

УДК 581.1.

Г.К. Кайырманова, А.А. Жубанова, А.К. Ерназарова,  
Г.Ж. Абдиева, Н.Ш. Акимбеков, А.М. Баимбетова, Ж. Мустапаева,  
Р. Амангалиева

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Республика Казахстан, г. Алматы

### **Изучение способностей микроорганизмов для биоремедиации отходов нефтедобычи**

Выделены из отходов нефтедобычи полигона-накопителя месторождения «Жанажол» Актюбинской области устойчивые к высоким концентрациям нефти микроорганизмы, изучены нефтеэмульгирующая активность и биостойкость к буровым растворам перспективных коллекционных и аборигенных культур углеводородокисляющих бактерий, для создания на их основе биопрепаратов для нивелирования действия нефтедобычи на окружающую среду.

**Ключевые слова:** отходы нефтедобычи, буровые растворы, замазученный грунт, биоремедиация, ассоциация-деструктор, углеводородокисляющие микроорганизмы.

Г.К. Кайырманова, А.А. Жубанова, А.К. Ерназарова, Г.Ж. Абдиева, Н.Ш. Акимбеков,  
А.М. Баимбетова, Ж. Мустапаева, Р. Амангалиева

### **Мұнайды өндіру қалдықтарын биоремедиациялау үшін микроорганизмдердің қабілеттіліктерін зерттеу**

Ақтөбе облысы «Жанажол» кен орнының жинақтаушы-полигонының мұнай қалдықтарынан мұнайдың жоғары концентрациясына тұрақты микроорганизмдер бөліп алынды. Мұнай шығару қалдықтарының қоршаған ортаға әсерін жою мақсатында биопрепараттар жасау үшін перспективті коллекционды және аборигенді көмірсутек тотықтырушы бактерия дақылдарының бұрғылау ерітіндісіне қатысты биотұрақтылығы және мұнай эмульгирлеуші белсенділігі зерттелді.

**Түйін сөздер:** мұнай қалдықтары, бұрғылау ерітінділері, мазутталған грунт, биоремедиация, ассоциация-деструктор, көмірсутек тотықтырушы микроорганизмдер.

G.Kairmanova, A. Zhubanova, A. Ernazarova, G. Abdieva, N.Akimbekov, A. Baimbetova,  
Zh. Mustapaeva, R. Amangalieva

### **Investigation of microorganisms' abilities for bioremediation of oil production waste**

Microorganisms that resistance to the high concentration of petroleum is allocated from oil production waste of the Zhanazhol oilfield, Aktobe area and their oil emulsifying activity are investigated. Perspective collection and native cultures of petroleum oxidizing bacteria, biostable to brown solutions used for creation on their basis of biological products for leveling of oil production on environment.

**Keywords:** waste oil, brown solutions, contaminated soil, bioremediation, association destructor, hydrocarbon-oxidizing microorganisms.

При эксплуатации нефтяных месторождений образуются отходы, основную массу которых составляют нефтяные шламы, буровые растворы и замазученный грунт, которые вывозятся на специальные природоохранные сооружения

полигоны-накопители отходов, образующихся при нефтедобыче [1, 2].

В западных районах Казахстана нефтедобывающие предприятия относительно молоды – срок их эксплуатации не более 25-30 лет,

вследствие чего проблемы, создаваемые накопленными отходами, не были так остры и решались строительством одного, двух шламо-накопителей. На сегодняшний день наступил критический момент, когда только в Актюбинской области имеются 14 полигонов по размещению отходов добычи углеводородного сырья, занимающих значительные территории, и потому не только заметно снижающие площади хозяйственно-значимых пахотных и пастбищных земель, но и являющиеся вторичным источником загрязнения окружающей среды. Это связано с тем, что нефтешламы, буровые растворы сами являются источником длительного загрязнения атмосферы, почвы, грунтовых и поверхностных вод. Влияние отходов бурения на природные объекты не обязательно может проявляться в токсическом эффекте на биосферу, оно способно выражаться в нарушении экологического равновесия биотопов различных трофических уровней, что приводит к нарушению естественных биологических и химических процессов. Обитатели экосистем, подвергаясь токсическому действию нефтепродуктов, способны аккумулировать их в своих тканях, затем углеводороды по пищевым цепям могут передаваться в организм человека (например, канцерогенные полициклические компоненты нефти) [3-5].

