

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет  
имени К. И. Сатпаева

Институт геологии и нефтегазового дела им. К. Турысова  
Кафедра «Химическая и биохимическая инженерия»



Бектуров Данарбек Рустамбекұлы  
Изучение особенностей колонизации нефтяных  
продуктов микроорганизмами

**ДИПЛОМНАЯ РАБОТА**

Специальность 6В05101 – «Химическая и биохимическая инженерия»

Алматы 2023

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН  
Казахский национальный исследовательский технический университет имени К.И.Сатпаева  
Институт геологии и нефтегазового дела им. К.Турсырова  
Кафедра «Химическая и биохимическая инженерия»

**ДОПУЩЕН К ЗАЩИТЕ**  
Заведующий кафедрой «Химическая  
и биохимическая инженерия» доктор  
Ph.D.  
А.А.Амитова  
2023г

### ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

На тему: «Изучение особенностей колонизации нефтяных  
продуктов микроорганизмами»

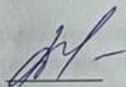
По специальности 6B05101 – Химическая и биохимическая инженерия

Выполнил



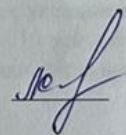
Бектуров Д.Р

Научный руководитель



Джамалова Г.А.,  
к. с/х н., доцент,  
ассоциированный  
профессор

Рецензент



Курбанова Л.С, к.т.н.,  
и.о. доцента кафедры  
ЮНЕСКО по  
устойчивому развитию  
КазНУ им. Аль-Фараби

Алматы 2023

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет имени К.И.Сатпаева  
Институт геологии и нефтегазового дела им. К.Турьсова  
Кафедра «Химическая и биохимическая инженерия»  
Специальность 6В05101 – Химическая и биохимическая инженерия



УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой «Химическая  
и биохимическая инженерия» доктор  
Ph.D.  
А.А.Амитова

«    »    2023г

#### ЗАДАНИЕ

на выполнение дипломной работы

Обучающемуся Бектуров Данарбек Рустамбекұлы

Тема: Изучение особенностей колонизации нефтяных продуктов микроорганизмами

Утверждена приказом № от г.

Срок сдачи законченной работы 16 мая 2023 г.

Исходные данные к дипломной работе

Краткое содержание дипломной работы:

- а) Введение: обосновывается актуальность работы, научная и практическая значимость исследования, изложены цели и задачи.
- б) Объект и методика исследования: дана характеристика объекту исследования, описаны приемы и методы исследования, а также оборудование, использованное в исследовании.
- в) Результаты, заключение и выводы исследования: описаны полученные результаты исследования, даны заключения и выводы

Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):

представлены 8 слайдов презентации работы, 10 рисунков и 7 таблиц

Рекомендуемая основная литература: из 62 наименований

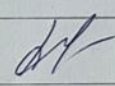
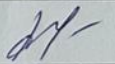


**ГРАФИК**  
подготовки дипломной работы (проекта)

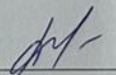
Наименование разделов, перечень разрабатываемых вопросов	Сроки представления научному руководителю	Примечание
Введение. Обзор литературы	17 февраля 2023	выполнено
Материал и методика исследований	15 марта 2023	выполнено
Результаты исследования. Заключение и выводы	10 мая 2023	выполнено

**Подписи**

консультантов и нормоконтролера на законченную дипломную работу  
(проект) указанием относящихся к ним разделов работы (проекта)

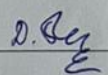
Наименования разделов	Консультанты, И.О.Ф. (уч. степень, звание)	Дата подписания	Подпись
Основная часть	Джамалова Г. А., к.с.х.н., доцент, ассоц.проф.	10.05.23.	
Нормоконтролер	Джамалова Г. А., к.с.х.н., доцент, ассоц.проф.	02.06.23.	

Научный руководитель, к.с.х.н.,  
доцент

  
\_\_\_\_\_

Джамалова Г. А.

Задание принял к исполнению  
обучающийся

  
\_\_\_\_\_

Бектуров .Д

## АННОТАЦИЯ

Дипломная работа, включающая введение и три раздела, изложена на 34 страницах машинописного текста, содержат 10 рисунков и 7 таблиц.

Целью работы является изучение особенностей колонизации нефтепродуктов микроорганизмами на автозаправочных станциях.

Полученные результаты:

1 Изучение биологических и технологических свойств микроорганизмов, колонизирующие нефтепродукты было проведено на основе аналитических исследований 62 научной литературы.

2 Общая обсемененность для исследуемых нефтепродуктов была менее 10, при этом в керосине микромицетов и актиномицетов обнаружено не было.

3 Изучение культуральных свойств колоний, выросших на твердой питательной среде, показало, что колонии, выделенные из бензина, отличаются от колоний, выделенных из керосина по размеру, прозрачности, контуру, профилю и структуре.

## АНДАТПА

Кіріспе мен үш бөлімнен тұратын дипломдық жұмыс баспа мәтінінің 34 бетінде көрсетілген, 10 сурет пен 7 кестеден тұрады.

Жұмыстың мақсаты-жанармай құю станцияларында микроорганизмдердің мұнай өнімдерін отарлау ерекшеліктерін зерттеу.

Алынған нәтижелер:

1 Мұнай өнімдерін колонизациялайтын микроорганизмдердің биологиялық және технологиялық қасиеттерін зерттеу 62 ғылыми әдебиеттің аналитикалық зерттеулері негізінде жүргізілді.

2 Зерттелетін мұнай өнімдерінің жалпы тұқымы 10-нан аз болды, керосинде микромицеттер мен актиномицеттер табылған жоқ.

3 Қатты қоректік ортада өсірілген колониялардың мәдени қасиеттерін зерттеу бензиннен оқшауланған колониялардың мөлшері, мөлдірлігі, контуры, профилі және құрылымы бойынша керосиннен оқшауланған колониялардан ерекшеленетінін көрсетті.

## ANNOTATION

The thesis, which includes an introduction and three sections, is presented on 34 pages of typewritten text, contains 10 figures and 7 tables.

The aim of the work is to study the features of colonization of petroleum products by microorganisms at gas stations.

The results obtained:

1 The study of biological and technological properties of microorganisms colonizing petroleum products was carried out on the basis of analytical studies of 62 scientific literature.

2 The total contamination for the studied petroleum products was less than 10, while no micromycetes and actinomycetes were found in kerosene.

