

**NEWS**

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

**SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL**

ISSN 2224-5308

Volume 1, Number 313 (2016), 5 – 10

**ASSESSMENT OF THE OIL-OXIDIZING ACTIVITY  
OF THE YEAST CULTURES ISOLATED FROM THE CASPIAN SEA**

S. A. Aitkeldiyeva, M. M. Shormanova, T. V. Kuznetsova,  
E. R. Fayzulina, O. N. Auezova, A. K. Sadanov

RSE "Institute of Microbiology and Virology" CS MES RK, Almaty, Kazakhstan.  
E-mail: ecomicrolab@gmail.com

**Keywords:** the oil-oxidizing microorganisms, yeast, the oil-oxidizing activity, oil destruction.

**Abstract.** Environmental pollution by oil and oil products reaches huge scales now. Hydrocarbons of oil are the main pollutants of internal reservoirs and the seas, creating various forms of pollution - the oil slicks floating on water, heavy fractions settled on a bottom that considerably breaks activity of an aerobic biota. In this regard the problem of recovery of natural capacity of the oil-polluted territories is very actual. In world practice the biotechnological methods based on use of highly active microorganisms -oil-destructors are widely applied for purification of environment from oil and oil products.

For the purpose of creation of the bacterial and yeast associations capable effectively utilize oil in coastal ecosystems, 18 yeast cultures were isolates from sea water, sediments and adjacent soils of the Caspian Sea. As a result of screening 4 active cultures were selected. Their morphological, physiological and biochemical properties are studied, on the basis of which they were identified as representatives of the genus *Candida*. The gravimetric analysis of the content of residual oil in the medium after incubation within 14 days showed that these strains degraded oil for 39,7-60,3%. The strain 11d was the most active.

УДК 579.66: 579.68: 579.083.13

**ОЦЕНКА НЕФТЕОКИСЛЯЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ДРОЖЖЕВЫХ  
КУЛЬТУР, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КАСПИЙСКОГО МОРЯ**

С. А. Айткельдиева, М. М. Шорманова, Т. В. Кузнецова,  
Э. Р. Файзуллина, О. Н. Аузрова, А. К. Саданов

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан

**Ключевые слова:** нефтеокисляющие микроорганизмы, дрожжи, нефтеокисляющая активность, деструкция нефти.

**Аннотация.** Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами в настоящее время достигает огромных масштабов. Углеводороды нефти являются основными загрязнителями внутренних водоемов и морей, создавая различные формы загрязнения - плавающие на воде нефтяные пятна, осевшие на дно тяжелые фракции, что значительно нарушает жизнедеятельность аэробной биоты. В связи с этим проблема восстановления природного потенциала нефтезагрязненных территорий является весьма актуальной. В мировой практике для очистки окружающей среды от нефти и нефтепродуктов широко применяются биотехнологические методы, основанные на использовании высокоактивных микроорганизмов-нефтедеструкторов.

С целью создания бактериально-дрожжевых ассоциаций, способных эффективно утилизировать нефть в прибрежных экосистемах из морской воды, донных осадков и прилегающих почв Каспийского моря было выделено 18 дрожжевых изолятов. В результате проведенного скрининга было отобрано 4 активные культуры. Изучены их морфологические и физиолого-биохимические свойства, на основании которых они были идентифицированы как представители рода *Candida*. Гравиметрический анализ содержания остаточной нефти в среде после инкубирования в течение 14 суток показал, что эти штаммы деградировали нефть на 39,7-60,3%. Самым активным был штамм 11д.

**Введение.** Загрязнение нефтью и нефтепродуктами, особенно в регионах интенсивной разработки месторождений углеводородного сырья, является одной из серьезных экологических проблем современного Казахстана. Нефтезагрязнения оказывают отрицательное воздействие на химические, физические и биологические свойства почвы и воды [1-3]. Под влиянием нефти и ее компонентов изменяется численность полезных микроорганизмов, их основных физиологических групп, уменьшается активность окислительно-восстановительных и гидролитических ферментов [4-6]. На данный момент одним из способов решения данной проблемы является биоремедиация, основанная на использовании биохимического потенциала микроорганизмов [7, 8]. Важнейшее преимущество данной технологии заключается в ее безопасности для окружающей среды, так как она основана на процессах самоочищения живой природы.

