

МРНТИ: 34.27.39

Э.Р. ФАЙЗУЛИНА^{1*}, Л. Г. ТАТАРКИНА¹, Г.А. СПАНКУЛОВА¹,
Г.Б. БАЙМАХАНОВА¹, С.А. АЙТКЕЛЬДИЕВА¹, И. Э. СМЕРНОВА¹,
З. АЛЕКСИЕВА²

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы,
Казахстан

²Болгарская академия наук, София, Болгария
*e-mail: elmira_f@mail.ru

ВЛИЯНИЕ СОЛЁНОСТИ И pH СРЕДЫ НА ДЕГРАДАЦИЮ НЕФТИ КОНСОРЦИУМАМИ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.10

Аннотация

Изучено влияние солёности и pH среды на деградацию нефти тремя консорциумами термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов. Установлено, что исследуемые консорциумы устойчивы к высокому содержанию NaCl в среде и обладают высокой нефтеокисляющей активностью. Так, за 14 суток культивирования степень утилизации нефти с 2% NaCl в среде составила 50,7-66,8%, с 5% – 65,5-72,8%, с 10% – 69,0-73,5%.

Показана высокая деструкционная способность исследуемых консорциумов при разных значениях pH среды. Наибольшую активность они проявили в щелочной среде (pH 8 и 9), степень деструкции нефти при этих значениях составила свыше 80%. В кислой среде (pH 5 и 6) было утилизировано 57,1-67,6% и 51,2-56,9% нефти, при pH 7 – 58,7-62,9%.

Ключевые слова: нефтяное загрязнение, нефтеокисляющие микроорганизмы, консорциум, биоремедиация, солёность, pH среды.

Рост и развитие промышленности в настоящее время привели к интенсивному загрязнению окружающей среды токсичными веществами. Среди таких загрязнителей одно из первых мест принадлежит нефти и нефтепродуктам. На всех стадиях, начиная от разведки и добычи нефти, и кончая использованием нефтепродуктов, в той или иной мере происходят выбросы продуктов в окружающую среду, что приводит к ухудшению экологической ситуации и к отрицательному воздействию на здоровье людей [1, 2].

При попадании в почву нефть и нефтепродукты оказывают угнетающее воздействие на растительность, подавляют почвенную микрофлору. В результате снижается плодородие почв, что делает их непригодными для сельскохозяйственного использования. При этом естественное восстановление нефтезагрязнённых почв может протекать десятилетиями [3]. При использовании только механических, физических и химических методов ремедиации не обеспечивается необходимый уровень очистки окружающей среды. Такие методы могут приводить к вторичному загрязнению и нарушению естественных ландшафтов [4, 5].

Растущая потребность в восстановлении загрязнённых участков привела к разработке технологий, при которых основное внимание уделяется биологической детоксикации и уничтожению органических загрязнителей. Биологическая очистка является альтернативным методом удаления загрязняющих веществ, поскольку не оказывает вредного воздействия на окружающую среду [6]. Биоремедиация входит в число этих технологий. При её использовании удаляются или обезвреживаются различные загрязнители [7]. Метод биоремедиации основан на применении активных микробных штаммов, проявляющих способность к деградации углеводородов нефти. Углеводородоокисляющие микроорганизмы в силу своей полифункциональности, ферментативной активности и высокой скорости размножения способны использовать

углеводороды нефти в качестве единственного источника углерода и доводить процесс трансформации органического вещества до полной минерализации. Конечными продуктами такой биотрансформации являются углекислый газ, вода и другие экологически нейтральные соединения. Именно поэтому биоремедиация почв, загрязнённых нефтью и нефтепродуктами, активными штаммами углеводородокисляющих микроорганизмов предлагается в качестве наиболее перспективного метода борьбы с этим загрязнением [8, 9].

Около 60% мировых запасов нефти находится на территориях стран с жарким климатом, где специфика природных, в частности, температурных условий вынуждает более тщательно подходить к выбору метода ремедиации загрязнённых земель [10, 11]. Температура является одним из ключевых факторов, влияющим на физические свойства и химический состав нефтяных углеводородов, а, следовательно, и на их биodeградацию. В зависимости от неё могут претерпевать сезонные изменения бактериальная активность и, соответственно, скорость биodeградации нефти [12, 13]. Также на микробиологические процессы оказывают влияние солёность и pH среды. Цинь с соавторами предположили, что солёность оказывает большое влияние на процессы биоремедиации и биоразложения, а также влияет на рост и разнообразие микробов [14]. Солёность оказывает негативное влияние на активность ряда ключевых ферментов, усложняющихся в процессе деградации углеводородов [15]. Кислотность почвы также играет важную роль: в природных условиях микроорганизмы-биодеструкторы обычно активны в узкой области pH (нейтральные, или близкие к нейтральным значениям) [16].

