- Н.П., Юран С.И., Владыкин И.Р., Баженов В.А. // Аграрная наука - сельскому хозяйству. материалы Национальной научно-практической конференции. ФГБОУ ВО Ижевская ГСХА . 2018. С. 40-52.
5. Кондратьева Н.П. Система автоматизированного мониторинга инженерных систем на объектах АПК / Кондратьева Н.П., Попугаев А.И. // ТРАДИЦИОННАЯ И ИННОВАЦИОННАЯ НАУКА: ИСТОРИЯ, СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ, ПЕРСПЕКТИВЫ. сборник статей Международной научно-практической конференции. 2020. С. 22-27.
6. Кондратьева Н.П. Применение цифровых технологий для автоматизации процесса облущения / Кондратьева Н.П., Большин Р.Г., Краснолуцкая М.Г. // Scitechnology. 2020. № 22. С. 12-15.

Кайырманова Г.К., Шаймерденова У.Т., Ерназарова А.К.
Изучение адсорбционной активности микроорганизмов, выделенных из
нефтепластовых вод

*НИИ Проблем экологии
(Казахстан, Алматы)*

doi: 10.18411/lj-09-2020-29

idsp: lj-09-2020-29

Аннотация

В результате изучения адсорбционной активности 2-х ассоциаций микроорганизмов, обладающих высокими нефтедеструктивными и нефтеэмульгирующими активностями, показано, что адсорбционная активность ассоциаций выше, чем монокультур. Выявлено, что оптимальной навеской сорбента (древесных опилок) для сорбции постоянной концентрации клеток ассоциаций-деструкторов ($d=0,5-0,6$ ед.) является 1 г. Установлено, что показатель десорбции клеток с поверхности носителя находится в пределах 9-10 %. Получены иммобилизованные биокатализаторы на основе двух ассоциаций микроорганизмов: *Pseudomonas aeruginosa* D6 : *Bacillus licheniformis* SR1 и *P. aeruginosa* D6 : *B. licheniformis* SR1 : *Bacillus sp.* D1X с прочным прикреплением микробных клеток выше 50 %.

Ключевые слова: микроорганизмы-деструкторы, иммобилизация, адсорбция, нефтепластовые воды, биоочистка

Abstract

As a result of studying the adsorption activity of 2 associations of microorganisms with high oil-destructive and oil-emulsifying activities, it was shown that the adsorption activity of associations is higher than monostrains. It has been found that the optimal suspension of the sorbent (wood sawdust) for sorption of a constant concentration of association-destructor cells ($d=0.5-0.6$ units) is 1 g. It was established that the desorption rate of cells from the carrier surface is in the range of 9-10 %. Immobilized biocatalysts were obtained based on two associations of microorganisms: *Pseudomonas aeruginosa* D6 : *Bacillus licheniformis* SR1 and *P. aeruginosa* D6 : *B. licheniformis* SR1 : *Bacillus sp.* D1X with strong attachment of microbial cells above 50 %.

Keywords: microorganisms-destructors, immobilization, adsorption, oil reservoir water, bio-cleaning

На современном этапе развития технологии добычи, транспортировки, хранения и переработки нефти образуются большие объемы отходов, представляющие собой нефтяные шламы, буровые химреагенты, попутные воды, сырую нефть и нефтепродукты [1, 2]. Бурение скважин при нефтегазодобыче нарушает естественную целостность почвенно-грунтовой толщи и может сопровождаться подъемами на поверхность подстилающих пород, в составе которых присутствуют минерализованные воды. Со временем увеличивается объем попутной воды, которая находится в пластах-

коллекторах, подстилающих нефтяные залежи. В связи с интенсификацией добычи нефти и газа сопутствующие воды могут являться одним из источников загрязнения окружающей среды [3, 4]. Попадание пластовой воды в поверхностные водные объекты и на почвы наносит существенный вред окружающей среде, поскольку в естественных условиях вода с таким насыщенным химическим составом присутствует только в глубокозалегающих подземных горизонтах [5].

