
Figure 4. Enrichment culture of 5012 with salinity 55 g/l

а) опытный вариант / trial;
 б) контрольный вариант / reference



а)

б)

Рисунок 5. Чистая культура углеводородокисляющих бактерий, полученная на плотной среде, штамм 4375
Figure 5. Pure culture of hydrocarbon-oxidising bacteria obtained on dense medium, strain 4375

а) колонии чистых культур / pure growth colonies;
 б) нитчатые и палочковидные клетки в световом микроскопе с фазово-контрастным устройством при увеличении $\times 1000$ / filamentous and rod-shaped cells in a light microscope with a phase-contrast device at $\times 1000$ magnification

Выделение чистой культуры

Из накопительной культуры 4375 выделили мелкие колонии светлых и темных оттенков, округлой формы с ровным краем.

Из накопительной культуры 5012 выделили мелкие колонии темных оттенков, округлой формы с ровным краем. При микроскопировании выделенных чистых культур наблюдали ветвящиеся, палочковидные и нитевидные бактерии (рис. 5).

Результаты спектрометрического анализа состава нефти

Посредством ИК-спектроскопического исследования показано соотношение оптических плотностей основных полос поглощения, которое является содержательным показателем для сопоставления продуктов исследования. Таким образом, в анализируемых образцах показано присутствие ароматических УВ, нафтенов, изо- и н-парафинов, а также серо-

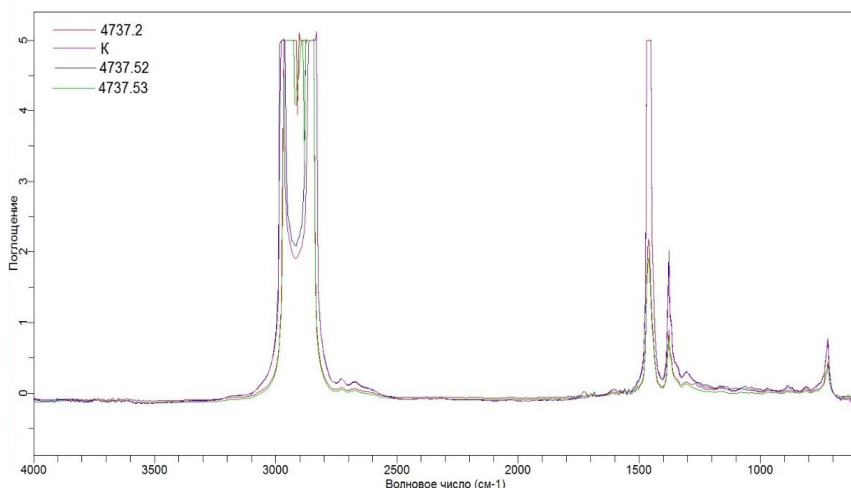


Рисунок 6. ИК-спектры нефти месторождения Узень, экстрагированной из накопительных культур 4737/2, 4737/52 и 4737/53

Figure 6. Infrared spectra of the Uzen field oil extracted from enrichment cultures 4737/2, 4737/52 and 4737/53

Контроль (К) – стерильная нефть / sterile oil

и кислородсодержащих гетерокомпонентов. Содержание выявленных групп соединений определялось с помощью спектральных коэффициентов.

Согласно полученным данным, наиболее интенсивные полосы поглощения наблюдаются при 1304, 1377, 1468 и 1600 см^{-1} . Интенсивные полосы поглощения при 1377 и 1468 см^{-1} относятся к валентным деформационным колебаниям CH_2 - и CH_3 - групп в парафиновых и циклопарафиновых УВ и характеризуют степень разветвленности парафинов. Также отмечено наличие высококонденсированных сильнозамещенных ароматических структур (2981, 1600 см^{-1}), в т.ч. с короткоцепочечными алкильными заместителями (720 см^{-1}), и насыщенных фрагментов (2980, 1468 и 1377 см^{-1}). Наличие пиков с максимумами при 2980 и 2870 см^{-1} демонстрирует наличие соединений с алкильными заместителями ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$) (рис. 6).