Загрязнение почв нефтью и нефтепродуктами является актуальной проблемой и для Казахстана. Известно, что в нефтедобывающих регионах Казахстана климат резко-континентальный, характеризующийся резкими сезонными и суточными перепадами температур. Одной из главных проблем ремедиации территорий в условиях жаркого климата является тот факт, что высокие температуры снижают вязкость нефти и, таким образом, ускоряют ее диффузию вглубь грунта. В то же время повышенные среднесуточные температуры являются причиной быстрого испарения воды из грунта, что приводит к его засолению [17].

В Западном Казахстане на нефтепромыслах отмечены очаги нефтехимического загрязнения, засоления сточными пластовыми водами, отличающимися высокой минерализацией вод с преобладанием в солевом комплексе хлорида натрия [18]. Кроме того, разливы сырой нефти вызывают подщелачивание различной степени почвенного раствора, что находится в зависимости от концентрации нефти [19].

Целью исследования было изучение способности консорциумов нефтеокисляющих микроорганизмов окислять углеводороды нефти при различных концентрациях NaCl и pH среды.

Материалы и методы исследований

Объектами исследований были отобранные активные консорциумы нефтеокисляющих бактерий, состоящие из штаммов:

9 – *Rhodococcus fascians* K3, *Dietzia* sp. 84Y, *Pusillimonas* sp. 1/8ан;

18 – *Dietzia* sp.34, *Dietzia* sp.84Y, *Pusillimonas* sp. 1/8ан;

19 – *Dietzia* sp.34, *Dietzia* sp.84Y, *Rhodococcus* sp. 1Д/1.

Питательные среды. Модифицированная минеральная среда ВД следующего состава, г/л: NH_4NO_3 – 1,0, K_2HPO_4 – 1,0, KH_2PO_4 – 1,0, MgSO_4 – 0,2, $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,02, FeCl_3 – следы, NaCl – 10,0, pH = 7,0-7,2.

Нефть. Сырая нефть месторождения Доссор Атырауской области.

Изучение деструкционной способности отобранных консорциумов при разных значениях солёности питательной среды проводили в колбах Эрлеймейера с минеральной средой ВД, в которую добавляли 2, 5 и 10% NaCl. Нефть вносили из расчета

2% по объему. Колбы инкубировали в термостатируемом шейкере при 30°C в течение 14 суток. Количественное потребление нефти определяли гравиметрическим методом.

Деструкционную способность отобранных консорциумов при разных значениях pH среды (5-9) изучали в жидкой минеральной среде ВД. pH 5 и 6 устанавливали подкислением среды серной кислотой, pH 8 и 9 – подщелачиванием 10%-ным раствором NaOH. Нефть вносили из расчета 2% по объему. Колбы инкубировали в термостатируемом шейкере при 30°C в течение 14 суток. Количественное потребление нефти определяли гравиметрическим методом.

Все эксперименты ставились в 3-кратной повторности.

Статистическую обработку результатов исследований проводили по общепринятым критериям вариационно-статистического анализа с вычислением средних величин (M), ошибки средней арифметической (m) с помощью пакета компьютерных программ Microsoft Excel, 2010. Оценку статистической значимости различий средних величин проводили по стандартной методике [20]. Статистически значимыми считали различия с $p < 0,05$.

Результаты исследований и обсуждение

Известно, что почва на нефтепромыслах Казахстана в разной степени засолена, при этом преобладает хлоридное засоление. В связи с этим была изучена деструкционная способность отобранных консорциумов при разных значениях солёности среды (2%, 5%, 10%).

Результаты исследования показали, что отобранные консорциумы выдерживали концентрацию NaCl до 10% (таблица 1). При 2% NaCl наибольшую нефтеокисляющую активность показал консорциум 19, степень деструкции нефти при его культивировании составила 66,8%. Наименьшая активность в этих условиях была у консорциума 9, который утилизировал 50,7% нефти.

При 5% содержании NaCl в среде консорциумы 18 и 19 деградировали нефть примерно на одном уровне. Через 14 суток культивирования ее содержание снизилось на 71,2% и 72,8%, соответственно. Консорциум 9 также был менее активным, степень деструкции нефти под его воздействием составила 65,5%.

При 10% содержании NaCl в среде наибольшая нефтеокисляющая активность отмечена у консорциума 9, который утилизировал 73,5% нефти. Менее активным был консорциум 19.

Таблица 1 – Деструкция нефти м. Доссор активными консорциумами термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов при различной концентрации NaCl в среде

Консорциум	Степень деструкции нефти, %		
	2% NaCl	5% NaCl	10% NaCl
9 (<i>Rhodococcus fascians</i> K3, <i>Dietzia</i> sp. 84Y, <i>Pusillimonas</i> sp. 1/8ан)	50,7	65,5	73,5
18 (<i>Dietzia</i> sp.34, <i>Dietzia</i> sp.84Y, <i>Pusillimonas</i> sp. 1/8ан)	64,3	71,2	71,9
19 (<i>Dietzia</i> sp.34, <i>Dietzia</i> sp.84Y, <i>Rhodococcus</i> sp. 1Д/1)	66,8	72,8	69,0
контроль	20,6	21,0	19,1

