

## АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности 6D070100 – Биотехнология

**Спанкуловой Гульжан Абикулкызы**

**«Разработка способа биоремедиации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, Кызылординской области»**

**Общая характеристика работы.** Диссертационная работа посвящена разработке способа биоремедиации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, Кызылординской области.

**Актуальность темы исследования.** В современном мире нефть является одним из основных и востребованных источников энергии в мире. Наращивание темпов нефтедобычи, открытие новых месторождений, транспортировать нефть и войти в число ведущих экспортеров углеводородов делают приоритетным исследования по разработке эффективных способов очистки окружающей среды в местах нефтедобычи. В Казахстане, среди зон экологического напряжения, особое место занимает Кызылординской области, где осуществляется добыча и переработка нефти. Вследствие деятельности действующих в регионе нефтегазовых комплексов сложилась довольно сложная экологическая обстановка, загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами.

На современном уровне развития нефтегазового комплекса не представляется возможным полностью исключить его негативное воздействие на окружающую среду. Проблема очистки окружающей среды от нефтяного загрязнения приобретает все большую остроту в связи с ограниченностью возможностей механических и физико-химических способов очистки. Определяющую роль в процессах самоочищения почв от нефти играют микроорганизмы. Большинство известных биотехнологических способов очистки основано на использовании чистых и смешанных культур микроорганизмов в сочетании с различными веществами или приемами, стимулирующими их активность.

**Цель работы** разработка способа биоремедиации нефтезагрязненных почв Кызылординской области на основе использования эффективных углеводородокисляющих микроорганизмов.

### **Задачи исследования:**

1. Выделение и отбор активных микроорганизмов-деструкторов из нефтезагрязненных почв Кызылординской области;
2. Идентификация активных штаммов, отобранных микроорганизмов;
3. Изучение углеводородокисляющей способности отобранных культур микроорганизмов;
4. Создание эффективного консорциума нефтеокисляющих микроорганизмов;

5. Проведение модельных экспериментов по утилизации нефти и нефтепродуктов консорциумом нефтеокисляющих микроорганизмов.

**Объект исследования.** Для выделения углеводородокисляющих микроорганизмов использовали загрязненную нефтью почву месторождения Кумколь. В работе использовали штамм бактерии, выделенных из нефтезагрязненных почв месторождения Кумколь, Кызылординского области.

**Методы исследования.** В ходе работы были использованы традиционные микробиологические (метод Коха, метод микроскопии, метод перпендикулярных штрихов и др.), биохимические, молекулярно-генетические (секвенирование фрагмента генов 16S рНК) и физико-химические методы (гравиметрический, колориметрический, спектрофотометрический, газохроматографический).

**Научная новизна исследования.**

Впервые из нефтезагрязненной почвы месторождения Кумколь, Кызылординской области выделены активные штаммы нефтеокисляющих микроорганизмов *Tessaracoccus sp.* и *Alcanovorax sp.*

Впервые показано высокая способность штаммов *Rhodococcus sp.* 1D/1; *Gordonia sp.* 12/5; *Rhodococcus erythropolis* 14/1 к деградации нефти, мазута, дизельного топлива и моторных масел, так же к разложению моно- и ПАУ (фенол, орто-, пара-, мета-крезол, нафталин, фенантрен, антропен).

На основе активных штаммов-деструкторов-бактерии создано ассоциации штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов. Установлено, что Ассоциация I (*Rhodococcus sp.* 1D/1, *Tessaracoccus sp.* 13/8, *Dietzia sp.* 13/4) и Ассоциация II (*Gordonia sp.* 12/5, *Dietzia sp.* 12/7, *Rhodococcus erythropolis* 14/1, *Arthrobacter sp.* 15/3) разлагают н-алканы, н-алкилы, с разветвленной цепью, ароматические и ПАУ нефти и нефтепродуктов (мазут, дизельное топливо).

На основании применения, выделенных из нефтезагрязненных почв штаммов бактерий-деструкторов углеводов нефти и нефтепродуктов разработан способ биоремедиации почв Кызылординской области.