Необходимо отметить отсутствие интенсивности полос валентных колебаний групп $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ и $\text{C}-\text{OH}$ в области 1000...2000 см^{-1} и карбонильных групп в области 1600 см^{-1} . Кислородсодержащие соединения в области спектров 1100...1300 см^{-1} и ароматических структур при волновом числе 1030 см^{-1} не фиксируются в изучаемых спектрах.

Особенностью ИК-спектров образцов является достаточно высокая интенсивность полос поглощения в области 3000...2800 см^{-1} , отвечающих колебаниям связей в функциональных группах $\text{O}-\text{H}$, $\text{N}-\text{H}$, $\text{C}=\text{O}$, $\text{S}=\text{O}$,

что указывает на фрагменты фенола, карбазола, карбоновых кислот и сульфоксида (табл. 2).

На основе доступных литературных данных [4, 5] можно сделать вывод о том, что отношения оптических плотностей основных полос поглощения являются объективными и информативными показателями для образцов нефти. В ходе исследования были определены следующие показатели: ароматичность $\text{C1} = \text{D1600}/\text{D721}$, окисленность $\text{C2} = \text{D1465}/\text{D1705}$, осерненность $\text{C3} = \text{D1036}/\text{D1465}$, алифатичность и разветвленность $\text{C4} = (\text{D721} + \text{D1377})/\text{D1600}$ и $\text{C5} = \text{D1377}/\text{D1465}$ соответственно. Коэффициенты C1 и C4 характеризуют соотношение ароматических и n-парафиновых УВ, C5 – степень разветвленности парафиновых цепей УВ, т.е. строение парафиновых фрагментов (табл. 3).

По данным табл. 2–3 видно, что распределение ароматических фрагментов в исследуемых пробах нефти неравномерно. Исследуемые образцы обогащены ароматическими соединениями, концентрированными циклановыми би-, три- и полициклическими структурами. Отмечена схожесть по структурному составу бициклических УВ в пробах К и 4737/53. В образце №4737/5 бициклические ароматические УВ отсутствуют. Схожую картину по содержанию трициклических ароматических УВ имели образцы К, 4737/2, 4737/52. Среди исследуемых образцов сумма фенантроновых ароматических УВ выше в образце 4737/53 и значительно ниже в 4737/5. Распределение

Таблица 2. Структурные группы нефти, экстрагированной из опытных и контрольных образцов
Table 2. Structural groups of oil extracted from trial and reference samples

Спектральные коэффициенты / Spectral factors			Образцы / Samples				
			Контроль	4737/2	4375/5	4737/52	4737/53
Ароматические УВ Aromatic HCs	нафталины naphthalenes	1610/720	0,070	0,085	0,000	0,079	0,081
		1610/1460	0,012	0,017	0,000	0,012	0,017
		875/720	0,091	0,090	0,000	0,110	0,038
		875/1460	0,015	0,018	0,000	0,017	0,008
		1030/1460	0,010	0,016	0,000	0,017	0,004
	фенантрены phenanthrenes	875/750	0,625	0,129	0,000	0,572	0,063
		815/750	0,097	0,124	0,015	0,122	0,081
		815/1460	0,016	0,025	0,004	0,018	0,017
	полициклические polycyclic	815/875	1,067	1,375	0,000	1,108	2,133
		750/720	0,145	0,697	0,682	0,192	0,605
Нафтенy Naphthenes.	циклогексан cyclohexane	750/1460	0,024	0,142	0,192	0,029	0,126
		970/720	0,073	0,085	0,000	0,097	0,035
Степень разветвленности алканов Degree of branching of alkanes		970/1460	0,012	0,017	0,000	0,015	0,007
Алифатичность Aliphaticity		1380/1465	0,060	0,073	0,054	0,062	0,068
		(720+1380)/1600	19,431	15,868	0,000	17,767	16,469
Серосодержащие соединения Sulphur compounds.	C-S-связь C-S bond	1080/720	0,079	0,164	0,000	0,132	0,030
		1080/1460	0,013	0,034	0,000	0,020	0,006
	сульфоны sulphones	1160/720	0,115	0,164	0,021	0,139	0,071
		1160/1460	0,019	0,034	0,006	0,021	0,015
		1310/720	0,366	0,355	0,193	0,410	0,327
		1310/1460	0,060	0,073	0,054	0,062	0,068
Осернённость Sulphur content		1030/1465	0,010	0,016	0,000	0,017	0,004
C=O связь C=O bond		1700/1460	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000