В ряде работ показано, что наличие NaCl в среде ослабляло процесс деструкции нефти и нефтепродуктов, предположительно, за счёт его ингибирующего действия на рост бактерий. Увеличение концентрации соли снижало и скорость биodeградации [15, 21]. В наших исследованиях установлено, что деструкционная способность изучаемых консорциумов, наоборот, повышалась с увеличением концентрации NaCl в среде. Так, наименьшая степень деструкции нефти отмечена при 2% содержании соли. Консорциум 9 утилизировал максимальное количество нефти при 10% NaCl. Степень деструкции нефти под воздействием

консорциума 18 при 5% и 10% содержании соли отличалась незначительно – 71,2 и 71,9%, соответственно. У консорциума 19 отмечалось небольшое снижение активности – с 72,8% до 69,0%. Более высокая скорость биоразложения нефти консорциумами при повышенной концентрации NaCl, возможно, связана с тем, что микроорганизмы, входящие в их состав, адаптированы к этим условиям, так как были выделены из нефтезагрязненных почв Атырауской области, характеризующихся высоким уровнем засоления.

pH среды также является одним из факторов, влияющих на биоремедиацию нефтезагрязненных экосистем. Кислотность окружающей среды влияет на такие процессы, как транспорт через клеточную мембрану и баланс каталитических реакций, а также - на активность ферментов. Уровень pH может сильно варьироваться, и его необходимо учитывать при совершенствовании методов биологической очистки [6]. В связи с этим, была изучена нефтеокисляющая активность отобранных консорциумов при росте в жидкой минеральной среде с нефтью при разных значениях кислотности (таблица 2).

Таблица 2 – Деструкция нефти м. Доссор активными консорциумами термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов при разных значениях pH среды

Консорциум	Степень деструкции нефти, %				
	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
9	63,2	51,2	58,7	84,5	87,9
18	67,6	53,4	60,3	92,4	81,3
19	57,1	56,9	62,9	94,4	82,3
контроль	15,7	16,3	15,9	16,2	16,3

Из данных таблицы 2 видно, что все консорциумы показали наименьшую активность при pH 6, а наибольшую - при pH 8 и 9.

В кислой среде (pH 5) лучше всего деградировал нефть консорциум 18. При pH 6, 7 и 8 наиболее эффективным был консорциум 19, а при pH 9 – консорциум 9.

Консорциум 19 при pH 5 и 6 утилизировал нефть на одном уровне – 57,1% и 56,9%, соответственно. С увеличением значений pH возрастала и деструкционная активность, достигая максимума при pH 8 (94,4%). При pH 9 степень деградации нефти этим консорциумом снизилась, но оставалась на высоком уровне – свыше 80%.

Консорциумы 9 и 18 показали наименьшую активность в слабокислой и нейтральной среде, при pH 5 она была несколько выше. Наибольшее количество нефти консорциум 18 утилизировал при pH 8 – 92,4%, а при pH 9 – на 11% меньше. Степень деградации нефти под воздействием консорциума 9, наоборот, увеличивалась с повышением pH от 8 до 9.

Заключение

Таким образом, исследуемые консорциумы показали устойчивость к высокому содержанию соли и высокую нефтеокисляющую активность. При содержании в питательной среде NaCl 2% степень утилизации нефти за 14 суток культивирования составила 50,7-66,8%, при 5% – 65,5-72,8%, при 10% – 69,0-73,5%. Естественная убыль нефти составила 19,1-21,0%.

Показана способность к биоразложению нефти отобранными активными консорциумами при разных значениях pH среды. Наибольшую активность консорциумы показали в щелочной среде (pH 8 и 9), степень деструкции нефти при этих значениях составила 84,5-94,4% и 81,3-87,9%, соответственно. В кислой среде (pH 5 и 6) было утилизировано 57,1-67,6% и 51,2-56,9% нефти, при pH 7 – 58,7-62,9%. При этом естественная убыль нефти составила 19,0-21,3%.

Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант AP09260140).

Литература:

- 1 Karlapudi A. P., Venkateswarulu T.C., Tammineedi J., Kanumuri L. Bharath K. R., Dirisala V. R., Kodali V. P. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review // *Petroleum*. – 2018. – Vol. 4(3). – С. 241-249. <https://doi.org/10.1016/j.petlm.2018.03.007>
- 2 Khanpour-Alikelayeh E., Partovinia A., Talebi A., Kermanian H. Investigation of *Bacillus licheniformis* in the biodegradation of Iranian heavy crude oil: A two-stage sequential approach containing factor-screening and optimization // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2020. – Vol. 205. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111103>
- 3 Карасева Э.В. Биоремедиация черноземной почвы, загрязненной нефтью // *Биотехнология*. – 2009. – № 2. – С. 122-129.
- 4 Кирий О.А., Колесников С.И., Зинчук А.Н. Применение бактериального препарата «Дестройл» для ликвидации загрязнений нефтепродуктами пресных водоемов // *Политематический сетевой электронный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ)*. – 2012. – №09 (83). – URL: <http://ej.kubagro.ru/2012/09/pdf/46.pdf>
- 5 Колесников С.И., Гайворонский В.Г., Ротина Е.Н., Жаркова М.Г., Денисова Т.В., Казеев К.Ш. Результаты экспериментального изучения загрязнения бурых почв мазутом // *Геоэкология*. – 2011. – № 2. – С. 183-187.
- 6 Adnan B. Al-Hawash, Maytham A. Dragh, Shue Li, Ahmad Alhujaily Hayder A. Abbood, Xiaoyu Zhang Fuying M. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment // *The Egyptian Journal of Aquatic Research*. – 2018. – Vol. 44 (2). – P. 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.001>
- 7 Anastasios I. Zouboulis, Panagiotis A. Moussas, Savvina G. Psaltou Groundwater and Soil Pollution: Bioremediation // *Encyclopedia of Environmental Health.-Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. – 2018. – P. 1037-1044. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52272-6.00035-0>
- 8 Кураков А.В., Ильинский В.В., Котелевцев С.В., Садчиков А.П. Биоиндикация и реабилитация экосистем при нефтяных загрязнениях. – М.: Графикон, 2006. – 336 с.
- 9 Sunita J. Varjani Microbial degradation of petroleum hydrocarbons // *Bioresource Technology*. – 2017. – Vol. 223. – P. 277-286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>
- 10 Piyadasa H.T.N.I. Marine environment protection from offshore oil and gas: activities in Sri Lanka//*World Maritime University Dissertations*. – 2014. – 185 p. https://commons.wmu.se/all_dissertations/485/
- 11 Veerasingam S., Vethamony P., Mani Murali R., Babu, M.T. Sources, Vertical Fluxes and Accumulation of Petroleum Hydrocarbons in Sediments from the Mandovi Estuary, West Coast of India // *Int. J. Environ. Res*. – 2015. – Vol. 9(1). – P. 179-186. <https://doi.org/10.22059/IJER.2015.887>
- 12 Boqun Liu, Meiting Ju, Jinpeng Liu, Wentao Wu, Xiaojing Li Isolation, identification, and crude oil degradation characteristics of a high-temperature, hydrocarbon-degrading strain // *Marine Pollution Bulletin*. – 2016. – Vol. 106, Iss. 1–2. – P. 301-307. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.09.053>
- 13 Myat Thwe Myint Aung, Qintong Li, Seiya Takahashi, and Motoo Utsumi Effect of Temperature on Hydrocarbon Bioremediation in Simulated Petroleum-Polluted Seawater Collected from Tokyo Bay // *Japanese Journal of Water Treatment Biology*. – 2018. – Vol.54 (3). – P. 95-104. <https://doi.org/10.2521/jswtb.54.9>
- 14 Qin X., Tang J., Li D., Zhang Q. Effect of salinity on the bioremediation of petroleum hydrocarbons in a saline alkaline soil // *Lett. Appl. Microbiol*. – 2012. – Vol. 55 (3). – P. 210-217. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03280.x>
- 15 Ebadi A., Khoshkholgh Sima N.A., Olamaee M., Hashemi M., Ghorbani N. R. Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* consortium // *J. Adv. Res*. – 2017. – Vol. 8 (6). – P. 627-633. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.06.008>
- 16 Дёмин А.В., Костин М.В., Садчиков А.В. Применение продукта биогазовой установки как нефтедеструктора при биоремедиации нефтезагрязненных земель // *Современные проблемы науки и образования*. – 2014. – № 4. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=14002>
- 17 Делеган Я.А., Ветрова А.А., Чернявская М. И., Титок М.А., Филонов А. Е. Термотолерантные актиномицеты как агенты ремедиации нефтезагрязненных грунтов и вод в условиях жаркого аридного климата // *Известия Тульского государственного университета Естественные науки*. – 2015. – Вып. 4. – С. 248–258.

18 Томина Т.К. Засоленность почв территории нефтяных месторождений Караарна и Восточная Кокарна // Почвоведение и агрохимия. – 2015. – №3. – С. 117-130.

19 Кенжегалиев А., Кулбатыров Д.К., Базарбекова М.М., Жунисканкызы К. Исследования и разработка рекомендации по восстановлению деградированной почвы нефтедобывающих месторождений. – Атырау, 2021. – 250 с.

20 Гланц С. Медико-биологическая статистика / пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.