Наиболее перспективным методом очистки почв и акваторий от загрязнений нефтью и нефтепродуктами является биотехнологический метод. Основным преимуществом этого метода является использование углеводородоксилирующих микроорганизмов [6, 7].

Литература по замазученному грунту затрагивает, как правило, микробиологические аспекты биоремедиации, но не собственно замазученного грунта, как концентрированного комплекса специфических загрязнений, соответственно микрофлоры. Вместе с тем создание биотехнологии, направленной на детоксикацию и утилизацию замазученного грунта, предполагает исследование микробиологического статуса этой антропогенной экосистемы, поскольку наиболее приспособленными к специфическому для экосистеме загрязнителю являются представители аборигенной микрофлоры, создание препарата – нефтедеструктора требует выделения активных углеводородоксилирующих микроорганизмов из загрязненных почв и водоемов, изучения их свойств [8-10].

Целью исследований явилось выделение различных штаммов микроорганизмов – нефтедеструкторов из 7 проб нефтяных отходов полигона-накопителя месторождения «Жаназол» Актюбинской области: замазученный грунт, буровые сточные воды, буровой шлам, отобранных на территории 4-х действующих карт полигона-накопителя (июнь, 2012 г.) и отбор из них активных штаммов микроорганизмов – нефтедеструкторов, обладающих нефтедеструктивной и эмульгирующей активностями, а также оценка их биостойкости для включения их в ассоциацию штаммов – деструкторов нефтяных углеводородов.

Для выделения активных углеводородоксилирующих микроорганизмов, определение их количественных, качественных и ростовых характеристик использовались пробы сырой нефти месторождения «Жаназол» со следующими физико-химическими характеристиками: легкая – плотность 823,7-918,3 кг/м<sup>3</sup> при температуре 200° С, среднесернистая – 0,4-1%, среднепарафинистая – 4,7-8,7%, пластовая температура 63-940° С, а также образцы следующих твердых и жидких отходов полигона-накопителя нефтяного месторождения «Жаназол»:

1. Буровые сточные воды с нефтью (карта №1) – БВН-1
2. Буровой шлам старый (карта №2) – БШС-2
3. Буровые сточные воды (карта №3) – БВН-3
4. Буровой шлам после очистки (карта №2) – БШО
5. Замазученный грунт (карта №4) – ЗГ-4
6. Буровой шлам новый (карта №4) – БШН-4
7. Буровой шлам с цементом новый (карта 4) – БШН(ц)-4

Для определения качественного состава микроорганизмов применялись диагностические селективные питательные среды.

Активные углеводородоксилирующие культуры были получены в виде накопительной культуры микроорганизмов на синтетической среде Е-8, где в качестве селективного фактора и единственного источника углерода в среде являлась нефть в концентрациях 70% и 80%. Инкубацию проводили в течение 30 дней при 29°С в качалочных условиях (220 об/мин). При появлении мути и изменении окраски среды производили последовательные пересевы из среды накопления на синтетическую агаризованную среду Е-8

с нефтью, откуда затем выделяли чистые микроорганизмы – нефтедеструкторы.

Способности выделенных микроорганизмов образовывать поверхностно-активные вещества оценивали по индексу эмульгирования и эмульгирующей активности. Для оценки поверхностно-активных свойств микроорганизмов используется показатель эмульгирующей активности, определение которого основано на свойстве ПАВ образовывать эмульсию при встряхивании культуральной жидкости микроорганизмов с углеводородами или нефтью. Индекс эмульгирования штаммов определяли методом Купера, где в качестве гидрофобной фазы для эмульгирования использовали нефть, бензол, гексан, бензин и дизельное топливо.