3 The study of the cultural properties of colonies grown on a solid nutrient medium showed that colonies isolated from gasoline differ from colonies isolated from kerosene in size, transparency, contour, profile and structure.

## СОДЕРЖАНИЕ

	Введение	1
1	Обзор литературы	2
1.1	Особенности колонизации нефтепродуктов	2
1.2	Биологические и технологические свойства микроорганизмов, колонизирующие нефтепродукты	4
1.3	Биоремедиация нефтепродуктов	7
2	Объект и методика исследования	10
2.1	Объект и материалы исследования	10
2.1.1	Объект исследования	10
2.1.2	Посуда	10
2.1.3	Оборудование	10
2.2	Методики исследования	14
2.2.1	Технология исследования исследуемых образцов к посеву	14
2.2.2	Посев	15
2.2.3	Расчет полученных результатов	15
3	Результаты исследования	17
	Заключение и выводы	21
	Приложение А	22
	Приложение Б	23
	Приложение В	24
	Список литературы	25



## ВВЕДЕНИЕ

Бактерии, которые естественным образом существуют в воде и почве, способны разлагать токсичные нефтяные углеводороды в различных условиях окружающей среды [1]. Кроме того, бактерии, подвергшиеся воздействию таких токсичных соединений, адаптируются, демонстрируя более высокие показатели биодegradации по сравнению с бактериями из незагрязненных мест [2]. Было описано несколько адаптивных механизмов (например, модификации мембраны или изменения общего энергетического статуса, модификации морфологии клеток и свойств клеточной поверхности, активная экскреция, индукция анаболических путей) для бактерий, способных выживать в присутствии токсичных нефтяных углеводородов [3].

Актуальность работы. На автозаправочных станциях (АЗС) высокая обсемененность нефтепродуктов приводит, с одной стороны, к повреждению топливораздаточных колонок, с другой – коррозионному износу трубопроводов и резервуаров. Поэтому выбранная тема актуальна для изучения.

Целью работы является изучение особенностей колонизации нефтепродуктов микроорганизмами на автозаправочных станциях.

Задачи:

1 Изучение биологических и технологических свойств микроорганизмов, колонизирующие нефтепродукты.

2 Изучение особенностей колонизации нефтепродуктов микроорганизмами.

3 Изучение культуральных свойств колоний, выросших на твердой питательной среде.

Научным и прикладным значением работы является возможность использования полученных результатов для дальнейшего изучения тематики.

Структура и объем. Дипломная работа, включающая введение и три раздела, изложена на 34 страницах машинописного текста, содержат 10 рисунков и 7 таблиц.

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Особенности колонизации нефтепродуктов

Нефть является основным источником энергии, используемым в ряде отраслей промышленности и в нашей повседневной жизни [4]. Состав зависит от происхождения нефти; тяжелая нефть обычно имеет высокое содержание углерода, металлов и асфальтенов и менее стабильна химически, чем более легкая нефть [5].

Из нефти получают множество нефтепродуктов. Бензин - представляет собой сложную смесь углеводородов, которые обычно кипят при температуре ниже 200 °С (390 °F). Углеводородными компонентами в этом диапазоне кипения являются те, которые имеют в своей молекулярной структуре от четырех до двенадцати атомов углерода. Бензины сильно различаются по составу, и даже бензины с одинаковым октановым числом могут сильно отличаться по составу [6]. Автомобильный бензин представляет собой смесь низкокипящих углеводородных соединений, пригодных для использования в двигателях внутреннего сгорания с искровым зажиганием и имеющих октановое число не менее 60 [7]. Керосин, также известный как парафин, представляет собой горючую углеводородную жидкость, получаемую из нефти. Это тонкая прозрачная жидкость, состоящая из смеси углеводородов, которые кипят при температуре от 150°С до 275°С. Авиационный керосин представляет собой сложную смесь алифатических и ароматических углеводородов, получаемую из сырой нефти методом фракционной перегонки [8]. Дизельное топливо – это топливо, получаемое из нефти и состоящее в основном из алифатических углеводородов, содержащих 8-28 атомов углерода, с температурой кипения в диапазоне 130-370 °С. Это смесь фракций углеводородов, более тяжелых, чем углеводороды, содержащиеся в бензине [9].

Одной из главных особенностей колонизации нефтепродуктов является способность колонизирующих их микроорганизмов подвергать разложению углеводороды. Микроорганизмы, разлагающие углеводороды, обычно существуют в очень незначительном количестве в морской среде. Однако загрязнение нефтяными углеводородами может стимулировать рост таких организмов и вызывать изменения в структуре микробных сообществ на загрязненной территории [10].

Когда нефть и нефтепродукты разливаются в море, они растекаются по поверхности воды. Они подвергаются множеству модификаций, и состав нефти и нефтепродуктов меняется со временем. Этот процесс называется выветриванием и происходит в основном за счет испарения низкомолекулярных фракций, растворения водорастворимых компонентов, смешивания капель масла с морской водой, фотохимического окисления и биodeградации. Под воздействием солнечного света нефть подвергается фотохимическим модификациям,

приводящим к увеличению полярной фракции и уменьшению ароматической фракции [11].

Ключевые различия между биологическим разложением нефти в почвенных и водных экосистемах после разлива нефти связаны с перемещением и распределением нефти и присутствием твердых частиц, каждое из которых влияет на физическую и химическую природу нефти и, следовательно, на ее подверженность микробиологическому разложению. Разливы нефти на суше характеризуются главным образом вертикальным перемещением нефти в почву, а не горизонтальным распространением, связанным с образованием пятен. Проникновение нефти в почву предотвращает потери летучих углеводородов при испарении, которые могут быть токсичными для микроорганизмов. Твердые частицы могут снижать за счет абсорбции эффективную токсичность компонентов нефти, но абсорбция и адсорбция углеводородов до гуминовых веществ, вероятно, способствуют образованию стойких остатков [12].

Были проведены полевые эксперименты, имитирующие разлив нефти на побережье и последующую биоремедиационную обработку, и изменения в структуре микробного сообщества отслеживались с помощью DGGE ПЦР-амплифицированной 16S рДНК. Структура сообщества была изменена в результате изменения питания, и впоследствии появились популяции  $\alpha$ -Proteobacteria и типа CFB [13].