21 Dariush Minai-Tehrani, Ali Herfatmanesh, Forood Azari-Dehkordi, Saiid Minooi Effect of Salinity on Biodegradation of Aliphatic Fractions of Crude Oil in Soil // Pakistan Journal of Biological Sciences – 2006. – Vol. 9. – P. 1531-1535. URL: <https://docsdrive.com/pdfs/ansinet/pjbs/2006/1531-1535.pdf>

Э.Р. ФАЙЗУЛИНА^{1*}, Л. Г. ТАТАРКИНА¹, Г.А. СПАНКУЛОВА¹,
Г.Б. БАЙМАХАНОВА¹, С.А. АЙТКЕЛЬДИЕВА¹, И. Э. СМЕРНОВА¹,
З. АЛЕКСИЕВА²

¹Микробиология және вирусология ғылыми - өндірістік орталығы, Алматы, азақстан

²Болгария ғылым академиясы, София, Болгария

*e-mail: elmira_f@mail.ru

ТЕРМОТОЛЕРАНТТЫ МҰНАЙТОТЫҚТЫРҒЫШ МИКРООРГАНИЗМДЕР КОНСОРЦИУМДАРЫНЫҢ МҰНАЙДЫ ЫДЫРАТУЫНА ОРТАНЫҢ ТҰЗДЫЛЫҒЫ МЕН pH ӘСЕРІ

Түйін

Термотолерантты мұнайтотықтырғыш микроорганизмдердің үш консорциумының мұнайды ыдыратуына ортаның тұздылығы мен pH-ның әсері зерттелді. Зерттелетін консорциумдар ортадағы жоғары NaCl мөлшеріне төзімділігі және жоғары мұнайтотықтырғыш белсенділік танытқаны анықталды. Сонымен 14 тәуліктік өсіру кезінде ортада 2% NaCl бар мұнайды пайдаға асыру дәрежесі 50,7-66,8%, 5% - 65,5-72,8%, 10% - 69,0-73,5% құрады.

Зерттелетін консорциумдардың жоғары ыдырату қабілеті ортаның әртүрлі pH мәндерінде көрінеді. Олар сілтілі ортада ең жоғары белсенділікті көрсетті (pH 8 және 9), бұл мәндерде мұнайдың ыдырау дәрежесі 80% -дан астам болды. Қышқыл ортада (pH 5 және 6) 57,1-67,6% және 51,2-56,9% мұнай пайдаланылды, pH 7 кезінде - 58,7-62,9% болды.

Кілтті сөздер: мұнаймен ластану, мұнайтотықтырғыш микроорганизмдер, консорциум, биоремедиация, тұздылық, ортаның pH.

IRSTI: 34.27.39

E.R. FAIZULINA^{1*}, L.G. TATARKINA¹, G.A. SPANKULOVA¹,
G.B. BAIMAKHANOVA¹, S.A. AITKELDIYEVA¹, I.E. SMIRNOVA¹,
Z. ALEXIEVA²

¹Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

²Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

*e-mail: elmira_f@mail.ru

INFLUENCE OF SALINITY AND pH OF THE MEDIUM ON OIL DEGRADATION BY CONSORTIA OF THERMOTOLERANT OIL-OXIDIZING MICROORGANISMS

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.10

Abstract

The influence of salinity and pH of the medium on oil degradation by three consortia of thermotolerant oil-oxidizing microorganisms was studied. It was found that the studied consortia are resistant to high NaCl content in the medium and have high oil-oxidizing activity. So for 14 days of cultivation, the degree of utilization of oil with 2% NaCl in the medium was 50.7-66.8%, with 5% - 65.5-72.8%, with 10% - 69.0-73.5%.

The high destructive ability of the studied consortia at different pH values of the medium is shown. They demonstrated the greatest activity in an alkaline environment (pH 8 and 9), the degree of oil destruction at these values was over 80%. In an acidic environment (pH 5 and 6), 57.1-67.6% and 51.2-56.9% of oil were utilized, at pH 7 - 58.7-62.9%.

Keywords: oil pollution, oil-oxidizing microorganisms, consortium, bioremediation, salinity, medium pH.

The growth and development of industry has now led to intense environmental pollution with toxic substances. Among such pollutants one of the first places belongs to oil and oil products. At all stages, from exploration and production of oil to the use of petroleum products, to some extent, products are released into the environment, which leads to a deterioration in the environmental situation and a negative impact on human health [1, 2].

When oil and oil products enter the soil, they have a depressing effect on vegetation and suppress soil microflora. As a result, soil fertility is reduced, making them unsuitable for agricultural use. At the same time, the natural restoration of oil-contaminated soils can take decades [3]. When using only mechanical, physical and chemical methods of remediation, the necessary level of environmental purification is not provided. Such methods can lead to secondary pollution and disruption of natural landscapes [4, 5].

The growing need for remediation of contaminated sites has led to the development of technologies that focus on biological detoxification and destruction of organic pollutants. Biological treatment is an alternative method of removing pollutants, since it does not have a harmful effect on the environment [6]. Bioremediation is one of these technologies. When using it, various pollutants are removed or neutralized [7]. The bioremediation method is based on the use of active microbial strains that exhibit the ability to degrade oil hydrocarbons. Hydrocarbon-oxidizing microorganisms, due to their multifunctionality, enzymatic activity and high reproduction rate, are able to use oil hydrocarbons as the only source of carbon and bring the process of organic matter transformation to complete mineralization. The end products of this biotransformation are carbon dioxide, water and other environmentally neutral compounds. That is why the bioremediation of soils contaminated with oil and oil products by active strains of hydrocarbon-oxidizing microorganisms is proposed as the most promising method for combating this pollution [8, 9].