Основное внимание ученых ранее было уделено роли бактериальной микрофлоры в разложении углеводородов нефти в окружающей среде. Это связано с разнообразием их катаболических реакций, высокой скоростью роста на различных субстратах, особенностями генетической организации, способностью к окислительной деградации целого ряда сложных и простых углеводородов [9, 10]. При этом использовались как приемы стимулирования местной микрофлоры, обладающей способностью к окислению нефтяных углеводородов, так и внесение в места загрязнения биопрепаратов-нефтедеструкторов [11-14].

Однако значительный интерес представляют одноклеточные грибы и мицелиальные организмы, также способные использовать углеводороды [15]. Углеводородокисляющие дрожжи широко распространены в водных экосистемах. Известны такие рода дрожжей, как *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia*, *Candida*, *Torulopsis* способные окислять углеводороды нефти. В экстремальных условиях (в кислой среде, ограничении в питательных веществах) как деструкторы углеводородов более эффективны дрожжи и грибы, кроме того, они активны на поздних стадиях разложения углеводородов. Этим и объясняется интерес к этой группе микроорганизмов-деструкторов [16].

Целью исследования было выделение дрожжевых культур из прибрежных вод, донных отложений и почв Каспийского моря и изучение их нефеокисляющей способности.

**Материалы и методы исследования.** Выделение дрожжевых изолятов проводили методом накопительных культур на жидкой среде с последующим высевом на агаризованную среду Сабуро.

Анализ культуральных признаков выделенных дрожжей проводили при росте на жидком солодовом экстракте [17]. Образование мицелия и псевдомицелия изучали на картофельно-глюкозном агаре методом пластинок [18]. Наличие аскоспор определяли методом Виртика [18], баллистоспор по [19]. Осмотолерантность дрожжей изучали на дрожжевом агаре с содержанием сахарозы 50% [18]. Галотолерантность определяли при росте на среде, содержащей NaCl в концентрации 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%. Термофильность дрожжевых культур изучали при росте в диапазоне температур: 20-25, 28-34, 37-39, 40-45°C [19]. Протеолитическую активность дрожжей определяли по степени разжижения углеродной дрожжевой основы с 15% желатины, находящейся в пробирке в виде столбика. Гидролиз липидов определяли на среде Городковой с 0,1% карбоната кальция по наличию прозрачных зон вокруг роста дрожжей. Родовую принадлежность дрожжей определяли по определителю Бабьевой И.П., Голубева В.Л. [18].

Для изучения нефеокисляющей активности, отобранных дрожжевых изолятов использовали среду Ворошиловой-Диановой. В качестве единственного источника углерода в среду вносили 1% нефти. Культивирование микроорганизмов проводили в колбах Эрленмейера, содержащих 100 мл среды, на шейкерах ISF1-X модель SMX1501 и КС 4000IC control (180 об./мин.) при 28°C в течение 14 суток. Количественное определение остаточного содержания нефтепродуктов в среде проводили гравиметрическим методом.

**Результаты исследований.** Из образцов прибрежной воды, донных отложений и прилегающей почвы Каспийского моря было выделено 18 культур дрожжей. Была изучена их способность утилизировать 1% нефть (таблица 1).

По результатам визуальных исследований было установлено, что при росте дрожжевых изолятов на среде ВД нефтяная пленка разрушалась и нефть превращалась в мелкодисперсную систему. Из 18 дрожжевых культур высокую активность показали 4 изолята (7д, 8д, 11д и 15д), 2 культуры показали умеренный рост, остальные были малоактивными.

Таблица 1 – Рост дрожжевых изолятов на минеральной среде с 1% нефти

Штамм	Активность	Штамм	Активность
1д	++	10д	+
2д	+	11д	++++
3д	++	12д	+++
4д	+++	13д	++
5д	++	14д	+
6д	+	15д	++++
7д	++++	16д	+
8д	++++	17д	+
9д	+	18д	+

Примечание. + – очень слабый рост, ++ – слабый рост, +++ – умеренный рост, ++++ – очень хороший рост.

Изучение морфологических признаков четырех активных дрожжевых культур показало, что при росте на агариованной среде Сабуро 2-суточные культуры дрожжей образовывали пастообразные колонии круглой формы. Культура 7д имела колонии желтовато-белого цвета с матовой, складчатой поверхностью, врастаящие в агар, размером 2-4 мм. Культура 8д образовывала колонии кремового цвета со слабым блеском, матовой, гладкой поверхностью, не врастаящая в агар, размером 2-4 мм. У культур 11д и 15д колонии были кремового цвета, поверхность матовая, складчатая, врастаящие в агар, размеры 4-6 и 5-10 мм, соответственно. Так как морфологические признаки лучше выявляются при описании гигантских колоний, исследуемые культуры дрожжей были посеяны уколом на агариованную среду Сабуро и культивировались в течение 30 суток (рисунок 1). Как видно из рисунка, у штаммов 11д и 15д образовывались схожие по морфологии колонии в отличие от штаммов 7д и 8д.