В январе 1997 года танкер "Находка" затонул в Японском море и выпустил нефть, которая загрязнила более 500 км прилегающей береговой линии. Чтобы исследовать долгосрочное влияние разлива нефти в Находке на популяции морских бактерий, были взяты пробы морской воды и остаточной нефти из зон, загрязненных нефтью, в период от 10 до 29 месяцев после аварии, и бактериальные популяции в этих образцах были проанализированы с помощью DGGE ПЦР-амплифицированных фрагментов 16S рДНК. В этих образцах, помимо штаммов протеобактерий и цианобактерий, были обнаружены типы, относящиеся к разлагателям углеводов, примером которых являются штаммы, родственные *Sphingomonas* и *Alcanivorax* [14].

Сильно загрязненные нефтью булыжники были собраны с пляжа, загрязненного в результате аварии на танкере "Находка", и помещены вместе со свежей морской водой в два крупномасштабных реактора приливного потока (резервуары для имитации пляжа), которые имитируют пляж, проходящий приливный цикл. Азотные и фосфорные удобрения добавляли в один резервуар, но не в контрольный. Были отобраны аликвоты масляной пасты с поверхности булыжников, и бактериальные популяции, которые были установлены в этих образцах, были проанализированы с помощью ПЦР и DGGE. Было продемонстрировано, что *Alcanivorax* стал доминирующей бактериальной популяцией в масляной пасте в течение одной недели после добавления

удобрений, тогда как в контрольном резервуаре рост *Alcanivorax* не наблюдался [15].

Преимущественный рост *Alcanivorax* после внесения питательных веществ также был продемонстрирован с использованием метода FISH при лабораторной инкубации образцов морской воды, загрязненных нефтью [16].

Был сделан вывод, что более высокая способность *Alcanivorax* разлагать разветвленные алканы позволила этой бактерии преобладать в нефтесодержащей морской воде [17]. *Alcanivorax* также разлагает алкилбензолы [18].

Наряду с *Alcanivorax* так же преобладает *Cycloclasticus*. В уже описанных резервуарах для имитации пляжа песчинки гравия, погруженные в морскую воду, были искусственно загрязнены сырой нефтью, и полученные в результате микробные сообщества были проанализированы с помощью ПЦР и DGGE. Было обнаружено, что *Alcanivorax* и *Cycloclasticus* являются двумя основными популяциями на поверхности покрытых маслом зерен гравия при добавлении азотных и фосфорных удобрений. Разложение ПАУ протекало параллельно с ростом клеток *Cycloclasticus* на поверхности загрязненных нефтью зерен гравия. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что бактерии, принадлежащие к роду *Cycloclasticus*, играют важную роль в разложении нефтяных ПАУ в морской среде [19].

Биодеградация ароматической фракции сырой нефти дополнительно стимулировалась, когда внеклеточные полисахариды, продуцируемые штаммом *Rhodococcus rhodochrous* S-2, использовались для добавления морской воды, содержащей ароматическую фракцию, вместе с азотными и фосфорными удобрениями. В такой культуре *Cycloclasticus* стал единственной крупной бактериальной популяцией [20].

Другой особенностью нефтепродуктивных микроорганизмов является их способность выживать в различных условиях окружающей среды.

## **1.2 Биологические и технологические свойства микроорганизмов, колонизирующие нефтепродукты**

Углеводороды в окружающей среде подвергаются биологическому разложению в первую очередь бактериями и грибами [21]. Поэтому, чтобы понять биологические и технические особенности микроорганизмов, которые колонизируют нефтепродукты, мы можем начать с изучения микроорганизмов, которые их разлагают.

Микроорганизмы, разлагающие углеводороды, включают длинный список родов, включая *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Dietzia*, *Methylobacterium* и *Rhodococcus*, среди прочих [22].

Для расщепления алифатических углеводородов широко используются виды *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Alcanivorax*, *Bacillus* и

*Arthrobacter* [23], *Amorphotheca*, *Talaromyces*, *Neosartorya* и *Graphium*, а также *Candida* также были выделены из загрязненной нефтью почвы и признаны потенциальными разлагателями углеводов. Также сообщалось, что *Aspergillus*, *Penicillium* и *Cephalosporium* обладают способностью разлагать углеводороды. После выделения из загрязненной воды было обнаружено, что *Candida lipolytica*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Geotrichum* sp и *Trichosporon mucoides* разлагают нефтяные соединения [24]. Прошло почти столетие с тех пор, как были выделены и описаны первые бактерии, разлагающие углеводороды, и самый последний список включает почти 200 родов бактерий, цианобактерий, водорослей и грибов, представляющих более 500 видов и штаммов [25].

Большинство органических загрязнителей расщепляются микроорганизмами в аэробных условиях, кислород необходим для первоначального межклеточного воздействия загрязняющего вещества, а также необходим для активации ферментативного процесса, осуществляемого оксигеназами и пероксидазами. Периферийные пути разложения шаг за шагом превращают органическое загрязнение в промежуточные продукты центрального промежуточного метаболизма, такие промежуточные продукты включают цикл трикарбоновых кислот. Синтез клеточной биомассы происходит из центральных метаболитов-предшественников, примерами которых являются сукцинат, пируват и ацетил-КоА. Глюконеогенез продуцирует сахар, необходимый для роста и биосинтеза. Ферментативный процесс, осуществляемый микроорганизмами, может быть использован для расщепления нефтяных углеводов [26].

Мы рассмотрим биологические и технические особенности микроорганизмов колонизирующих нефтепродукты на примере рода *Alcanivorax* (в частности *Alcanivorax borkumensis*) и *Cycloclasticus* (в частности *Cycloclasticus pugetii*). Оба рода относятся к типу бактерий *Pseudomonadota*, также известных как *Proteobacteria*.

*Alcanivorax borkumensis* - морская бактерия, которая использует исключительно углеводороды нефтяной промышленности в качестве источников углерода и энергии. Он встречается в небольших количествах во всех океанах мира и в больших количествах в загрязненных нефтью водах [27]. Грамотрицательные неподвижные аэробные палочки, которые обычно имеют ширину 0,6-0,8 мкм и длину 1,6-2,5 мкм при выращивании в среде с добавлением пирувата. Они короче (1,0-1,5 мкм), когда n-алканы используются в качестве единственного источника углерода и энергии. Положительный результат на оксидазу и каталазу. Алифатические углеводороды используются в качестве единственного или основного источника углерода для роста [28].