**Теоретическая значимость и практическая ценность исследования.**

Создана коллекция нефтеокисляющих микроорганизмов, способных эффективно деградировать нефть, мазут, дизельное топливо, а также моно- и ПАУ (фенол, орто-, пара-, мета-крезол, нафталин, фенантрен, антрацен).

16S рНК нуклеотидные последовательности активных углеводородокисляющих штаммов бактерий, выделенных из нефтезагрязненной почвы месторождения Кумколь в Кызылординской области зарегистрированы в GenBank. Регистрационные номера доступа: *Rhodococcus sp.* 1D/1 - MF188988.1; *Gordonia sp.* 12/5 - MF188989.1; *Dietzia sp.* 12/7 - MF188990.1; *Dietzia sp.* 13/4 - MF188991.1; *Tessaracoccus sp.* 13/8 - MF188992.1; *Rhodococcus erythropolis* 14/1 - MF188993.1; *Rhodococcus sp.* 14/3 - MF188994.1; *Arthrobacter sp.* 15/3 - MF188995.1; *Microbacterium arabinogalactanolyticum* 12/6 - MF188996.1; *Pseudomonas sp.* 14/2 - MF188997.1; *Microbacterium sp.* 16/1 - MF188998.1; *Alcanovorax sp.* 16/3 - MF188999.1.

Отобранные активные штаммы и созданные на их основе ассоциации могут служить основой для создания биопрепаратов, используемых для биоремедиации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами.

Разработанный способ позволит повысить эффективность восстановления почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, что благоприятно скажется на экологической ситуации региона. Результаты работы могут быть использованы для дальнейших биотехнологических исследований и при разработке комплексных технологий по восстановлению нефтезагрязненных почв Казахстана.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Поэтапный скрининг среди углеводородокисляющих микроорганизмов, выделенных из нефтезагрязненной почвы, позволил отобрать штаммы, растущие на нефти, нефтепродуктах, моно- и ПАУ.

2. Активные штаммы *Rhodococcus sp.* 1D/1; *Gordonia sp.* 12/5; *Rhodococcus erythropolis* 14/1 показали высокую способность к деградации нефти, мазута, дизельного топлива и моторных масел, а так же к разложению моно- и ПАУ (фенол, орто-, пара-, мета-крезол, нафталин, фенантрен, антрацен).

3. Использование ассоциации микроорганизмов – нефтедеструкторов совместно с органоминеральными удобрениями, ускоряет процесс ремедиации загрязненных почв в Кызылординской области в 1,5-2 раза.

#### **Основные результаты исследования и выводы:**

Полученные в работе результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Из нефтезагрязненных почв месторождения Кумколь, Кызылординской области выделены 182 культуры углеводородокисляющих микроорганизмов. Для отбора наиболее эффективных нефтедеструкторов проведен скрининг, в результате которого было отобрано 12 культур, наиболее активно утилизирующих сырую нефть и нефтепродукты (мазут, дизельное топливо) в жидкой минеральной среде, - 43,9-88,8 % за 14 дней культивирования.

2. Охарактеризованы новые перспективные для биотехнологии штаммы углеводородокисляющих бактерий - *Rhodococcus sp.* 1D/1; *Gordonia sp.* 12/5; *Dietzia sp.* 12/7; *Dietzia sp.* 13/4; *Tessaracoccus sp.* 13/8; *Rhodococcus sp.* 14/1; *Rhodococcus sp.* 14/3; *Arthrobacter sp.* 15/3; *Microbacterium arabinogalactanolyticum* 12/6; *Pseudomonas sp.* 14/2; *Microbacterium sp.* 16/1; *Alcanovorax sp.* 16/3. 16S рНК нуклеотидные последовательности штаммов зарегистрированы в GenBank под регистрационными номерами: № MF188988.1; № MF188989.1; № MF188990.1; № MF188991.1; № MF188992.1; № MF188993.1; № MF188994.1; № MF188995.1; № MF188996.1; № MF188997.1; № MF188998.1; № MF188999.1.