В жидком солодовом экстракте дрожжи вызывали помутнение среды и образовывали осадок белого цвета. Вегетативные клетки размножались почкованием, имели овальную (7д, 8д) и круглую форму (11д, 15д).

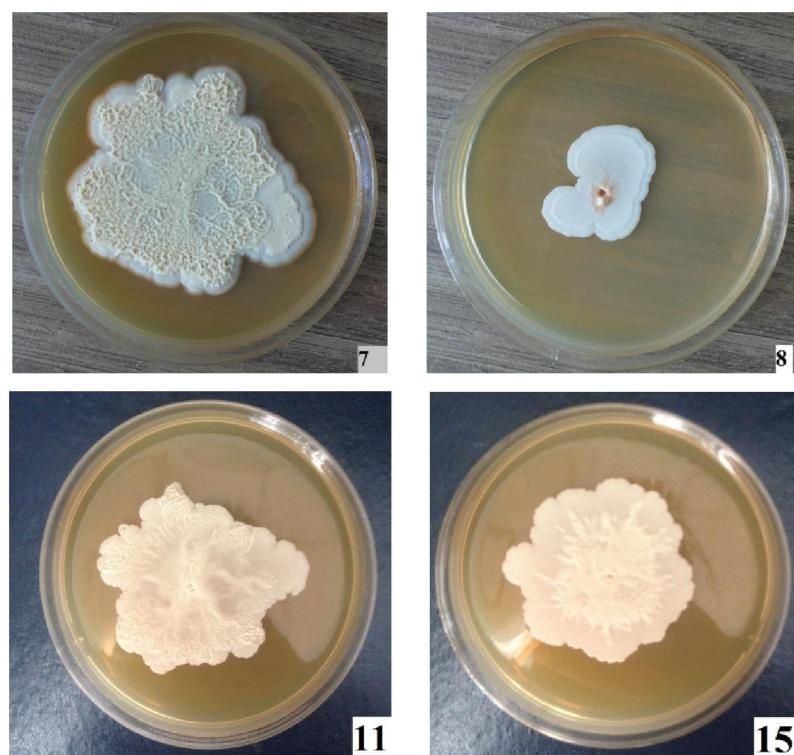


Рисунок 1 – Макроморфология дрожжевых культур

У всех исследуемых культур присутствовали аскоспоры, баллистоспоры не обнаружены. Исследуемые штаммы при росте на картофельно-глюкозном агаре на 3-5 сутки культивирования образовывали псевдомицелий (рисунок 2).