Более 250 бактерий, связанных с *Alcanivorax*, были выделены или обнаружены в виде последовательностей гена 16S рНК во всех типах морской среды: поверхностных водах, мелководных и глубоководных водоемах, донных

отложениях [29] гидротермальные источники и грязевые вулканы, флюиды земной коры на склонах хребтов и туша серого кита [30].

Организмы, подобные *Alcanivorax*, также были обнаружены в нескольких наземных средах, которые имеют общие свойства (соленость, присутствие углеводов) с морскими экосистемами; например, загрязненный селеном гиперсолевой пруд-испаритель в Калифорнии [31], соленые подземные воды в Африке и Австралии [32], углеводородные-загрязненная засоленная почва [33] и различные геотермальные зоны в Италии и США (Йеллоустоун) [34]. Такое распространение *A. borkumensis*, предположительно, обусловлено его способностью расти на многих компонентах насыщенных нефтяных фракций и на биогенных углеводородах: прямоцепочечных и разветвленных алканах, изопреноидах и алкильных соединениях с длинной боковой цепью (например, алкилмоноциклоалканах, алкилбензолах и органических алкил-серных соединениях). Штамм *A. borkumensis* SK2 разлагает прямоцепочечные алканы длиной до C-32, длинноцепочечные изопреноиды, фитан и нетронутые, а также алкилароматические углеводороды [35].

Геномный анализ штамма *A. borkumensis* SK2 выявил широкий набор генетических детерминант для усвоения минеральных питательных веществ, которые ограничены в морской среде, особенно после внезапного поступления нефти, что приводит к серьезному дисбалансу в соотношениях углерод/азот и углерод/фосфор. *A. borkumensis* кодирует широкий спектр транспортных систем. белки, среди которых детерминанты примерно для 50 пермеаз, около половины из которых являются высокоаффинными ABC-транспортными системами [36]. Ряд прочих генетических особенностей относящихся к улучшенному усвоению аммония, азота, фосфора и ряд олиго-элементов: магния, цинка, кобальта, позволяет *A. borkumensis* SK2 эффективно использовать свои алканокатаболические функции в ответ на внезапное появление углеводов и адаптироваться к возникающему дисбалансу углерода и питательных веществ (например, после разлива нефти). Эти функции могли бы объяснить конкурентное преимущество, которым пользуется *Alcanivorax* в таких обстоятельствах [37].

*Cycloclasticus*. Грамотрицательные палочковидные клетки размером 0,5 на 1-2 мкм, подвижные с помощью одного полярного жгутика. Облигатно аэробный, положительный на оксидазу и каталазу. Штаммы используют ароматические соединения, включая бифенил, нафталин, антрацен и фенантрен, в качестве единственных или основных источников углерода и энергии. Типовым и единственным видом рода является *Cycloclasticus pugetii* [38].

Штаммы *Cycloclasticus* разлагают ароматические соединения, включая нафталин, алкилнафталин, бифенил, фенантрен, флуорен и антрацен [39].

Штаммы *Cycloclasticus* разлагали более 80% C<sub>0-4</sub>-алкилнафталинов, C<sub>0-1</sub>-алкилдибензотиофенов, C<sub>1</sub>-алкилфенантрена и C<sub>0-2</sub>-алкилфлуоренов. Они также разлагали почти от 60 до 70% C<sub>2</sub>-алкилдибензотиофенов и C<sub>0</sub>-и C<sub>2</sub>-



алкилфенантронов. Уровни разложения n-алканов, C<sub>3-4</sub>-алкилдибензотиофенов и C<sub>3-7</sub>-алкилфенантронов были незначительными (менее 10%) [40].

Дополнительное исследование по анализу влияния температуры и добавляемых питательных веществ показало, что *Alcanivorax* появляется только при добавлении питательных веществ, и что организмы, относящиеся к роду *Oleispira*, цветут в микрокосмах, поддерживаемых при температуре 4°C [41]. Суммарно, наиболее благоприятные температурные условия для *Alcanivorax*, *Cycloclasticus* и прочих от 4 до 20°C [42].

### 1.3 Биоремедиация нефтепродуктов

Процесс биоремедиации, определяемый как использование микроорганизмов для детоксикации или удаления загрязняющих веществ благодаря их разнообразным метаболическим возможностям, является развивающимся методом удаления и разложения многих загрязнителей окружающей среды, включая продукты нефтяной промышленности [43]. Биодegradация естественными популяциями микроорганизмов представляет собой один из основных механизмов, с помощью которого нефть и другие углеводородные загрязнители могут быть удалены из окружающей среды [44].

Биодegradация углеводородов нефти - сложный процесс, который зависит от природы и количества присутствующих углеводородов. Нефтяные углеводороды можно разделить на четыре класса: насыщенные, ароматические, асфальтены (фенолы, жирные кислоты, кетоны, сложные эфиры и порфирины) и смолы (пиридины, хинолины, карбазолы, сульфоксиды и амиды) [45]. Эти углеводороды представляют собой органические соединения, содержащие углерод и водород, которые в значительной степени нерастворимы в воде. Микроорганизмы могут либо разлагать, либо производить углеводороды, в зависимости от наличия определенных метаболических путей, специфичных для каждой функции в условиях окружающей среды [46]. Одним из важных факторов, ограничивающих биодegradацию нефтяных загрязнителей в окружающей среде, является их ограниченная доступность для микроорганизмов. Углеводородные соединения нефти связываются с компонентами почвы, и их трудно удалить или разложить [45].

Из-за протечек в подземных резервуарах для хранения и трубопроводах, из-за разливов на добывающих скважинах, нефтеперерабатывающих заводах и распределительных терминалах, а также из-за неправильной утилизации и несчастных случаев при транспортировке органические соединения превратились в подповерхностные загрязнители, которые угрожают важным ресурсам питьевой воды. Одной из стратегий восстановления такой загрязненной подповерхностной среды является способность бактерий к разложению [47].

Наличие высокой ферментативной способности позволяет микробным сообществам разлагать сложные углеводороды. Эта способность модифицировать или разлагать определенные загрязнители, такие как нефть, резюмирует важность ферментов в процессе биоремедиации. Их генетическое разнообразие способствует метаболической универсальности микроорганизмов для преобразования загрязняющих веществ в менее токсичные конечные продукты, которые затем интегрируются в естественные биогеохимические циклы [46].