About 60% of the world's oil reserves are located in the territories of countries with a hot climate, where the specific nature, in particular, temperature conditions, forces a more careful approach to the choice of the method of remediation of contaminated lands [10, 11]. Temperature is one of the key factors affecting the physical properties and chemical composition of petroleum hydrocarbons, and, consequently, their biodegradation. Depending on it, bacterial activity and, accordingly, the rate of oil biodegradation may undergo seasonal changes [12, 13]. Salinity and pH of the environment also influence microbiological processes. Qin et al. suggested that salinity has a great influence on the processes of bioremediation and biodegradation, and also affects the growth and diversity of microbes [14]. Salinity has a negative effect on the activity of a number of key enzymes that become more complex in the process of hydrocarbon degradation [15]. Soil acidity also plays an important role: under natural conditions, microorganisms-biodestructors are usually active in a narrow pH range (neutral or close to neutral values) [16].

Soil pollution with oil and oil products is an urgent problem for Kazakhstan. It is known that in the oil-producing regions of Kazakhstan the climate is sharply continental, characterized by sharp seasonal and daily temperature fluctuations. One of the main problems of remediation of territories in hot climates is the fact that high temperatures reduce the viscosity of oil and, thus, accelerate its diffusion into the soil. At the same time, elevated average daily temperatures cause rapid evaporation of water from the soil, which leads to its salinization [17].

In Western Kazakhstan, in the oil fields, there are pockets of petrochemical pollution, salinization by waste formation waters, characterized by high mineralization of waters with a predominance of sodium chloride in the salt complex [18]. In addition, crude oil spills cause alkalization of varying degrees of soil solution, which is dependent on oil concentration [19].

The aim of the research was to study the ability of consortia of oil-oxidizing microorganisms to oxidize oil hydrocarbons at various concentrations of NaCl and pH of the medium.

Materials and methods of research

The objects of research were selected active consortia of oil-oxidizing bacteria, consisting of strains:

9 - *Rhodococcus fascians* K3, *Dietzia* sp. 84U, *Pusillimonas* sp. 1/8an;

18 – *Dietzia* sp. 34, *Dietzia* sp. 84U, *Pusillimonas* sp. 1/8an;

19 - *Dietzia* sp. 34, *Dietzia* sp. 84U, *Rhodococcus* sp. 1D/1.

Nutrient media. Modified VD mineral medium of the following composition, g/l: NH_4NO_3 - 1.0, K_2HPO_4 - 1.0, KH_2PO_4 - 1.0, MgSO_4 - 0.2, $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ - 0.02, FeCl_3 - traces, NaCl - 10.0, pH=7.0-7.2.

Oil. Crude oil from the Dossor field, Atyrau region.

The study of the destructive ability of selected consortia at different salinity values of the nutrient medium was carried out in Erlenmeyer flasks with VD mineral medium, to which 2, 5, and 10% NaCl was added. Oil was added at the rate of 2% by volume. The flasks were incubated in a thermostatically controlled shaker at 30°C for 14 days. The quantitative consumption of oil was determined by the gravimetric method.

The destructive ability of the selected consortia at different pH values (5-9) was studied in a liquid VD mineral medium. pH 5 and 6 were adjusted by acidifying the medium with sulfuric acid; pH 8 and 9 were adjusted by alkalization with 10% NaOH solution. Oil was added at the rate of 2% by volume. The flasks were incubated in a thermostatically controlled shaker at 30°C for 14 days. The quantitative consumption of oil was determined by the gravimetric method.

All experiments were performed in triplicate.

Statistical processing of the research results was carried out according to the generally accepted criteria of variance-statistical analysis with the calculation of mean values (M), arithmetic mean error (m) using the Microsoft Excel, 2010 software package. The statistical significance of differences in mean values was assessed according to the standard method [20]. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Research results and discussion

It is known that the soil in the oil fields of Kazakhstan is saline to varying degrees, with chloride salinity predominating. In this regard, the destructive ability of the selected consortia at different values of the salinity of the medium (2%, 5%, 10%) was studied.

The results of the study showed that the selected consortia withstood NaCl concentrations up to 10% (Table 1). At 2% NaCl, consortium 19 showed the highest oil-oxidizing activity, the degree of oil destruction during its cultivation was 66.8%. The lowest activity under these conditions was in consortium 9, which utilized 50.7% of the oil.

At 5% NaCl content in the medium, consortia 18 and 19 degraded oil at approximately the same level. After 14 days of cultivation, its content decreased by 71.2% and 72.8%, respectively. Consortium 9 was also less active, the degree of oil destruction under its influence was 65.5%.

At 10% NaCl content in the medium, the highest oil-oxidizing activity was observed in consortium 9, which utilized 73.5% of the oil. Consortium 19 was less active.