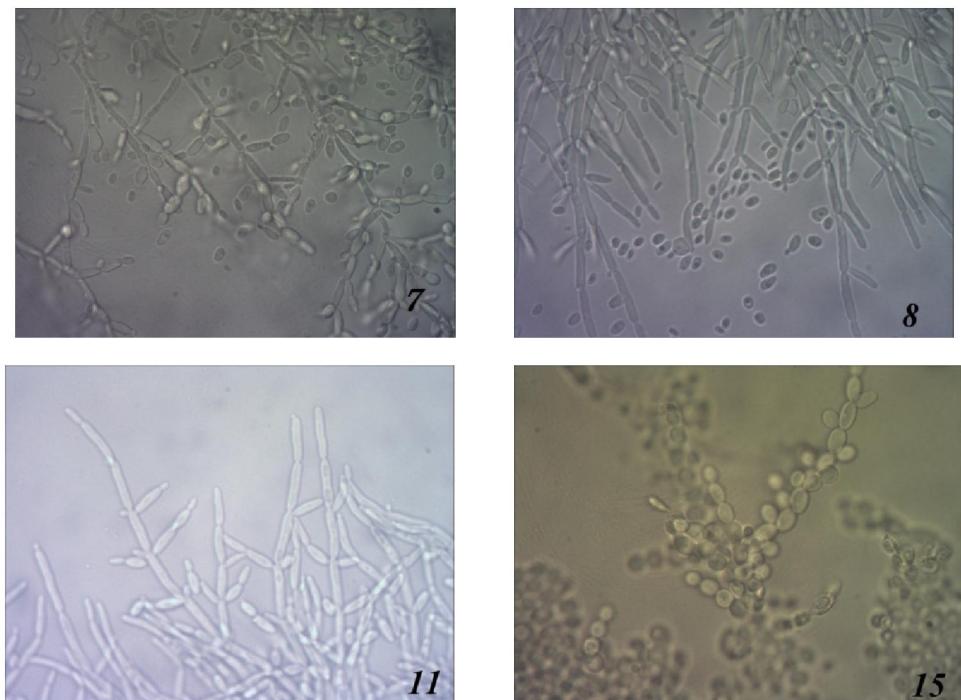


Рисунок 2 – Мицелий дрожжевых культур (среда картофельно-глюкозный агар)

Изучение галотолерантности изучаемых дрожжей показало, что все они способны расти в среде с содержанием NaCl до 10 %, два штамма 7д и 15д выдерживали концентрацию до 15%. Термофильных культур среди исследуемых штаммов дрожжей не выявлено, режим культивирования составил 20-34<sup>0</sup>С. Осмотолерантность проявлялась у штаммов 7д, 11д, 15д при росте на дрожжевом агаре с содержанием сахарозы в количестве 50%. Кислотообразующая способность так же, как и протеолитическая активность, отмечалась у штаммов 11д и 15д. Гидролиз липидов на 30 сутки при росте на среде Городковой осуществлялся штаммами 8д и 11д.

На основании изучения культуральных, морфологических и физиологических признаков проведена идентификация выделенных штаммов дрожжей. Все исследуемые штаммы являются представителями рода *Candida*.

У отобранных и идентифицированных штаммов дрожжей гравиметрическим методом была определена степень деструкции нефти (таблица 2).

Таблица 2 – Деструкция нефтяной смеси дрожжевыми культурами

Культура	Степень деструкции, %
7д	39,7
8д	51,8
11д	60,3
15д	51,0
Контроль	18,8

Установлено, что при культивировании на минеральной среде они утилизировали 39,7-60,3% нефти. У двух штаммов 8д и 15д активность была на одном уровне, степень деструкции составила 51,0-51,8%. Наиболее активной была культура 11д, которая утилизировала 60,3% нефти.

**Выводы.** Таким образом, из прибрежных вод, донных осадков и прилегающих почв Каспийского моря было выделено 18 дрожжевых изолятов. В результате проведенного скрининга было отобрано 4 активные культуры, которые были идентифицированы как представители рода *Candida*. Гравиметрический анализ содержания остаточной нефти в среде после их инкубирования в течение 14 суток показал, что они деградировали нефть на 39,7-60,3%. Самым активным был штамм 11д. Для дальнейших исследований отобраны три штамма 8д, 11д и 15д, которые будут использованы для составления бактериально-дрожжевых ассоциаций, способных эффективно утилизировать нефть в прибрежных экосистемах.