Углеводороды в окружающей среде подвергаются биологическому разложению в основном бактериями, дрожжами и грибами, а заявленная эффективность биodeградации варьировалась от 6% [48] до 82% [49] для почвенных грибов, от 0,13% [48] до 50% [49] для почвенных бактерий и от 0,003% [50] до 100% [51] для морских бактерий [52].

Бактерии являются наиболее активными агентами в процессе разложения нефти, и они действуют как первичные разрушители разлитой нефти в окружающей среде [53]. Согласно разным данным, было выделено 25 родов бактерий и 25 родов грибов [54] и 22 рода бактерий и 31 род грибов [55] из морской среды. Бактериальные роды, а именно *Gordonia*, *Brevibacterium*, *Aeromicrobium*, *Dietzia*, *Burkholderia* и *Mycobacterium*, выделенные из загрязненной нефтью почвы, оказались потенциальными организмами для разложения углеводородов. Роды грибов, а именно *Amorphotheca*, *Neosartorya*, *Talaromyces* и *Graphium*, а также роды дрожжей, а именно *Candida*, *Yarrowia* и *Pichia*, были выделены из загрязненной нефтью почвы и оказались потенциальными организмами для разложения углеводородов [56]. Из статьи [57] также сообщается, что *Aspergillus*, *Cephalosporium* и *Penicillium*, которые также оказались потенциальными разлагателями углеводородов сырой нефти.

Было признано, что ряд ограничивающих факторов влияет на биологическое разложение нефтяных углеводородов. Среди физических факторов температура играет важную роль в биологическом разложении углеводородов, непосредственно влияя на химический состав загрязняющих веществ, а также на физиологию и разнообразие микробной флоры [58]. При низких температурах вязкость масла повышалась, в то время как летучесть токсичных низкомолекулярных углеводородов снижалась, что замедляло начало биodeградации [59]. Питательные вещества являются очень важными ингредиентами для успешного биоразложения углеводородных загрязняющих веществ, особенно наличие азота, фосфора и в некоторых случаях железа [60]. Когда в морской и пресноводной среде происходил крупный разлив нефти, запасы углерода значительно увеличивались, а доступность азота и фосфора, как правило, становилась ограничивающим фактором разложения нефти [61].

Кроме биodeградации, биоремедиация может осуществляться с помощью биоаугментации или биостимуляции. Первая из них - это стратегия, при которой микроорганизмы, разлагающие загрязнители, предварительно отобранные в

лаборатории, внедряются в загрязненную окружающую среду. Использование микроорганизмов из той же среды, в которую они будут занесены, не является обязательным; однако, это рекомендуется. С другой стороны, биостимуляция - это стратегия биоремедиации, направленная на стимулирование способности местных микроорганизмов разлагать загрязняющие вещества путем выявления и корректировки определенных физических и химических параметров, которые могут снижать скорость их биodeградации [62].

## 2 Объект и методика исследования

### 2.1 Объекты и материалы исследования

#### 2.1.1 Объект исследования

Бензин и керосин были выбраны для проведения данного исследования.

Бензин – нефтепродукт, состоящий из легких углеводородов. В данном случае, был выбран бензин марки АИ-98 соответствующий стандарту ГОСТ 32513-2013. Стандарт ГОСТ 32513-202 определяет бензин как прозрачную жидкость, с требованием отсутствия примесей, а также воды.

Керосин – нефтепродукт, состоящий из жидких углеводородов. В данном случае был выбран керосин соответствующий стандарту ГОСТ 10227-86.

#### 2.1.2 Посуда

С целью проведения исследования были подготовлены и, в дальнейшем, использованы чашки Петри диаметром 90 мм, пластиковые(4 шт.). Посуда: колба Эрленмейера, номерной(мерный) стакан 50 мл, стеклянный шпатель.



Рисунок 1 – чашки Петри 90 мм

#### 2.1.3 Оборудование

Для проведения микробиологических исследований необходимо соблюдать условия стерильности. Условия стерильности соблюдаются для избежания загрязнения чашек Петри сторонними микроорганизмами из внешней среды. Последнее необходимо для соблюдения достоверности исследования. С целью соблюдения стерильности используется описанное ниже оборудование.

Автоклав – герметичный прибор поддерживающий высокую температуру под давлением. Была использована модель ВК-75-01. Раствор питательной среды, описание которого будет ниже, вместе с раствором дистиллированной воды были подвергнуты стерилизации при температуре 121°C в течении 120 минут. При такой температуре все бактерии и прочие микроорганизмы погибают.



Рисунок 2 – Автоклав ВК-75-01

Таблица 2.1 – Характеристики автоклава

Параметр	Значение
Объем	75 л
Автоклав модели ВК-75-01.	400 х 600
Напряжение	220 В
Мощность	8 кВт

После стерилизации раствор питательной среды помещаются в ламинарный бокс.



Рисунок 3 - Ламинарный бокс ВО-120-PP

Ламинарный бокс – специальный шкаф с ультрафиолетовыми лампами и циклическим стерильным потоком воздуха со скоростью потока 0,5-1 м\с. Была использована модель ВО-120-PP компании TOPAIR с вторым классом биозащиты. Второй класс биозащиты означает наличие улучшенную систему подачи воздуха проходящей через специальный фильтр.

Таблица 2.2 – Характеристики ламинарного шкафа

Параметры	Значение
Размеры оборудования	
— высота	1500 мм
— ширина	1220 мм
— глубина	800 мм

Рабочее пространство	
— высота	1135 мм
— ширина	640 мм
— глубина	600 мм
Открытая передняя створка	480 мм
Скорость притока	0,5 м\с
Скорость нисходящего потока	0,33 м\с
Рабочая схема воздушного потока	70% циркуляции, 30% выхлопа
Электропитание	50/60 Гц, 115/230 В
Шум (протестировано на высоте 20 см от рабочего стола)	<62 дБ
Уровень чистоты	Класс 100/ISO 5
Освещение	800 LUX, экологически чистое освещение

Внутри ламинарного бокса необходимо работать стерильным оборудованием и обработанными антисептиком руками. С этой целью использовался этиловый спирт. Внутри ламинарного бокса питательная среда была разлита в чашки Петри.