Таблица 3. Характеристика образцов нефти после инкубирования в присутствии УВ-окисляющих культур бактерий

Table 3. Parameters of oil samples after incubation in the presence of HC-oxidising bacterial cultures

Образец Sample	Спектральные коэффициенты / Spectral factors				
	C1	C2	C3	C4	C5
	ароматичность aromaticity	окисленность oxidation	осернённость sulphur content	н-парафины n-paraffins	разветвлённость degree of branching
	D_{1600}/D_{720}	D_{1710}/D_{1465}	D_{1030}/D_{1465}	$(D_{720}+D_{1380})/D_{1600}$	D_{1380}/D_{1465}
Контроль	0,070	0,000	0,010	46,397	0,373
4737/2	0,085	0,009	0,016	35,500	0,415
4375/5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,445
4737/52	0,079	0,000	0,017	46,517	0,407
4737/53	0,081	0,000	0,004	37,719	0,424

суммы полициклических ароматических УВ также равномерно: близкие значения у образцов 4737/2, 4375/5 и 4737/53, низкие у образцов К и 4737/52.

Наименьшее содержание ароматических УВ отмечено у образца 4375/5, высокое у образца 4737/53 и близкое у образцов К, №4737/2 и №4737/52.

По результатам изучения структурно-групповых составов отмечено присутствие нафтенов в виде циклоалканов. Состав и концентрация нафтенов в исследуемых образцах распределены неравномерно. Наблюдается отсутствие их в образце 4375/5, высокие концентрации и близкие значения в образцах 4737/2 и 4737/52.

Все исследуемые образцы содержат серосодержащие гетерокомпоненты, которые

также распределены неравномерно. при этом распределение сульфонов, меркаптанов и тиофенов равномерно распределены во всех образцах, кроме 4375/5, что говорит о высоком УВ-окислительном потенциале культуры (табл. 3).

Полученные спектры по окисленности указывают на отсутствие окисленных УВ как в контроле, так и в опытных образцах (табл. 3), за исключением культуры 4737/2, в которой детектировано незначительное содержание окисленных УВ. Данное явление относится к степени окислительных изменений в её составе, которое может быть вызвано воздействием кислорода или других окислительных процессов и реагентов.

Заключение

На сегодняшний день исследования, ориентированные на решение экологических проблем, относятся к числу актуальнейших направлений научного познания.

В настоящей работе исследованы загрязнённые нефтью образцы грунта, которые имели плотную комковатую структуру тёмно-коричневого цвета, густо пропитанную тяжёлыми фракциями нефти. Образцы грунта были отобраны в местах, где происходят периодические свежие разливы нефти. Образцы характеризовались высокой минерализацией, что объясняется особенностями климата и гидрогеологией региона. Помимо исторических предпосылок, на минерализацию образцов может влиять вторичное засоление почв, когда в результате разлива нефти в почву попадает и морская вода, используемая для поддержания пластового давления при добыче. Так, образец 4737, который характеризовался большей минерализацией, может свидетельствовать о том, что разлив добываемых жидкостей (нефти и морской воды) в месте отбора данного образца происходил длительное время или с большей частотой, следовательно, и остатки нефти в данном образце более застарелые или содержатся в большем количестве. Высокая минерализация и значительное содержание высокомолекулярных, токсичных и трудно-деградируемых соединений нефти резко сокращает спектр живых организмов, способных выжить и адаптироваться в описанных условиях.