Для определения эмульгирующей способности исследуемых бактериальных штаммов их культивировали на минеральной среде в течение суток. Для получения супернатанта культуральной жидкости ее центрифугировали при 6000 об/мин в течение 15 минут. После чего к 5 мл исследуемого супернатанта в качестве гидрофобного субстрата добавляли 5 мл углеводородов и встряхивали в течение 10 минут. Изменение индекса эмульгирования определяли через 24 ч. как величину отношения высоты эмульсионного слоя к общей высоте жидкости в пробирке и выражали в процентах.

Оценку биостойкости культур микроорганизмов в отношении буровых растворов проводили в течение 15-20 дней при 29<sup>o</sup>C в качалочных условиях (220 об/мин) по следующим показателям: оптическая плотность проб и количественный учет микробных клеток методом Коха.

В экспериментах использовались 24-48-часовые культуры выделенных микроорганизмов-деструкторов и 24-часовые коллекционные культуры. Эксперименты проведены в 4-5 повторностях.

Проведена визуальная характеристика образцов проб. Выявлено, что из 7 проб – 5 проб относятся к твердой фракции (замазученный грунт и буровой шлам) и 2 – к жидким фракциям (буровой раствор) отходов нефтедобычи. Следует отметить, что пробы с карт №1 (буровой раствор) и №4 (замазученный грунт) – имеют резкий нефтяной запах, с явным присутствием маслянистой фракции нефти, тогда как пробы с карт № 2 и №3 – имеют слабый бензиновый запах, цвет – темно-коричневый, структура – су-

песчаная.

В ходе изучения микробиологических количественных и качественных характеристик проб полигона-накопителя выявлено, что общее количество микроорганизмов в пробах буровых сточных вод, замазученным грунте и буровом шламе составило  $37 \times 10^8$  кл/мл,  $36,5 \times 10^8$  кл/мл и  $285 \times 10^8$  кл/мл, соответственно. Как видно, количество микроорганизмов в пробах буровых сточных вод и замазученного грунта на порядок ниже, чем в пробах бурового шлама.

В исследуемых пробах выявлены следующие группы микроорганизмов: актиномицеты, спорообразующие микроорганизмы, грибы, нитрификаторы, денитрификаторы.

Для выявления из исследуемых проб микроорганизмов, обладающих высокой углеводородокисляющей активностью, использовался метод выделения накопительных культур с нефтью. Далее накопительная нефтеокисляющая культура микроорганизмов пересевалась на плотную среду МПА для получения чистых углеводородокисляющих микроорганизмов.

Из проб буровых сточных вод, бурового шлама и замазученного грунта получены 6 нефтеокисляющие накопительные культуры и обозначены нами как: БВН-1, БСВ-3, БШ-2, БШ-4, БШЦ-4, ЗГ-4.

Из полученных накопительных культур выделены 11 нефтеокисляющих бактериологически чистых культур микроорганизмов и обозначены нами как: БВН-1, БВН-2, БШС-1, БШС-2, БШН-1, БШН-2, БШН-3, БШН-4, БШН(ц), ЗГ-1, ЗГ-2.

Важным свойством, обуславливающим способность бактерий усваивать углеводороды, является продукция биоПАВ, которые диспергируют нефтепродукты и увеличивают биодоступность углеводородов для микроорганизмов. Нами проведен поиск микроорганизмов-продуцентов биоэмульгаторов нефти и нефтепродуктов – дизельного топлива, бензола, гексана и бензина среди следующих коллекционных культур углеводородокисляющих микроорганизмов: *Bacillus cereus* Б1, *Bacillus subtilis* Т1, *Pseudomonas mendocina* Н3, *Pseudomonas alcaligenes* Н10, *Pseudomonas aerogenosa*.

Известно, что культуры, имеющие индекс эмульгирования выше 50%, считаются перспективными продуцентами биоПАВ. Установлено, что у выделенной нами культуры *Pseudomo-*

*nas aerogenosa* наблюдаются высокие значения индекса эмульгирования на двух используемых субстратах: на дизельном топливе – 57%, нефти – 55%.