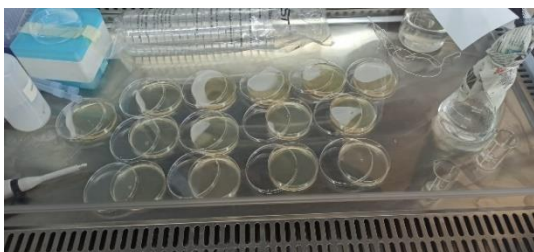


Рисунок 4 – Среда разлитая в чашки Петри

Для приготовления питательной среды необходимо было точное измерение субстрата. С этой целью были использованы высокоточные лабораторные весы. Была использована PA114, производства компании Pioneer.



Рисунок 5 – Лабораторные весы PA114



Таблица 2.3 – Характеристики весов

Параметры	Значение
Наибольшее значение взвешивания	4100 г
Линейность в эксплуатации	$\pm 0,1...0,3$ г
Диаметры взвешивающей чашки	180 мм

В ламинарном боксе также производится посев образцов нефтепродуктов. Посев производился дозаторами и насадками. Насадки менялись для каждого раствора. Засеянные чашки Петри требуется поместить в среду с постоянной благоприятной температурой в 28°C. Для этого используется термостат.



Рисунок 6 – Дозатор

Термостат – специальное устройство похожее на холодильник, но имеющее за собой функцию поддерживать постоянную, благоприятную для роста микроорганизмов в чашках Петри температуру. Термостат позволяет выращивать микроорганизмы с постоянным контролем. Была использована модель термостата ТС-1/80 СПУ.



Рисунок 7 – Термостат ТС-1/80 СПУ

Таблица 2.4 – Характеристики термостата

Параметры	Значение
Объем рабочей камеры	80 л
Диапазон регулируемых температур	температура окружающей среды - 60°C

Напряжение сети	220±10% В
Предельное отклонение температуры к объему камеры	±1 °С
Частота	50±1 Гц
Максимальная потребляемая мощность, не более	250 Вт
Размеры рабочей камеры — высота — ширина — глубина	490 мм 393 мм 396 мм
Общие размеры — высота — ширина — глубина	721 мм 518 мм 525 мм
Температура окружающей среды при эксплуатации	10-35 °С
Масса	45 кг

Вкратце, с помощью автоклава, ламинарного бокса и соблюдения правил стерильности при работе с последним обеспечивается стерильность проведения исследования. Весы позволили точно измерить субстрат для создания питательной среды, после залитый в чашки Петри. После посева, в чашках Петри был произведен рост в благоприятных условиях в термостате.

## 2.2 Методики исследования

### 2.2.1 Технология исследования исследуемых образцов к посеву

В данной работе использовались образцы керосина и бензина объемом 10 мл, доведенные в ламинарном боксе до объема в 50 мл дистиллированной водой.

Было подготовлено и использовано описанное выше оборудование в следующей последовательности: приготовление питательной среды и воды в колбах Эрленмейера; автоклавирование колб; залив питательной среды в чашки Петри внутри ламинарного бокса; разведение образцов нефтепродуктов; посев образцов нефтепродуктов в чашки Петри с питательной средой в ламинарном боксе; перемещение засеянных чашек Петри в термостат.

Приготовление питательной среды: Питательную среду, питательный-агар (Nutrient Agar) соответствии со стандартами ISO 9001 и ISO 11133, название ТМ 341, производитель ТМ Media(Индия), приготовили в соотношении 7 гр на 250 мл воды.



Рисунок 8 – Питательная среда, Nutrient Agar

### 2.2.2 Посев

Посев был проведен на твердые питательные среды в соответствии со стандартом ISO 7218. С целью проведения посева приготовленная питательная среда Nutrient Agar после автоклавирования была разлита в чашки Петри и была оставлена в горизонтальном положении до застывания. После застывания, в 2 чашки Петри с питательной средой была нанесена дозатором капля разведенного образца бензина объемом 0.1 мл, в другие две чашки Петри капля разведенного образца керосина объемом 0.1 мл. Для разведения образца равномерно по площади питательной среды был использован простерилизованный шпатель. В соблюдения стерильности, засев образцов производился в ламинарном боксе. Шпатель подвергался обжигу с предварительной спиртовой обработкой. Посеянные 4 чашки Петри были помещены в термостат на сутки.

### 2.2.3 Расчет полученных результатов.

Расчет полученных результатов будет произведен в соответствии со стандартом ISO 7218-2015, а именно раздел 10 с наименованием “Подсчет”. В зависимости от результата будут использованы разные методы подсчета.

В данном методе рассчитывают число  $N$  микроорганизмов, которые присутствуют в пробе (чашках Петри). Для этого берется средневзвешенное значение из двух последовательных разведений по следующей формуле:

$$N = \frac{\sum c}{v \cdot 1,1 \cdot d} \quad (1)$$

Где:  $\sum c$  — сумма колоний, из подсчета средневзвешенных значений из двух последовательных разведений, где хотя бы в одной чашке есть не менее 10

колоний;  $v$  — объем материала для посева, добавленного в каждую чашку, см<sup>3</sup>;  $d$  — коэффициент разведения, соответствующий выбранному разведению.

Если в чашке обнаруживается менее десяти колоний, но не менее четырех, то используется формула:

$$N_E = \frac{C}{v \cdot d} \quad (2)$$

и принимают за результат вычисленное количество  $N_E$  на грамм продукта (для прочих продуктов) или микроорганизмов на кубический сантиметр (для жидких продуктов).

Если каждая из двух чашек с анализируемой пробой содержит в итоге менее десяти колоний, то используется формула ниже:

$$N_E = \frac{C}{v \cdot n \cdot d} \quad (3)$$

Где:  $\sum c$  — сумма колоний;  $v$  — объем инокулята, использованного в каждой чашке, см<sup>3</sup>;  $n$  — число отобранных чашек;  $d$  — коэффициент разбавления, соответствующий первому отобранному разведению.

### 3 Результаты исследования

Исследовательская часть работы, основанная на применении микробиологических методов исследования, складывалась из процедур, представленных на рисунке 1.

