BULLETIN OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
ISSN 1991-3494
Volume 3, Number 361 (2016), 56 – 60

ISOLATION AND SELECTION OF MICROORGANISMS-DESTRUCTORS OF OIL AND PETROLEUM PRODUCTS

G. A. Spankulova, A. K. Sadanov, C. A. Aitkeldiyeva, O. N. Auezova

RSOE "Institute of Microbiology and Virology" CS MES RK, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: guleke75@mail.ru

Keywords: oil, fuel oil, diesel fuel, motor oil, destructive activity, a culture of microorganisms-destructors.

Abstract. Of the oil-contaminated soil of Kumkol field there were isolated microorganisms capable of utilizing oil and petroleum products. Conducted gravimetric analysis allowed to determine degree of utilization of these hydrocarbons. The most active isolated cultures showed when incubated with fuel oil, in this case destruction is more than 80%. Some cultures have consumed more than 60% of these compounds. The most persistent to degradation were motor oils, the percentage of utilization of which did not exceed 46%.

УДК 579.66:579.68:579.083.13

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОТБОР МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

Г. А. Спанкулова, А. К. Саданов, С. А. Айткельдиева, О. Н. Ауэзова

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

Ключевые слова: нефть, мазут, дизельное топливо, моторные масла, деструкционная активность, культуры микроорганизмов-деструкторов.

Аннотация. Из нефтезагрязнённой почвы месторождения Кумколь были выделены микроорганизмы, способные утилизировать нефть и нефтепродукты. Проведенный гравиметрический анализ позволил определить степень утилизации этих углеводородов. Наибольшую активность выделенные культуры показали при инкубировании с мазутом, деструкция при этом превышала 80%. Примерно на одном уровне проходила утилизация нефти и дизельного топлива. Отдельные культуры потребляли свыше 60% этих соединений. Самыми стойкими для деградации оказались моторные масла, процент утилизации которых не превышал 46%.

Введение. Нефть и нефтепродукты на сегодняшний день являются одним из приоритетных загрязнителей окружающей среды в Казахстане. Поступление в окружающую среду котельного и дизельного топлива, моторных масел, мазута и горюче-смазочных материалов в связи с расширением автотранспортных парков, увеличение числа автозаправочных станций (АЗС) и станций технического обслуживания (СТО), промышленных предприятий приводят к возрастанию содержания нефти и нефтепродуктов в природных объектах. Их разливы вызывают гибель организмов, изменение свойств экосистем и деградацию почв [1-3].

Естественное самоочищение природных экосистем происходит обычно с недостаточно высокой скоростью. Нефть и все нефтепродукты оказывают резкую депрессию функциональной активности почвенной флоры и фауны [4]. Поэтому оздоровление окружающей среды нефтедобывающих регионов Казахстана становится неотложной государственной задачей. В этой связи особо актуальной становится проблема восстановления и реабилитации почв нефтедобывающих районов Республики Казахстан с помощью биотехнологических методов биоремедиации [5].

В настоящее время одним из наиболее перспективных методов очистки загрязненных почв от нефти и нефтепродуктов является использование микроорганизмов-деструкторов углеводородов. Впоследнее время успешно применяются биопрепараты на основе микроорганизмов, которые характеризуются высокой способностью к утилизации углеводородов нефти и нефтепродуктов. Внесение таких биопрепаратов приводит к ускорению очистки почв от нефти и нефтепродуктов [1, 6]. Ведущая роль в этом методе принадлежит микроорганизмам, способным использовать углеводороды нефти в качестве единственного источника углерода и энергии. В связи с этим актуальным является выделение активных углеводородокисляющих микроорганизмов из загрязненных почв для использования их в биоремедиации различных экосистем.

Цель работы: скрининг углеводородокисляющих микроорганизмов, выделенных из нефтезагрязнённой почвы Кумкольского месторождения, и отбор культур, способных активно утилизировать нефть, мазут, дизельное топливо и машинное масло.