Микробиологическими методами получены четыре накопительные культуры УОБ, которые обладали разной активностью окисления нефти. За 7 суток культивирования при температуре 40°C наблюдалась значительная деструкция нефти, которая была очевидна даже визуально. Из полученных активных накопительных культур выделены три чистые культуры нефтеокисляющих бактерий, имевших форму ветвящихся палочек и нитей: два штамма из накопительной культуры 4375 и один штамм из культуры 5012. Новые штаммы в дальнейшем предстоит идентифицировать

ДОПОЛНИТЕЛЬНО

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным

и более детально исследовать их физиологические и биохимические особенности.

Остатки частично деградированной нефти были экстрагированы из накопительных культур и после предварительной подготовки проанализированы методом ИК-спектromетрии. Анализ показал, что наибольшая углеводородокисляющая активность характерна для культуры 4375/5, выращенной при минерализации 55 г/л и температуре 40°C. Нефть, экстрагированная из этого образца, не содержала нафталинов, нафтенов и алифатических фракций, что свидетельствует об их полном окислении УОБ. Также отмечаются значительные изменения во фракциях серосодержащих соединений и фенантронов, которые только частично подверглись бактериальному окислению.

Накопительная культура 4737 (были получены несколько вариаций этой культуры – 4737/2, 4737/52, 4737/53, выращенных при разной минерализации) не показала существенной активности. Незначительные изменения отмечались только во фракциях нафталинов и серосодержащих соединений.

Известно, что разветвлённые изопарафины имеют более сложную структуру и имеют боковые УВ-цепи. Такая структура делает эти соединения менее доступными для ферментных систем УОБ, вследствие чего, данная группа УВ либо совсем не подвергается биологическому окислению, либо окисляется в очень незначительной степени.

Таким образом, в работе получены активные накопительные культуры галофильных и умеренно термофильных УОБ, характеризующихся высоким биотехнологическим потенциалом, которые способны окислять широкий спектр УВ, в т.ч. высокомолекулярные полициклические и серосодержащие соединения.

Продолжается работа с чистыми культурами галофильных УОБ, выделенными в рамках настоящей работы. Запланированные детальные исследования будут направлены на выявление биотехнологического потенциала новых штаммов УВ-окисляющих бактерий.

критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: Мақсұт Д.М. – проведение исследований, сбор и обработка экспериментальных данных, написание рукописи; Биджиева С.Х. – концепция и дизайн исследования, проведение

исследования, интерпретация результатов, редактирование рукописи; Бисенова М.А. – проведение исследования, детальный анализ и интерпретация результатов; Аяпбергенев Е.О. – детальный анализ и интерпретация результатов исследования; Сабалдаш В.В. – проведение исследования.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. All authors made a substantial contribution to the conception

of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work. The greatest contribution is distributed as follows: Dinara M. Maksut – conducting research, collecting and processing experimental data, writing the manuscript; Salimat Kh. Bidzhieva – conception and design of the study, conduct of the study, interpretation of results, editing of the manuscript; Miua A. Bissenova – conducting the trial, analysing and interpreting the results in detail; Yerbolat O. Ayapbergenov – detailed analysis and interpretation of study results; Valentina V. Sabaldash – conducting the trial.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Орлов Д.С., Малинина М.С., Мотузова Г.В., и др. Химическое загрязнение почв и их охрана. Москва : Агропромиздат, 1991. 303 с.
2. Салимгереев М.Ж., Аманязов Б.Т., Идрисова Э.К., Атемова Г.Т. Современные технологии (методы) рекультивации нефтезагрязнённых почв // Сборник научных трудов ТОО «КМГ Инжиниринг». 2020, № 1. С. 513–520.
3. Муканов Е., Имашева Д. Раздел охраны окружающей среды (РООС) в составе Биологического обоснования «Организация садкового рыбного хозяйства (СРХ) на закрепленном рыбохозяйственном участке: Каспийское море, 6-ой рыбохозяйственный район, участок №2 от местности Татьяна до залива Кендирли». Кокшетау: ТОО «АРЕКЕТ-2050».
4. Абдрафикова И.М., Каюкова Г.П., Вандюкова И.И. Исследование состава асфальтенов и продуктов их фракционирования методом ИК-Фурье спектроскопии // Вестник Казанского технологического университета. 2011. №9. С. 179–183.
5. Аяпбергенев Е.О., Ахметов А.Ф. Состав и структурные характеристики компонентов нефтебитуминозной породы месторождения Карасызь-Таспас // Башкирский химический журнал. 2016. Т. 23, №2. С. 20–25.