Перспективным методом восстановления нефтезагрязненных почв и грунтов является использование биологических методов для успешного проведения которой требуется создание микробных препаратов на основе микроорганизмов, обладающих высокой нефтеокисляющей активностью [6]. Для микробиологического метода (метода биохимической деструкции нефти) выделяются штаммы аборигенных активизированных микроорганизмов, которые отбираются из подземных вод месторождения с наличием загрязнения для биологической очистки подземных вод от нефти и нефтепродуктов

Эффективность микробных клеток, можно увеличить прикреплением к твердым носителям, при этом иммобилизованные микроорганизмы-деструкторы нефтяных углеводородов, обладают преимуществом перед свободными клетками. Большую практическую значимость имеет тот факт, что в качестве носителя можно применять материалы природного происхождения, которые, могут служить не только носителем, но и выполнять функции разрыхлителя и источника азота и фосфора.

Целью данного исследования явилось изучение адсорбционной активности 2-х ассоциаций микроорганизмов, ранее отобранных по показателям нефтедеструктирующей и эмульгирующей активностей.

В работе использованы 3 культуры микроорганизмов, выделенные из заводненных нефтепластовых вод месторождения «Акинген» и, полученные на их основе, 2 ассоциации, обладающие высокими нефтедеструктивными и нефтеэмульгирующими активностями:

- 1) *Pseudomonas aeruginosa* D6 : *Bacillus licheniformis* SR1;
- 2) *P. aeruginosa* D6 : *B. licheniformis* SR1 : *Bacillus sp.* D1X.

Культуры микроорганизмов поддерживали на твердой питательной среде (МПА) путем последовательных пересевов два раза в месяц. Хранение культур осуществлялось на скошенном агаре при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$. В работе использованы 24-48 часовые культуры, выращенные на универсальной твердой среде. Соотношение культур микроорганизмов в ассоциации составило 1:1.

В качестве подложки использованы древесные опилки в виде стружек длиной 1-3 см, шириной – 0,2 см. Известно, что древесные опилки хорошо впитывают нефтепродукты, инертны по отношению к микробным клеткам, доступны, также носитель может выступать и как рыхлитель, и как источник азота, минеральных солей для микробных клеток.

В работе использовался адсорбционный метод иммобилизации. Сорбционную способность носителей и клеток определяли методом Г.Н. Никовской в «острых» опытах [7]. Количество прикрепившихся клеток рассчитывалось на основании разницы начальных и конечных значений оптической плотности проб. Для оценки степени сорбции и десорбции клеток замерялись концентрации клеток в растворе путем измерения оптической плотности суспензии на спектрофотометре «КФК-3-30МЗ» при длине волны 540 нм и толщине кюветы 3,045 см, емкость – 1,3 мл [8].

Для адсорбционной иммобилизации клетки бактерий культивировали на МПА в течение 24 часов, затем резуспензировали в физиологическом растворе NaCl до получения оптической плотности 0,5-0,6 ед. в суспензии.

Для изучения иммобилизации клеток и адсорбционной емкости носителя использовали опилки в количестве 1г и 2 г в 100 мл микробной суспензии с оптической плотностью $d=0,5-0,6$ ед. Предварительно, опилки насыщались водой путем

автоклавирования. Иммобилизацию проводили в колбах Эрленмейера в качалочных условиях при 20 °С в течение 24 ч. Через определенные промежутки времени отбирали пробы, в которых определяли оптическую плотность.

Для изучения процессов десорбции носитель с адсорбированными на них клетками переносили в 100 мл изотонического раствора, встряхивали в течение 15 мин. и измеряли оптическую плотность проб жидкой фазы. Эксперименты проводились в 4 повторностях. Полученные результаты обрабатывались статистически. При проведении статистических расчетов использовали табличный процессор Excel 7.0.

Известно, что эффективность микробных клеток, прикрепленных к твердым носителям, используемых в биоремедиации, выше чем свободных, т.к., благодаря подложке, иммобилизованные микроорганизмы, в определенной мере, защищены от действия токсичных агентов, способны длительное время сохранять биохимическую активность и устойчивость к экстремальным факторам среды. Большую практическую значимость имеет тот факт, что в качестве носителя можно применять материалы природного происхождения, которые, могут служить не только носителем, но и выполнять функции мелиоранта и разрыхлителя (цеолит, солома, опилки, рисовая шелуха).

Биопрепараты на основе штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов подразделяются на две основные группы: биопрепараты на основе монокультур и биопрепараты, в состав которых входит несколько штаммов микроорганизмов. Монобактериальные препараты характеризуются более узкой специфичностью по отношению к индивидуальным углеводородам, более узким интервалом pH, оптимальным для активности микроорганизмов, а также интервалом солености, температуры, концентрации углеводов. Полибактериальные препараты имеют более широкие адаптационные и экологические возможности для использования.