**Источник финансирования исследований.** Министерство образования и науки Республики Казахстан.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Колесниченко А.В. Процессы биодеградации в нефтезагрязненных почвах – М.: Промэкобезопасность, 2004. - 194 с.
- [2] Оборин А.А. Нефтезагрязненные биогеоценозы (процессы образования, научные основы восстановления, медико-экологические проблемы). - Пермь, 2008. - 511 с.
- [3] Салангина Л.А. Изменение свойств почв под воздействием нефтезагрязнения и разработка системы мер по их реабилитации: Дис. ...д-ра биол. наук: 06.01.03. – Екатеринбург, 2003. - 486 с.
- [4] Шаркова С.Ю., Полянская Е.А., Парфенова Е.А. Состояние микробного комплекса почв при нефтезагрязнении // Известия Пензенского государственного педагогического университета им. В.Г. Белинского. – Пенза, 2011. - №25. – С. 614-617.
- [5] Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P. Recent advances in petroleum microbiology // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003 - V. 67. - № 4. - P. 503-549.
- [6] Рахимова Э.Р., Осипова А.Л., Зарипова С.К. Очистка почвы от нефтяного загрязнения с использованием денитрифицирующих углеводородокисляющих микроорганизмов // Прикладная биохимия и микробиология, 2004. - Т. 40. - № 6. – С. 649-653.
- [7] Бельков В.В. Биоремедиация: принципы, проблемы, подходы // Биотехнология. — 1995. - № 3. - С. 20-27.
- [8] Сидоров А.В., Морозов Н.В. Биодеградация углеводородов нефти и нефтепродуктов отселекционированными углеводородокисляющими микроорганизмами // Фундаментальные исследования. - 2006. - № 11. – С. 74-75.
- [9] Desai J., Banat I. Microbial production of surfactants and their commercial potential // Microbiol. and Molecular Biology Reviews. - 1997. - Vol. 61, № 1. - P. 47-64.
- [10] Lima T.M., Procopio L.C., Brandao F.D., Carvalho A.M., Totola M.R., Borges A.C. Biodegradability of bacterial surfactants // Biodegradation. – 2011. – Vol. 22, № 3. - P. 585-592.
- [11] Коронелли Т.В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводородов в окружающей среде // Прикладная биохимия и микробиология. - 1996. - № 6. - С. 579-585.
- [12] Арене В.Ж., Саушин А.З., Гридин О.М., Гридин А.О. Очистка окружающей среды от углеводородных загрязнений. – М.: Интербук. – 1999. – 315 с.
- [13] Врагова Е.В. Сравнительный анализ эффективности биопрепараторов для очистки торфа от нефтяного загрязнения // Мир науки, культуры, образования. – 2011. - № 3. – С. 317-319.
- [14] S.A. Aitkeldieva, E.R. Faizulina, A.A. Kurmanbaev, O.N. Auezova, Zh.A. Baigonusova, L.G. Tatarkina, T.Sh. Zaitova, A.K. Sadanov The Influence of associations of hydrocarbon oxidizing microorganisms to the microbial cenosis and oil destruction in soil // Natural Science. – 2012. – Vol. 4, N10. – P. 784-788.
- [15] Патент 2053205 РФ, МКИ C 02 F 3/34. Биопрепарат для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов / М.Д. Болонин, Е.А. Рогозин, Р.М. Свечина; заявитель и патентообладатель Всероссийский нефтяной научно-исследовательский геологоразведочный институт. - № 94034274/13; заявл. 03.09.1994; опубл. 27.01.1996, Бюл. № 3. – 3 с.
- [16] Nitu S., Banwari L. Isolation of a novel yeast strain *Candida digboiensis* TERI ASN6 of degrading petroleum hydrocarbons in acidic conditions // Journal of environmental management. – 2009. – Vol. 90. – P.1728-1736.
- [17] Практикум по микробиологии / Под.ред. А.Н. Нетрусова. – М.: Academia, 2005. – 597 с.
- [18] Бабьева И.П., Голубев В.И. Методы выделения и идентификации дрожжей. – М.: Пищевая промышленность, 1979. – 120 с.
- [19] Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. – М.: МГУ, 1992. – 96с.

## REFERENCES

- [1] Kolesnichenko A.V. Biodegradation processes in contaminated soils - M .: Promekobezopasnost, 2004. - 194 p. (in Russ.).
- [2] Oborin A.A. Oily biogeocoenoses (formation processes, the scientific basis of recovery, medical and environmental problems). - Perm, 2008. - 511 p. (in Russ.).
- [3] Salanginas L.A. Changing the properties of soils under the influence of oil pollution and the development of measures for their rehabilitation: Dis. ... Dr. biol. Sciences: 06.01.03. - Ekaterinburg, 2003. - 486 p. (in Russ.).
- [4] Sharkova S.Yu., Polyanskova E.A., Parfenova E.A. Status microbial complex of oil-contaminated soils at // News of Penza State Pedagogical University. V.G. Belinsky. - Penza, 2011. - №25. - p. 614-617. (in Russ.).