Объекты и методы исследований

Объектами исследований служили почва месторождения Кумколь, загрязнённая нефтью и выделенные из неё культуры углеводородокисляющих микроорганизмов. В работе использовали нефть этого же месторождения, мазут, дизельное топливо и два вида моторного масла. Все углеводороды вносили в колбы в стерильном виде.

Выделение проводили методом накопительных культур с использованием селективной микробиологической среды Ворошиловой-Дианową (ВД) следующего состава (г/л): NH_4NO_3 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; KH_2PO_4 – 1,0;$MgSO_4$ – 0,2; $CaCI_2{\times}6H_2O$ – 0,02; NaCl – 10,0; $FeCI_3$ – следы; Ph – 7,0-7,2. Накопительные культуры помещали в условия аэрации на качалку с амплитудой 180 об/мин. В качестве единственного источника углерода вносили 1 % (по объёму) соответствующего углеводорода [7].

Культивирование микроорганизмов проводили в колбах Эрленмейера, содержащих 100 мл среды, на круговой качалке (180 об/мин) при 24-28 ^{0}С в течение 14 суток. Инкубирование колб с нефтью и нефтепродуктами производили суспензией микроорганизмов (5 мл на 100 среды). В качестве контроля использовали колбы со средой и нефтепродуктами без микроорганизмов. При первичном скрининге оценку деструкционной активности проводили визуально по бальной шкале. У отобранных активных культур степень деструкции нефти и нефтепродуктов определили гравиметрическим методом [8] с использованием аналитических весов «OHAUS» ExplorerEX 124 (США) при экстрагировании хлороформом.

Результаты и обсуждение

В связи с проблемой загрязнения окружающей среды нефтью и нефтепродуктами актуальным является выделение новых активных микробных культур с высокой метаболической активностью, способных утилизировать как сырую нефть, так и её производные. На месторождении Кумколь в Кызылординской области были отобраны образцы сильно загрязнённой почвы, из них выделены углеводородокисляющие бактериальные культуры способные расти на нефти этого месторождения, дизельном топливе, мазуте и двух типах моторных масел. Первоначально было выделено 182 изолята. После повторного скрининга этих культур отобрано 46 штаммов, которые инкубировали в колбах с жидкой средой ВД и различными нефтепродуктами (таблица 1).

Способность роста оценивали визуально по бальной системе. При потреблении нефти и нефтепродуктов изучаемыми микроорганизмами в жидкой среде происходили значительные изменения их физико-химических свойств по сравнению с контролем. При интенсивном росте (4 балла) наблюдалось полное разрушение углеводородной плёнки. Нефть и нефтепродукты сильно видоизменились и превращались во взвесь мельчайших частиц, при этом накапливалась значительная бактериальная биомасса.

Результаты, приведенные в таблице 1, показали, что наилучшие результаты при инкубировании с нефтью показали 19 культур, с мазутом – 19, дизельным топливом – 21, моторными маслами №1 и №2 – 19 и 20 культур, соответственно. 25 изучаемых культур проявили способность активно трансформировать несколько углеводородов.