Остальные 4 культуры имеют высокий индекс эмульгирования только в отношении одного субстрата, так *Ps.mendocina* НЗ в отношении бензола (60%), тогда как этот показатель на нефти, гексане, бензине и дизельном топливе равен 9%, 10%, 37% и 37%, соответственно, что свидетельствует о способности этой культуры активно утилизировать только бензол.

Полученные результаты коррелируют с данными изучения эмульгирующей активности (оптическая плотность) изучаемых культур: *Bacillus cereus* Б1, *Bacillus subtilis* Т1, *Pseudomonas mendocina* НЗ, *Pseudomonas alcaligenes* Н10, *Pseudomonas aerogenosa*. Так, высокой эмульгирующей активностью обладает культура *Pseudomonas aerogenosa*, которая имеет высокий индекс эмульгирования двух субстратов.

Проведена оценка биостойкости в отношении буровых растворов 13 культур микроорганизмов, обладающих высокой нефтеокисляющей и эмульгирующей активностями, отобранных из:

кафедральной коллекции – *Pseudomonas alcaligenes* Н10, *Pseudomonas aerogenosa*;

аборигенных микробных культур – БВН-1, БВН-2, БШС-1, БШС-2, БШН-2, БШН-3, БШН-4, БШН(ц), ЗГ-1, ЗГ-2.

Выявлено, что наибольшую активность в накоплении биомассы на буровых растворах показывают следующие культуры микроорганизмов: из коллекционных – *Pseudomonas aerogenosa*, аборигенных культур – БВН-1, БВН-2, ЗГ-1, БШН-1.

Таким образом, проведен поиск микроорганизмов-продуцентов биоэмульгаторов углево-

дородов нефти среди 5 коллекционных культур углеводородоокисляющих микроорганизмов. На основании этих результатов выявлена культура *Pseudomonas aerogenosa*, обладающая высоким индексом эмульгирования нефти (55%) и дизельного топлива (57%), что является показателем способности бактерий продуцировать биоПАВ для диспергирования нефтепродуктов и, тем самым, увеличивать биодоступность углеводородов для микроорганизмов.

Из проб буровых сточных вод, бурового шлама и замазученного грунта получены 6 накопительных нефтеокисляющих культур микроорганизмов, обозначенных нами как: БВН-1, БСВ-3, БШ-2, БШ4, БШЦ-4, ЗГ-4.

Из полученных 6 нефтеокисляющих накопительных культур выделены 11 бактериологически чистых культур микроорганизмов, обозначенных нами как: БВН-1, БВН-2, БШС-1, БШС-2, БШН-1, БШН-2, БШН-3, БШН-4, БШН(ц), ЗГ-1, ЗГ-2.

Проведена оценка биостойкости в отношении буровых растворов 13 углеводородоокисляющих культур – кандидатов микроорганизмов, из которых 2 – из кафедральной коллекции и 11 – аборигенные микробные культуры, выделенные из проб бурового шлама, буровых сточных вод и замазученного грунта. Выявлено, что наибольшую активность в накоплении биомассы на буровых растворах показывают следующие 5 культур: *Pseudomonas aerogenosa*, БВН-1, БВН-2, ЗГ-1, БШН-1, которые будут использованы в дальнейших экспериментах как микроорганизмы-кандидаты для конструирования активной углеводородоокисляющей микробной ассоциации-деструктор отходов нефтедобычи полигона-накопителя «Жаназол» Актюбинской области.

## Литература

- 1 Ягафарова Г.Г. Инженерная экология в нефтегазовом комплексе. - Уфа: Изд. УГНТУ, 2007. – 334 с.
- 2 Бобович Б.Б. Транспортирование, сжигание и захоронение отходов: учебное пособие. – М.: М-во общ и проф. образования РФ, Моск. гос. индустр. университет, 1998. – 235с.
- 3 Информационно-аналитический отчет по контрольной и правоприменительной деятельности Актюбинской экологической инспекции за 2010 год / Министерство охраны окружающей среды Республики Казахстан. Тобыл-Торгайский департамент экологии. – Актюбе, 2010. – 200 с.
- 4 Кураков А.В., Тыныбаева Т.Г. Мониторинг загрязнения почв и насыпных грунтов площадок с оборудованием на газо-нефтяном месторождении Северные Бузачи (Казахстан) Доклады Московского общества испытателей природы (МОИП), 2007. - Т. 40. - С. 50-60.