3. Изучение углеводородокисляющей активности отобранных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов показало их высокую деструктивную способность. Степень деструкции нефти за 14 суток культивирования составила 46,5-82,3% и 45,1-81,0%, мазута – 48,3-86,4% и 44,8-81,2%, дизельного топлива –

40,5-72,4% и 35,8-68,2% соответственно при 3%-ном и 5%-ном содержании. Наиболее активными были штаммы 12/5, 12/7, 13/8, 14/1, 15/3, 12/6 и 1D/1.

4. Из всех отобранных активных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов три штамма *Gordonia sp.* 12/5, *Rhodococcus erythropolis* 14/1 и *Rhodococcus sp.* 1D/1 обладали высоким деградационным потенциалом и способны полностью ассимилировать ароматические углеводороды (нафталин, фенантрен, антрацен, фенол, ксилол, орто-, пара-, мета-крезол).

5. На основе отобранных активных микроорганизмов-деструкторов составлены ассоциации, способные активно утилизировать нефть месторождения Кумколь, мазут и дизельное топливо. Наиболее эффективными были две ассоциации, состоящие из бактерий *Rhodococcus sp.* 1D/1, *Tessaracoccus sp.* 13/8, *Dietzia sp.* 13/4 (Ассоциация I) и *Gordonia sp.* 12/5, *Rhodococcus erythropolis* 14/1, *Arthrobacter sp.* 15/3, *Dietzia sp.* 12/7 (Ассоциация II). За 14 суток культивирования деструкция нефти при 7%-ном содержании составила 77,5% и 78%, мазута – 74,5% и 73,7%, дизельного топлива – 67,1% и 61,8% соответственно.

6. Лабораторные модельные эксперименты показали, что совместное внесение ассоциаций нефтеокисляющих микроорганизмов и органоминеральных удобрений способствовало более эффективной очистке почвы от нефти и нефтепродуктов. За три месяца количество нефти и нефтепродуктов в почве снизилось на 62,4-85,7 % и 60,1-78,4 % при 5%-ном и 10%-ном загрязнении соответственно. При этом наибольшую активность показала ассоциация II.

7. Для разработки способа биоремедиации почв Кызылординской области, загрязненных нефтью, проведены мелкоделяночные полевые исследования. Нарботаны опытные партии биопрепаратов на основе активных ассоциаций нефтеокисляющих микроорганизмов (Ассоциация I и Ассоциация II) на опытно-промышленной установке ТОО НПЦ микробиологии и вирусологии. Установлено, что наиболее эффективная очистка почвы отмечалась при совместном внесении ассоциации II и органоминеральных удобрений. Содержание нефти в почве через 2 месяца снизилось на 73,4% и 70,7% при уровне загрязнения 5,7% и 7,2% соответственно.

Все поставленные задачи в диссертации выполнены.

**Личный вклад автора.** Анализ литературных данных касающихся исследуемой проблемы, проведение экспериментальных исследований, анализ полученных результатов и статистическая обработка, изложение диссертационной работы выполнены лично автором.

**Апробация работы.**

- Пятая международная конференция «Экологическая инженерия и защита окружающей среды», 2017 г. Пловдив, Болгария.

- VII Международная конференция по экологической промышленной и прикладной микробиологии. Октябрь 2017 г. Мадрид, Испания.

- Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы науки», 2018г. Алматы, Казахстан.

- XV Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы современной науки». 07 -15 июня 2019. Пшемысль, Польша.

**Публикации.** В открытой печати по материалам исследования опубликовано 10 научных публикаций. Из них 2 статья входит в базу данных Thomson Reuters; 3 статьи в республиканских научных журналах, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки РК; 2 статьи и 1 тезис в материалах конференций, 1 статья в журнале Микробиология и вирусология. Также получен патент на изобретение (№ 34047 (2019)).

**Структура диссертации.** Диссертация изложена на 125 страницах компьютерного текста и состоит из обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, списка использованных источников из 235 наименований содержит 16 таблиц, 25 рисунков и трех приложений.