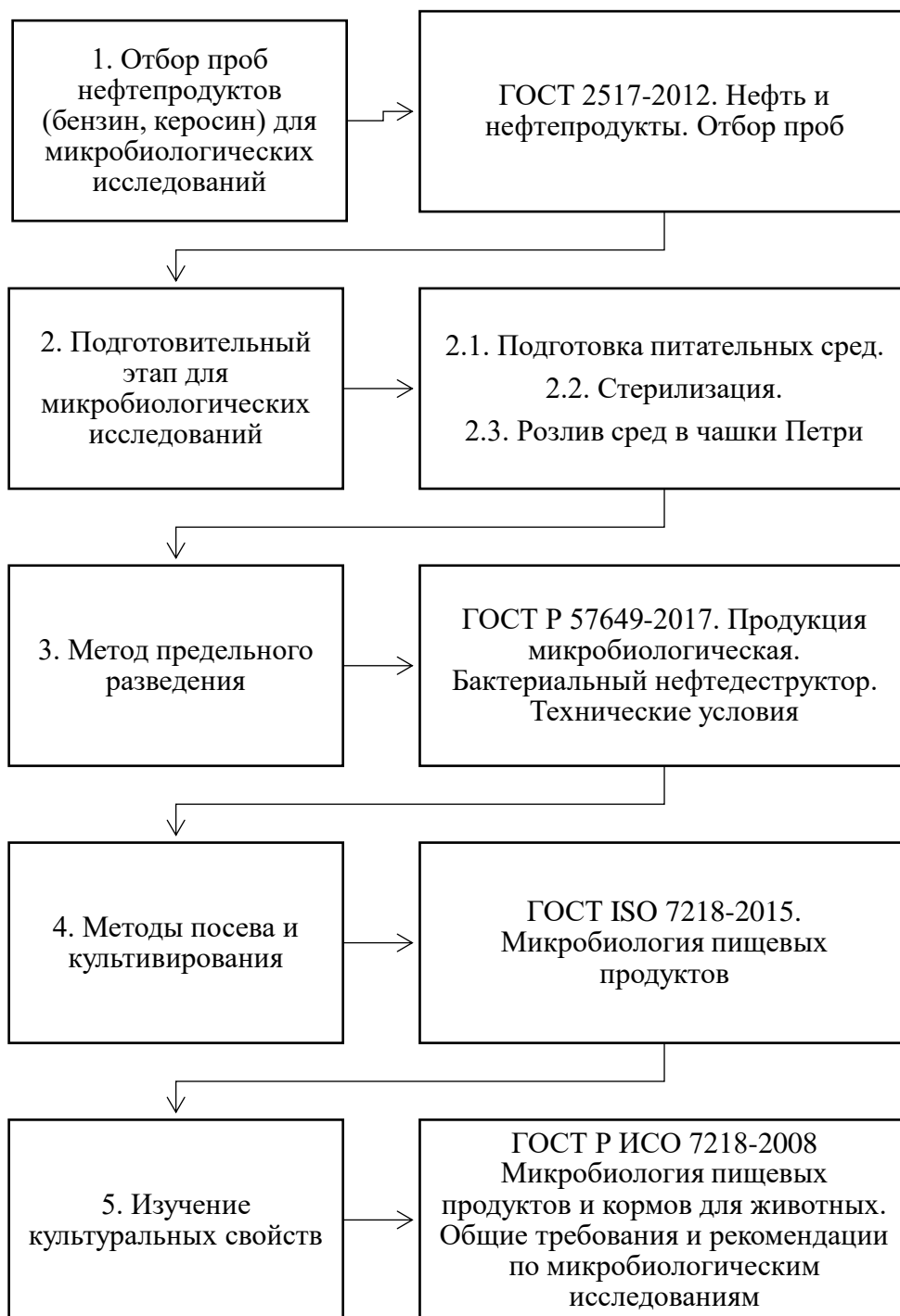


Рисунок 1 – Исследовательская часть работы, основанная на применении микробиологических методов исследования

Как видим из рисунка 1, для проведения исследования:

1 На первом этапе отобрали пробы нефтепродуктов (бензин, керосин) для микробиологических исследований, согласно ГОСТ 2517-2012 с применением трубки и шланга диаметром 10 мм.

Второй, подготовительный этап для микробиологических исследований включал выполнение следующих процедур:

2.1 Подготовка 3-х видов питательных сред 9: NA для определения общей обсемененности, агар для актиномицетов, агар Чапека для микромицетов.

2.2 Стерилизация:

- питательных сред при температуре 121 °С в течение 50 минут;
- лабораторной стеклянной посуды: чашек Петри, биологических пробирок, колб при температуре 121 °С в течение 30 минут.

3 На третьем этапе исследования применяли метод предельного разведения, согласно требованиям ГОСТ Р 57649-2017.

4 На четвертом этапе посев на твердые питательные среды и культивирование исследуемых образцов осуществляли согласно требованиям ГОСТ ISO 7218-2015.

Культивировали образцы посевов при температуре 29 °С в течение:

- 24 ч для определения ОМЧ;
- 240 ч для определения обсемененности микромицетами и актиномицетами.

Изучение культуральных свойств осуществляли согласно ГОСТ Р ИСО 7218-2008.

В таблице 1 представлен микробиологический анализ отобранных проб нефтепродуктов.

Таблица 1 - Микробиологический анализ отобранных проб нефтепродуктов

Вид топлива	Бензин	Керосин
ОМЧ	Менее 10	Менее 10
Микромицеты	Менее 10	-
Актиномицеты	Менее 10	-

Как видим из таблицы 1, общая обсемененность была для исследуемых нефтепродуктов менее 10, при этом в керосине микромицетов и актиномицетов обнаружено не было.

На следующем этапе были проведены исследования, направленные на изучение культуральных свойств колоний, выросших на твердой питательной среде NA (таблицы 2 и 3, рисунок 2).

Как видим из рисунка 2, в первой пробе(бензин) первой повторности выросли 2 колонии, в первой пробе(бензин) второй повторности – 1 колония. Во второй пробе(керосин) первой повторности выросла 1 колония, а во второй пробе(керосин) второй повторности – выросших колоний не было.