Таблица 1 – Рост выделенных культур с нефтью и нефтепродуктами

Штаммы	Нефть	Мазут	Дизельное топливо	Моторное масло № 1	Моторное масло № 2		Штаммы	Нефть	Мазут	Дизельное топливо	Моторное масло № 1	Моторное масло № 2
5/1	+	+	++++	++	++		13/5	-	-	-	++++	++
6/2	+	+	+	++++	+++		13/6	++++	++	+	++++	++++
6/3	+	+	+	++	++++		13/7	-	-	-	++++	++
6/4	++	++++	+	+	+		13/8	++++	++++	++++	+++	++++
7/4	+	++	++++	+	+		13/9	+	++	++++	++++	+++
9/2	++	++	++	++++	++		13/10	++	++++	++++	++	+++
10/1	++++	++++	++	+++	++++		13/11	++	+++	-	++++	++
10/2	++	++	+	++	++++		13/12	++	+	-	++++	++
10/3	++	++++	++	+++	+++		13/13	++	+++	-	++++	+++
11/2	++++	+	++++	+	+		13/15	++	+++	-	++++	+++
11/3	++	+	++++	+	+		14/1	++++	+	++++	++++	++++
11/5	+	+	+	++++	+		14/2	++++	++++	++	++	+
12/1	++++	++	++	++	++		14/3	++++	++++	++++	++	++++
12/3	+++	+++	++++	+++	+++		14/4	+	++++	++++	++++	++++
12/4	++++	++++	++++	++++	++		15/1	++++	++++	++++	+++	++++
12/5	++++	++++	++++	++++	++++		15/2	++++	++++	++++	++++	++++
12/6	++++	++++	++	+++	++++		15/3	++++	++++	++	+++	++
12/7	+++	+++	++++	+++	++++		16/1	++++	++++	++++	-	-
12/8	++	-	++++	+++	++		16/2	-	-	++++	++++	++
12/9	++++	-	++	+++	++++		16/3	++++	++++	+	++	++++
13/1	-	-	++	++++	++++		1D/1	++++	++++	+	++	++++
13/2	-	++++	-	++++	++++		1D/2	+++	+++	++++	+++	++
13/4	++++	++++	++++	+++	++++		1D/3	++	+	++	+++	++++

Примечание. – - отсутствие роста, + - плохой рост, ++ -слабый рост, +++ - хороший рост, ++++ - интенсивный рост.

У всех культур, проявивших способность к интенсивному росту на нефти и нефтепродуктах, была изучена углеводородокисляющая активность гравиметрическим методом (таблицы 2, 3). Из приведенных данных видно, что степень деструкции нефти за 14 суток составляла 43,4-65,7%. Естественная убыльпри этом составляла – 14,1%. Наиболее активными культурами, способными утилизировать свыше 50 % нефти были 12/5, 13/6, 14/2, 14/3, 16/1, 16/3, 1D/1.

Естественная убыль мазута(контроль) в эксперименте была выше, чем сырой нефти – 26,5 %. Рост отобранных культур в жидкой среде с этим нефтепродуктом был более интенсивным, при этом утилизация мазута составляла 47,5 -88,8 %.

Следует отметить, что из 19 проверенных культур 15 проявляли достаточно высокую активность – более 60 %. Культуры 6/4, 12/6, 14/4, 15/3 утилизировали более 80 % мазута.

Деструкция дизельного топлива выделенными культурами была несколько слабее, из 21 проверенной культуры только 5 штаммов утилизировали дизельное топливо свыше 50 %, у остальных проверенных культур процент утилизации составлял от 34,6-49,9 %. Наиболее активно утилизировали дизельное топливо культуры 12/5,12/7,13/8, 14/1, 14/3.

Самыми труднодоступными для деградации углеводородами оказались моторные масла. Утилизация моторного масла №1 колебалась в пределах 32,2-45,8% при контроле 8,5%, ни одна из проверенных культур не утилизировала этот нефтепродукт свыше 50 %.

Самыми труднодоступными для деградации углеводородами оказались моторные масла. Утилизация моторного масла №1 колебалась в пределах 32,2-45,8% при контроле 8,5%, ни одна из проверенных культур не утилизировала этот нефтепродукт свыше 50 %.

Такая же тенденция отмечена и при деструкции моторного масла №2, из 20 проверенных 16 культур показали деструкцию этого масла более 40%, при контроле 8,9%.