5 Тыныбаева Т.Г. Микробиологический мониторинг нефтезагрязненных почв Казахстана Экологическая токсикология: Мониторинг и биологическая реабилитация загрязненных нефтью и нефтепродуктами территорий. Научно-практическое совещание. Астрахань, 30 сентября 2002. - М.: МАКС Пресс, 2002. - 35 с.

6 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.

7 Жубанова А.А., Кайырманова Г.К., Ернарарова А.К. Использование ассоциации на основе синезеленых водорослей для очистки замазученного грунта // Материалы международной научной конференции «Актуальные проблемы альгологии, микологии и гидробиологии». - Ташкент, 2009. - С. 243-245.

8 Шигаева М.Х., Мукашева Т.Д., Сыдыкбекова Р., Бержанова Р. Разработка лабораторного регламента по использованию новых штаммов-деструкторов для биоремедиации нефтезагрязненных почв // Промышленная собственность. - 2002. - №8. - С. 205-209.

9 Жаров О.А. Современные методы переработки нефтешламов // Экология производства. - 2004. - №5. - С. 43-51.

10 Жаров О.А. Современные методы переработки нефтешламов // Экология производства. - 2004. - №5. - С. 43-51.

### References

1 Jagafarova G.G. Inzhenernaja jekologija v neftegazovom komplekse. - Ufa: Izd. UGNTU, 2007. – 334 s.  
2 В.В. Bobovich Transportirovanie, szhiganie i zahoronenie othodov: Uchebnoe posobie. M-vo obshh i prof. obrazovaniya RF, Mosk. gos. industr. universitet, 1998. – 235s.

3 Informacionno-analiticheskij otchet po kontrol'noj i pravoprimenitel'noj deja-tel'nosti Aktjubinskoy jekologicheskoy inspekcii za 2010 god / Ministerstvo ohrany okruzhajushhej sredy Respubliki Kazahstan. Tobyl-Torgajskij departament jekologii. – Aktobe, 2010. – 200 s.

4 Kurakov A.B., Tynybaeva T.G'. Monitoring zagryazneniya pochv i nasypnyh gruntov ploshhadok s oborudovaniem na gazo-neftjanom mestorozhdenii Severnye Buzachi (Kazahstan) Doklady Moskovskogo obshhestva ispytatelej prirody (MOIP), 2007, t.40, S.50-60.

5 Тыныбаева Т.Г. Микробиологический мониторинг нефтезагрязненных почв Казахстана Экологическая токсикология: Мониторинг и биологическая реабилитация загрязненных нефтью и нефтепродуктами территорий. Научно-практическое совещание. Астрахань, 30 сентября 2002, М.: МАКС Пресс, 2002. - 35 с.

6 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.

7 Жубанова А.А., Кайырманова Г.К., Ернарарова А.К. Использование ассоциации на основе синезеленых водорослей для очистки замазученного грунта // Материалы международной научной конференции «Актуальные проблемы альгологии, микологии и гидробиологии». - Ташкент, 2009. - С. 243-245.

8 Шигаева М.Х., Мукашева Т.Д., Сыдыкбекова Р., Бержанова Р. Разработка лабораторного регламента по использованию новых штаммов-деструкторов для биоремедиации нефтезагрязненных почв // Промышленная собственность. - 2002. - №8. - С. 205-209.

9 Жаров О.А. Современные методы переработки нефтешламов // Экология производства. - 2004. - №5. - С. 43-51.

10 Жаров О.А. Современные методы переработки нефтешламов // Экология производства. - 2004. - №5. - С. 43-51.