Table 1 - Destruction of oil of the Dossor oilfield by active consortia of thermotolerant oil-oxidizing microorganisms at different concentrations of NaCl in the medium

Consortium	Degree of oil destruction, %		
	2% NaCl	5% NaCl	10% NaCl
9 (<i>Rhodococcus fascians</i> K3, <i>Dietzia</i> sp. 84Y, <i>Pusillimonas</i> sp. 1/8aH)	50,7	65,5	73,5
18 (<i>Dietzia</i> sp.34, <i>Dietzia</i> sp.84Y, <i>Pusillimonas</i> sp. 1/8aH)	64,3	71,2	71,9
19 (<i>Dietzia</i> sp.34, <i>Dietzia</i> sp.84Y, <i>Rhodococcus</i> sp. 1Д/1)	66,8	72,8	69,0
control	20,6	21,0	19,1

A number of studies have shown that the presence of NaCl in the environment weakened the degradation of oil and oil products, presumably due to its inhibitory effect on bacterial growth. An increase in salt concentration also reduced the rate of biodegradation [15, 21]. In our studies, it was found that the destructive ability of the studied consortia, on the contrary, increased with an increase in the concentration of NaCl in the medium. Thus, the lowest degree of oil destruction was noted at 2% salt content. Consortium 9 utilized the maximum amount of oil at 10% NaCl. The degree of oil destruction under the influence of consortium 18 at 5% and 10% salt content differed slightly - 71.2 and 71.9%, respectively. Consortium 19 showed a slight decrease in activity - from 72.8% to 69.0%. A higher rate of oil biodegradation by consortia at an increased concentration of NaCl may be due to the fact that the microorganisms that make up their composition are adapted to these conditions, since were isolated from oil-contaminated soils of the Atyrau region, characterized by a high level of salinity.

The pH of the environment is also one of the factors affecting the bioremediation of oil-contaminated ecosystems. The acidity of the environment affects such processes as transport through the cell membrane and the balance of catalytic reactions, as well as the activity of enzymes. The pH level can vary greatly and must be taken into account when improving biological treatment methods [6]. In this regard, the oil-oxidizing activity of selected consortia was studied during growth in a liquid mineral medium with oil at different acidity values (table 2).

Table 2 - Destruction of oil at the Dossor oilfield by active consortia of thermotolerant oil-oxidizing microorganisms at different pH values of the medium

Consortium	Degree of oil destruction, %				
	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
9	63,2	51,2	58,7	84,5	87,9
18	67,6	53,4	60,3	92,4	81,3
19	57,1	56,9	62,9	94,4	82,3
control	15,7	16,3	15,9	16,2	16,3

From the data in Table 2, it can be seen that all consortia showed the least activity at pH 6, and the highest at pH 8 and 9.

In an acidic environment (pH 5), oil was best degraded by consortium 18. At pH 6, 7, and 8, consortium 19 was the most effective, and at pH 9, consortium 9.

Consortium 19 at pH 5 and 6 utilized oil at the same level - 57.1% and 56.9%, respectively. With an increase in pH values, the destructive activity also increased, reaching a maximum at pH 8 (94.4%). At pH 9, the degree of oil degradation by this consortium decreased, but remained at a high level - over 80%.

Consortia 9 and 18 showed the least activity in a slightly acidic and neutral medium; at pH 5, it was somewhat higher. Consortium 18 utilized the largest amount of oil at pH 8 - 92.4%, and at pH 9 - 11% less. The degree of oil degradation under the influence of consortium 9, on the contrary, increased with an increase in pH from 8 to 9.

Conclusion

Thus, the studied consortia showed resistance to high salt content and high oil-oxidizing activity. With a NaCl content of 2% in the nutrient medium, the degree of oil utilization for 14 days of cultivation was 50.7-66.8%, at 5% - 65.5-72.8%, at 10% - 69.0-73.5%. The natural loss of oil amounted to 19.1-21.0%.

The ability of selected active consortia to biodegrade oil at different pH values was shown. The consortia showed the highest activity in an alkaline environment (pH 8 and 9), the degree of oil destruction at these values was 84.5-94.4% and 81.3-87.9%, respectively. In an acidic environment (pH 5 and 6), 57.1-67.6% and 51.2-56.9% of oil were utilized, at pH 7 - 58.7-62.9%. At the same time, the natural loss of oil amounted to 19.0-21.3%.

Funding

The study was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (grant AP09260140).