Таблица 2 – Деструкция нефти и мазута выделенными углеводородокисляющими культурами

Штаммы	Степень деструкции нефти, %	Штаммы	Степень деструкции мазута, %
10/1	46,5	6/4	81,6
11/2	47,0	10/1	49,2
12/1	46,6	10/3	48,6
12/4	45,4	12/4	68,4
12/5	64,4	12/5	71,9
12/6	49,3	12/6	81,5
12/9	47,2	13/2	73,2
13/4	47,1	13/4	74,6
13/6	51,7	13/8	62,9
13/8	48,3	13/10	47,5
14/1	45,8	14/2	77,8
14/2	55,8	14/3	64,8
14/3	56,7	14/4	81,2
15/1	43,4	15/1	48,9
15/2	48,9	15/2	70,7
15/3	48,0	15/3	88,8
16/1	56,0	16/1	62,6
16/3	65,7	16/3	72,0
1D/1	56,5	1D/1	73,7
Контроль	14,1	Контроль	26,5

Таблица 3 – Деструкция дизельного топлива и моторных масел выделенными углеводородокисляющими культурами

Штаммы	Степень деструкции дизельного топлива, %	Штаммы	Степень деструкции моторного масла №1, %	Штаммы	Степень деструкции моторного масла №2, %
5/1	47,2	6/2	46,8	6/3	41,8
7/4	46,3	9/2	43,9	10/1	46,1
11/2	34,6	11/5	39,5	10/2	43,4
11/3	44,8	12/4	44,2	12/5	42,2
12/3	45,7	12/5	32,2	12/6	45,8
12/4	44,9	13/1	44,6	12/7	44,1
12/5	69,1	13/2	35,7	12/9	42,6
12/7	63,2	13/5	42,4	13/1	40,7
12/8	49,8	13/6	41,6	13/2	41,4
13/4	45,1	13/7	44,3	13/4	33,5
13/8	51,2	13/9	42,7	13/6	37,1
13/9	45,2	13/11	43,3	13/8	31,7
13/10	44,1	13/12	38,6	14/1	45,3
14/1	65,7	13/13	44,1	14/3	44,5
14/3	64,0	13/15	42,1	14/4	37,6
14/4	47,7	14/1	45,4	15/1	47,2
15/1	48,3	14/4	33,3	15/2	40,4
15/2	45,3	15,2	35,8	16/3	42,1
16/1	43,9	16/2	34,7	1D/1	43,3
16/2	46,5	Контроль	8,5	1D/3	44,2
1D/2	49,4			Контроль	8,9
Контроль	25,9				

Заключение. Таким образом, из нефтезагрязнённой почвы месторождения Кумколь было выделено 46 культур, способных в разной степеней утилизировать нефть и такие нефтепродукты, как мазут, дизельное топливо и моторные масла. Проведенный гравиметрический анализ позволил определить степень утилизации этих углеводорода. Наибольшую активность выделенные культуры показали при инкубирование с мазутом, деструкция при этом превышала 80%. Примерно на одном

уровне проходила утилизация нефти и дизельного топлива. Отдельные культуры потребляли свыше 60% этих соединений. Самыми стойкими для деградации оказались моторные масла, процент утилизации которых не превышал 46%.Несколько культур были способны к активной деструкции нескольких нефтепродуктов. Культуры 12/5, 14/3 и 16/3 показали высокую утилизирующую способность при росте на нефти, мазуте и дизельном топливе.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Shabir G., Afzala M., Anwarb F., Tahseena R., Khalida M.Z. Biodegradation of kerosene in soil by a mixed bacterial culture under differentnutrient conditions // International Biodeterioration and Biodegradation. – 2008. – Vol. 52(2). – P. 161-166.

[2] Beškoski V. P., Gojgic-Cvijovic G., Milic J., Ilic M., Miletic S.,Šolevic T., Vrvic M. M. Ex situ bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil) – afield experiment Chemosphere. – 2011. – Vol. 83. – P. 34-40.

[3] Ambrazaitienė D., Žukauskaitė A., Jakubauskaitė V., Reikaitė R., Zubrickaitė M., Karčauskienė D. Biodegradation activity in the soil contaminated with oil products // Zemdirbyste-Agriculture. – 2013. – Vol. 100, N 3. – P. 235-242.