REFERENCES

1. Orlov DS, Malinina MS, Motuzova GV, et al. Khimicheskoye zagryazneniye pochv i ikh okhrana. Moscow: Agropromizdat; 1991. 303 p. (In Russ).
2. Idrissova EK, Artemova GT. Sovremennyye tekhnologii (metody) rekul'tivatsii neftezagryaznennykh pochv. *Sbornik nauchnykh trudov KMG Engineering LLP*. 2020;1:513–520. (In Russ).
3. Mukanov E, Imasheva D. Razdel ohrany okruzhayushchey sredy (ROOS) v sostave Biologicheskogo obosnovaniya "Organizatsiya sadkovogo rybnogo hozyajstva (SRH) na zakreplennom rybohozyaystvennom uchastke: Kaspiskoye more, 6-oy rybohozyajstvennyy rayon, uchastok №2 ot mestnosti Ta'yanka do zaliva Kendirli". Kokshetau: AREKET-2050 LLP. (In Russ).
4. Abdrafikova IM, Kayukova GP, Vanduykova II. Issledovaniye sostava asfal'tenov i produktov ikh fraktsionirovaniya metodom IK-Fur'e spektroskopii. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*. 2011;9:179–183. (In Russ).
5. Ayapbergenov EO, Akhmetov AF. Sostav i strukturnyye kharakteristiki komponentov neftebituminoznoy porodyy mestorozhdeniya Karasyaz'-Taspas. *Bashkir Chemical Journal*. 2016;23(2):20–25.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

***Мақсұт Динара Мақсұтқызы**
 ORCID [0000-0002-1906-0498](https://orcid.org/0000-0002-1906-0498)
 e-mail: d.maksut@kmge.kz
Биджиева Салимат Хасановна
 канд. биол. наук
 ORCID [0000-0002-7599-114X](https://orcid.org/0000-0002-7599-114X)
 WoS Researcher ID: AAG-8177-2021
 Scopus Author ID: 25947284600
 elibrary 7756-8208
 e-mail: s.bidzhieva@kmge.kz

AUTHORS' INFO

***Dinara M. Maksut**
 ORCID [0000-0002-1906-0498](https://orcid.org/0000-0002-1906-0498)
 e-mail: d.maksut@kmge.kz
Salimat Kh. Bidzhieva
 Cand. Sc. (Biology)
 ORCID [0000-0002-7599-114X](https://orcid.org/0000-0002-7599-114X)
 WoS Researcher ID: AAG-8177-2021
 Scopus Author ID: 25947284600
 elibrary 7756-8208
 e-mail: s.bidzhieva@kmge.kz

Бисенова Миуа Аллабердыевна

канд. биол. наук

ORCID [0000-0002-9117-0931](https://orcid.org/0000-0002-9117-0931)e-mail: m.bisenova@kmge.kz.**Аяпберенов Ерболат Озарбаевич**ORCID [0000-0003-3133-222X](https://orcid.org/0000-0003-3133-222X)

elibrary 8911-5755

e-mail: e.ayapbergenov@kmge.kz.**Сабалдаш Валентина Валерьевна**ORCID [0009-0004-0158-1852](https://orcid.org/0009-0004-0158-1852)e-mail: v.sabaldash@kmge.kz.**Miua A. Bissenova**

Cand. Sc. (Biology)

ORCID [0000-0002-9117-0931](https://orcid.org/0000-0002-9117-0931)e-mail: m.bisenova@kmge.kz.**Yerbolat O. Ayapbergenov**ORCID [0000-0003-3133-222X](https://orcid.org/0000-0003-3133-222X)

elibrary 8911-5755

e-mail: e.ayapbergenov@kmge.kz.**Valentina V. Sabaldash**ORCID [0009-0004-0158-1852](https://orcid.org/0009-0004-0158-1852)e-mail: v.sabaldash@kmge.kz.

*Автор, ответственный за переписку/Corresponding Author