В результате изучения адсорбционной активности монокультур и сконструированных на их основе двух активных ассоциаций-деструкторов на древесные опилки показано, что адсорбционная активность обеих ассоциаций культур выше чем монокультур. Следует отметить, что 80 % иммобилизованных клеток адсорбировались на опилки в течение первых 2 часов.

В целях экономической целесообразности при создании биокатализатора на основе микробных клеток следует подобрать оптимальные соотношения системы клетка-носитель.

В результате исследований сорбционной емкости древесных опилок (1 г и 2 г) в отношении постоянной концентрации клеток ($d=0,5-0,6$ ед.) ассоциаций-деструкторов выявлено, что увеличение количества сорбента до 2 г существенно не повышает числа адсорбированных клеток ассоциаций. Что можно связать с ограниченной ёмкостью поверхности носителя в отношении микробных клеток, т.е. увеличение количества носителя не приводит к повышению числа сорбированных клеток в связи с ограниченным количеством центров сорбции связывания клеток. Таким образом, оптимальной навеской сорбента (древесных опилок) для сорбции данной концентрации клеток ассоциаций-деструкторов составляет 1 г.

Одним из критериев оценки прочности прикрепления клеток и создания эффективного биокатализатора может служить степень десорбции иммобилизованных клеток с поверхности носителя. Выявлено, что показатель десорбции клеток, как монокультур, так и ассоциаций находится в пределах 9-10 %. Клеточная нагрузка полученных биокатализаторов на основе монокультур и ассоциаций-деструкторов, иммобилизованных на древесные опилки в течение 24 ч составила 36-59 % прочно адсорбированных клеток после механической десорбции слабо прикрепленных клеток с поверхности опилок. Следует отметить, что связь клетка-носитель определяется числом и силой взаимодействий между контактирующими поверхностями. Известно, что для создания работоспособного биокатализатора на основе микробных клеток

необходимо прочное прикрепление микробных клеток не менее 50 %. В результате изучения клеточной нагрузки полученных биокатализаторов показано, что в полученном иммобилизованном биокатализаторе на основе ассоциации из трех культур количество прочно прикрепленных клеток составило 53 %, а для ассоциаций из двух культур – 59 %.

Таким образом, получены иммобилизованные на древесные опилки ассоциации микроорганизмов–деструкторов:

- *Pseudomonas aeruginosa* D6 : *Bacillus licheniformis* SR1;
- *P. aeruginosa* D6: *B. licheniformis* SR1: *Bacillus sp.* D1X.

Полученные результаты могут представлять интерес для нефтедобывающей, нефтеперерабатывающей отрасли для решения задач охраны окружающей среды от загрязнений нефтью и отходами, образующиеся при нефтедобыче.

Работа выполнена при поддержке грантового финансирования КН МОН РК в рамках проекта АР 05134797 «Создание технологической схемы проведения повышения нефтеотдачи пластов микробиологическим методом» (2018-2020 г).

1. Информационно-аналитический отчет по контрольной и правоприменительной деятельности Актюбинской экологической инспекции за 2010 год / Министерство охраны окружающей среды Республики Казахстан. Тобыл-Торгайский департамент экологии. г. Актобе - 2010г. - 200 с.
2. Environmental Protection Agency. “Assessment of the Potential Impacts of Hydraulic Fracturing for Oil and Gas on Drinking Water Resources (External Review Draft)”, June 2015.
3. А.А. Марина, Ю.А. Максимова. Загрязнение подземных вод при разработке нефтяных месторождений. Экологическая безопасность в газовой промышленности. Сб. материалов конференции, 2019.
4. Мальгина С. П. Влияние подтоварной воды на функциональные особенности растений // Вестник ОГУ. — 2013. — № 6 (155). — С. 103—105.
5. M.M. Abdulredha, et al. Overview on petroleum emulsions, formation, influence and demulsification treatment techniques // Arabian Journal of Chemistry, Volume 13, Issue 1. Page: 3403-3428.
6. P. Rajendran, P. Gunasekaran. Microbial Bioremediation. Mjp Publishers (USA), 2011. 306 pages.
7. Синицын А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Спасов С.Д. Иммобилизованные клетки микроорганизмов. - М.: Изд-во МГУ, 1994. - 288 с.
8. Кочубей В.И. Определение концентрации веществ при помощи спектрофотометрии. Саратов – 2008. – 30с.