[4] Чугунов В.А., Ермоленко З.М. Создание и применение жидкого препарата на основе ассоциации нефтеокисляющих бактерий // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – Т. 36, № 6. – С. 666-671.

[5] Айткельдиева С.А. и др. Разработка научных основ биоремедиации нефтезагрязненных почв Кызылординской области (промежуточный) // Отчет о научно-исследовательской работе. – 2012.

[6] Капотина Л.Н., Морщакова Г.Н. Биологическая деструкция нефти и нефтепродуктов, загрязняющих почву и воду // Биотехнология журнал. – 1998. – № 1. – С. 85-95.

[7] Практикум микробиологии / Под ред. Н. С. Егорова. – М.: Academia, 2005. – С. 597.

[8] Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. – М.: Химия, 1984. – 448 с.

REFERENCES

[1] Shabir G., Afzala M., Anwarb F., Tahseena R., Khalida M.Z. Biodegradation of kerosene in soil by a mixed bacterial culture under differentnutrient conditions. International Biodeterioration and Biodegradation, 2008, Vol. 52 (2), P. 161-166.

[2] Beskoski V. P., Gojgic-Cvijovic G., Milic J., Ilic M., Miletic S.. Solevic T., Vrvic M. M. Ex situ bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil) – afield experiment Chemosphere, 2011, Vol. 83 , P. 34-40.

[3] Ambrazaitienė D., Zukauskaite A., Jakubauskaite V., Reikaite R., Zubrickaite M., Karhcauskiene D. Biodegradation activity in the soil contaminated with oil products. Zemdirbyste-Agriculture, 2013, Vol. 100, №3, P. 235-242.

[4] Chugunov V.A., Ermolenko S.M. Creating and applying a liquid preparation based on the association of oil-oxidizing bacteria. Applied Biochemistry and Microbiology, 2000, Vol. 36, № 6, P. 666-671.

[5] Aitkeldiyeva S.A. and others. Development of scientific basis for bioremediation of contaminated soils of Kyzylorda oblast (intermediate). Of the research work report, Almaty, 2012.

[6] Kapotina L.N., Morschakova G.N. The biological degradation of oil and oil products, polluting soil and water, Biotechnology, 1998, № 1, P. 85-95.

[7] Practicum microbiology, ed. N.S. Egorov. M.: Academia, 2005, P.597.

[8] Lurie Y.Y. Analytical chemistry and industrial waste water. M.: Chemistry, 1984, P. 448.

МҰНАЙ ЖӘНЕ МҰНАЙ ӨНІМДЕРІН ДЕСТРУКЦИЯЛАУШЫ-МИКРООРГАНИЗМДЕРДІ БӨЛІП АЛУ ЖӘНЕ ІРІКТЕУ

Г. Ә. Спанқұлова, А. Қ. Саданов, С. А. Айткелдиева, О. Н. Әуезова

РМК «Микробиология және вирусология институты» ҒК БҒМ ҚР, Алматы, Қазақстан

Түйін сөздер: мұнай, мазут, дизельді жанармай, матор майлары, деструкциялық белсенділік, деструкциялаушы-микроорганизмдер дақылдары.

Аннотация. Құмкөл кен орнын мұнаймен ластанған топырақтарынан мұнай және мұнай өнімдерін утилизациялауға қабілетті микроорганизмдер бөлініп алынды. Жүргізілген гравиметриялық анализ осы көмірсутектердің утилизациялану дәрежесін анықтауға мүмкіндік берді. Бөліп алынған дақылдар мазутпен инкубациялану кезінде ең үлкен белсенділік көрсетті, бұл кезде деструкция 80% асты. Мұнай мен дизельді жанармай шамамен бірдей деңгейде утилизацияланды. Жекелеген дақылдар осы қосылыстарды 60% жогары утилизациялады. Деградация үшін ең берік матор майлары болды, ягни утилизациялану пайызы 46 % аспады.

Поступила 05.05.2016 г.