References:

- 1 Karlapudi A. P., Venkateswarulu T.C., Tammineedi J., Kanumuri L. Bharath K. R., Dirisala V. R., Kodali V. P. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Petroleum*, 2018, 4(3), 241-249. <https://doi.org/10.1016/j.petlm.2018.03.007>
- 2 Khanpour-Alikelayeh E., Partovinia A., Talebi A., Kermanian H. Investigation of *Bacillus licheniformis* in the biodegradation of Iranian heavy crude oil: A two-stage sequential approach containing factor-screening and optimization. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 205. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111103>
- 3 Karaseva E.V. Bioremediaciya chernozemnoj pochvy, zagryaznennoj neft'yu. *Biotekhnologiya*, 2009, 2, 122-129.
- 4 Kirij O.A., Kolesnikov S.I., Zinchuk A.N. Primenenie bakterial'nogo preparata «Destroj» dlya likvidacii zagryaznenij nefteproduktami presnyh vodoemov. *Politematicheskij setevoj elektronnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Nauchnyj zhurnal KubGAU)*, 2012, 9(83). - URL: <http://ej.kubagro.ru/2012/09/pdf/46.pdf>
- 5 Kolesnikov S.I., Gajvoronskij V.G., Rotina E.N., ZHarkova M.G., Denisova T.V., Kazeev K.SH. Rezul'taty eksperimental'nogo izucheniya zagryazneniya buryh pochv mazutom. *Geoekologiya*, 2011, 2, 183-187.
- 6 Adnan B. Al-Hawash, Maytham A. Dragh, Shue Li, Ahmad Alhujaily Hayder A. Abbood, Xiaoyu Zhang Fuying M. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 2018, 44 (2), 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.001>
- 7 Anastasios I. Zouboulis, Panagiotis A. Moussas, Savvina G. Psaltou Groundwater and Soil Pollution: Bioremediation. *Encyclopedia of Environmental Health. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*, 2018, 1037-1044. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52272-6.00035-0>
- 8 Kurakov A.V., Il'inskij V.V., Kotelevcev S.V., Sadchikov A.P. Bioindikaciya i reabilitaciya ekosistem pri neftnyah zagryazneniyah. M.: Grafikon, 2006, 336 s.

- 9 Sunita J. Varjani Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 2017, 223, 277-286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>
- 10 Piyadasa H.T.N.I. Marine environment protection from offshore oil and gas: activities in Sri Lanka. World Maritime University Dissertations, 2014, 185 p. https://commons.wmu.se/all_dissertations/485/
- 11 Veerasingam S., Vethamony P., Mani Murali R., Babu, M.T. Sources, Vertical Fluxes and Accumulation of Petroleum Hydrocarbons in Sediments from the Mandovi Estuary, West Coast of India. *Int. J. Environ. Res.*, 2015, 9(1), 179-186. <https://doi.org/10.22059/IJER.2015.887>
- 12 Boqun Liu, Meiting Ju, Jinpeng Liu, Wentao Wu, Xiaojing Li Isolation, identification, and crude oil degradation characteristics of a high-temperature, hydrocarbon-degrading strain. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 106(1–2), 301-307. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.09.053>
- 13 Myat Thwe Myint Aung, Qintong Li, Seiya Takahashi, and Motoo Utsumi Effect of Temperature on Hydrocarbon Bioremediation in Simulated Petroleum-Polluted Seawater Collected from Tokyo Bay. *Japanese Journal of Water Treatment Biology*, 2018, 54(3), 95-104. <https://doi.org/10.2521/jswtb.54.9>
- 14 Qin X., Tang J., Li D., Zhang Q. Effect of salinity on the bioremediation of petroleum hydrocarbons in a saline alkaline soil. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2012, 55(3), 210-217. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03280.x>
- 15 Ebadi A., Khoshkholgh Sima N.A., Olamaee M., Hashemi M., Ghorbani N. R. Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *J. Adv. Res.*, 2017, 8(6), 627-633. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.06.008>
- 16 Dyomin A.V., Kostin M.V., Sadchikov A.V. Primenenie produkta biogazovoj ustanovki kak neftedestruktora pri bioremediacii neftezagryaznennyh zemel'. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*, 2014, 4. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=14002>
- 17 Delegan YA.A., Vetrova A.A., CHernyavskaya M. I., Titok M.A., Filonov A. E. Termotolerantnye aktinomicety kak agenty remediatsii neftezagryaznennyh gruntov i vod v usloviyah zharkogo aridnogo klimata. *Izvestiya Tul'skogo gosudarstvennogo universiteta Estestvennye nauki*, 2015, 4, 248–258.
- 18 Tomina T.K. Zasolennost' pochv territorii neftyanyh mestorozhdenij Karaarna i Vostochnaya Kokarna. *Pochvovedenie i agrohimiya*, 2015, 3, 117-130.
- 19 Kenzhegaliev A., Kulbatyrov D.K., Bazarbekova M.M., Zhuniskankyzy K. Issledovaniya i razrabotka rekomendatsii po vosstanovleniyu degradirovannoj pochvy neftedobyvayushchih mestorozhdenii. *Atyrau*, 2021, 250 s.
- 20 Glanc S. Mediko-biologicheskaya statistika / per. s angl. M.: Praktika, 1998, 459 s.
- 21 Dariush Minai-Tehrani, Ali Herfatmanesh, Forood Azari-Dehkordi, Saiid Minooi Effect of Salinity on Biodegradation of Aliphatic Fractions of Crude Oil in Soil // *Pakistan Journal of Biological Sciences* – 2006. – Vol. 9. – P. 1531-1535. URL: <https://docsdrive.com/pdfs/ansinet/pjbs/2006/1531-1535.pdf>