- [5] Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2003**, 67, 503-549 (in Eng.).  
[6] Rakhimova E.R., Osipova A.L., Zaripova S.K. Cleaning soil from oil pollution with denitrifying microorganisms hydrocarbon // Applied Biochemistry and Microbiology, 2004. - V. 40. - № 6. - p. 649-653. (in Russ.).  
[7] Bel'kov V.V. Bioremediation: Principles, Problems and Approaches // Biotechnology. - 1995. - № 3. - p. 20-27. (in Russ.).  
[8] Sidorov A.V., Morozov N.V. Biodegradation of petroleum hydrocarbons and petroleum hydrocarbon oxidizing selected microorganisms // Basic Research. - 2006. - № 11. - p. 74-75. (in Russ.).  
[9] Desai J., Banat I. *Microbiol. and Molecular Biology Reviews.*, **1997**, 61, 47-64 (in Eng.).  
[10] Lima T.M., Procopio L.C., Brandao F.D., Carvalho A.M., Totola M.R., Borges A.C. *Biodegradation*, **2011**, 22, 3, 585-592 (in Eng.).  
[11] Coronelli T.V. Principles and methods of intensification of hydrocarbon biodegradation in the environment // Applied Biochemistry and Microbiology. - 1996. - № 6. - p. 579-585. (in Russ.).  
[12] Arene V.Zh., Saushin A.Z., Gridin O.M., Gridin A.O. Purification environment from hydrocarbon contamination. - M.: Interbuk. - 1999. - 315 p. (in Russ.).  
[13] Vragova E.V. Comparative analysis of the effectiveness of biological products for the treatment of peat from oil pollution // The world of science, culture and education. - 2011. - № 3. - p. 317-319. (in Russ.).  
[14] Aitkeldieva S.A., Faizulina E.R., Kurmanbaev A.A., Auezova O.N., Baigonusova Zh.A., Tatarkina L.G., Zaitova T.Sh., Sadanov A.K. *Natural Science*, **2012**, 10, 784-788.  
[15] Patent 2053205 RF MCI C 02 F 3/34. Biological product for purification of soil and water from oil and oil / MD Bolonin, EA Rogozin, P.M. Svechin; applicant and patentee Russia Petroleum Research Exploration Institute. - № 94034274/13; appl. 03/09/1994; publ. 27.01.1996, Bull. Number 3. - 3. (in Russ.).  
[16] Nitu S., Banwari L. *Journal of environmental management*, **2009**, 90, 1728-1736 (in Eng.).  
[17] Workshop on microbiology / psychology. A.N. Netrusov. - M.: Academia, 2005. - 597 p. (in Russ.).  
[18] Babeva I.P., Golubev V.I. Methods for isolating and identifying yeasts. - M.: Food Industry, 1979. - 120p. (in Russ.).  
[19] Babeva I.P., Chemov I.Yu. Biology yeast. - M.: MSU, 1992. - 96p. (in Russ.).

## **ҚАСПИЙ ТЕҢІЗІНЕҢ БӨЛІНІП АЛЫНГАН АШЫТҚЫ КУЛЬТУРАЛАРЫНЫң МҰНАЙТОТЫҚТЫРҒЫШ БЕЛСЕНДІЛІГІН БАҒАЛАУ**

**С. А. Айткельдиева, М. М. Шорманова, Т. В. Кузнецова,  
Э. Р. Файзуллина, О. Н. Аузрова, А. К. Саданов**

РМК «Микробиология және вирусология институты» ҚР БФМ ФК, Алматы, Қазақстан

**Тірек сөздер:** мұнайтотықтырғыш микроорганизмдер, ашытқылар, мұнайтотықтырғыш белсенділік, мұнай құрылымының бұзылу.

**Аннотация.** Қазіргі таңда қоршаған органды мұнай мен мұнай өнімдерімен ластануы орасан зор масштабқа жетті. Мұнай көмірсутектері, су бетінде қалқып жүретін мұнай дақтары, су тубіне шөккен ауыр фракциялар секілді түрлі ластаушы формаларды түзе отырып, ішкі су қоймалары мен теніздердің негізгі ластаушылары болып табылады және аэробты биотандың тіршілігін айтарлықтай бұзады. Осыған орай, мұнаймен ластанған аймақтарды табиғи қайта қалпына келтіру мүмкіндіктерінің проблемалары өзекті. Әлемдік практикада қоршаған органды мұнай мен мұнай өнімдерінен тазарту үшін, жоғары белсенді мұнай құрылымын бұзатын микроорганизмдерді қолдану негізіндегі, биотехнологиялық әдістер кеңінен қолданылады.

Жағалаулық әкожүйелдердегі мұнайды тиімді ыдыратуға қабілетті, бактерия-ашытқы ассоциациясын жасау мақсатымен, теңіз суынан, су түбіндегі шөгінділерден және Қаспий теңізінің жағасындағы топырактан 18 ашытқы изоляттары белініп алынды. Скрининг жүргізу иттихесінде белсенді 4 культура сұрыпталынды. Олардың морфологиялық және физиологиялық-биохимиялық қасиеттері зерттеліп, соның негізінде олар *Candida* туысының екілдері ретінде анықталды. 14 тәуліктік инкубациядан кейінгі мұнай құрамына жасалған гравиметриялық талдау, бұл штамдардың мұнайды 39,7-60,3% ыдыратқандығы анықталды. Ең белсенді штамм 11 д болып табылады.

*Поступила 02.02.2016 г.*