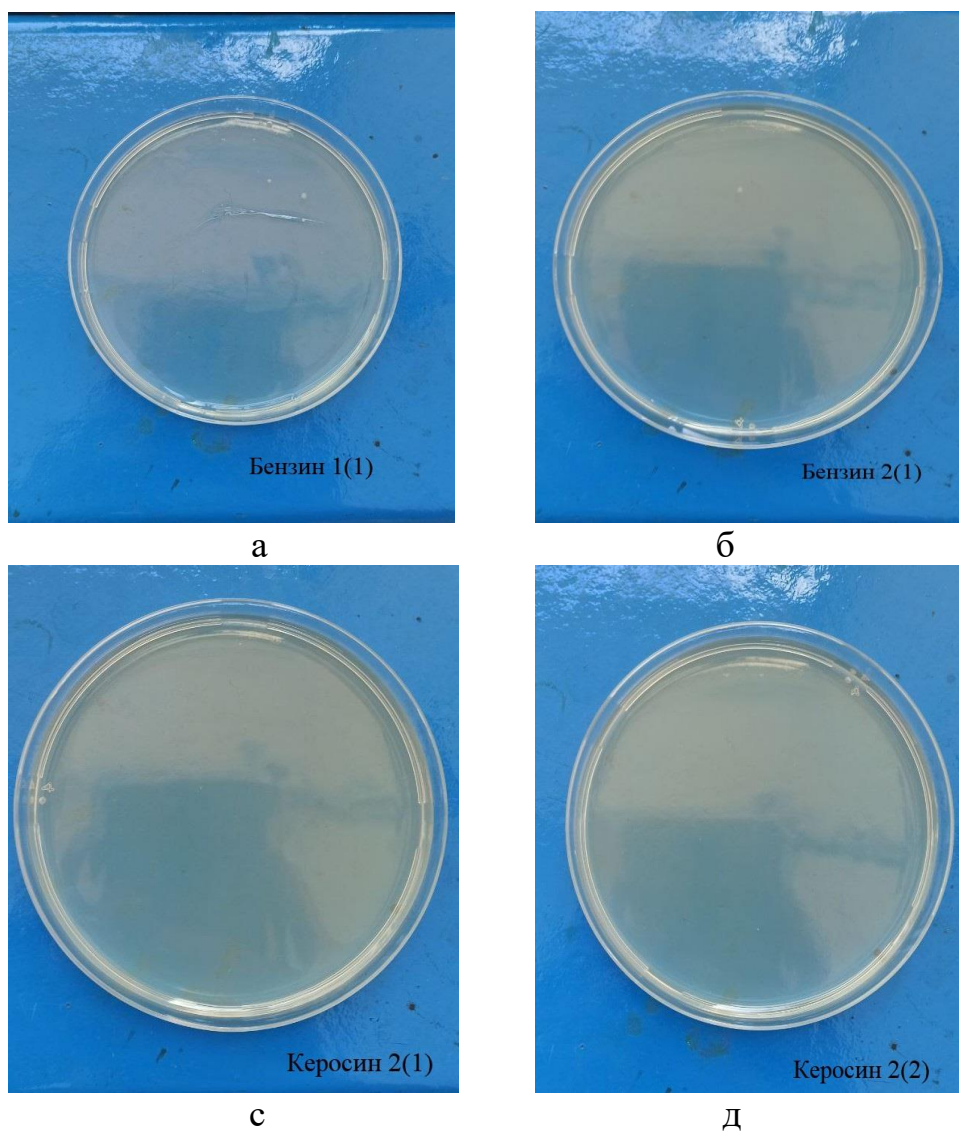


Рисунок 2 – Выросшие колонии на питательной среде NA

Изучение их культуральных свойств показало (таблицы 2 и 3), что:

- колонии, выделенные из бензина, имели круглую форму, тогда как из керосина – круглую с фестончатым краем;
- размер колоний, выделенные из бензина, имели точечные размеры, тогда как из керосина – средний;
- прозрачность колоний, выделенные из бензина, были прозрачные (рис. 2, а) и мутные (рис.2, б), тогда как из керосина – мутные;
- контур края колоний, выделенные из бензина, были гладкие, тогда как из керосина – волнистые;
- профиль колоний, выделенные из бензина, были гладкие (рис. 2, а) и выпуклый (рис.2, б), тогда как из керосина – выпуклый;
- поверхность колоний у всех была гладкой;

- по цвету колонии, выделенные из бензина, были белые (рис. 2, а) и желтые (рис.2, б), тогда как из керосина – белые;

- по структуре колонии, выделенные из бензина, были однородные (рис. 2, а) и мелкозернистые (рис.2, б), тогда как из керосина – мелкозернистый.

Таблица 2 – Культуральные свойства колоний микроорганизмов, выращенных на твердой питательной среде NA (бензин)

Наименование среды	NA (рис.2, а)	NA (рис. 2, а)	NA (рис.2, б)
Форма колонии	Круглая	Круглая	Круглая
Размер колонии	Точечный	Точечный	Точечный
Прозрачность	Прозрачный	Прозрачный	Мутный
Контур края	Гладкий	Гладкий	Гладкий
Профиль колонии	Гладкий	Гладкий	Выпуклый
Поверхность	Гладкая	Гладкая	Гладкая
Цвет	Белый	Белый	Желтый
Структура	Однородная	Однородная	Мелкозернистая

Таблица 3 – Культуральные свойства колоний микроорганизмов, выращенных на твердой питательной среде NA (керосин)

Наименование среды	NA (рис. 2, с)
Форма колонии	Круглая с фестончатым краем
Размер колонии	Средний
Прозрачность	Мутный
Контур края	Волнистый
Профиль колонии	Выпуклый
Поверхность	Гладкая
Цвет	Белый
Структура	Мелкозернистая

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Изучена особенность колонизации нефтепродуктов (бензин, керосин) микроорганизмами на автозаправочных станциях г. Алматы.

Выводы:

1 Изучение биологических и технологических свойств микроорганизмов, колонизирующие нефтепродукты было проведено на основе аналитических исследований 62 научной литературы.

2 Общая обсемененность для исследуемых нефтепродуктов была менее 10, при этом в керосине микромицетов и актиномицетов обнаружено не было.

3 Изучение культуральных свойств колоний, выросших на твердой питательной среде, показало, что колонии, выделенные из бензина, отличаются от колоний, выделенных из керосина по размеру, прозрачности, контуру, профилю и структуре.

## **Приложение А. Сокращения и обозначения**

АЗС - Автомобильная заправочная станция

°F - Градус Фаренгейт

ПАУ - Полициклические ароматические углеводороды

рДНК – рибосомная дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР - Полимеразная цепная реакция

ГОСТ - государственный стандарт

NA - Nutrient Agar

## **Приложение Б. Номер и наименование таблиц**

Таблица 2.1 – Характеристики автоклава,

Таблица 2.2 – Характеристики ламинарного шкафа,

Таблица 2.3 – Характеристики весов,

Таблица 2.4 – Характеристики термостата,

Таблица 3.1 - Микробиологический анализ отобранных проб нефтепродуктов,

Таблица 3.2 – Культуральные свойства колоний микроорганизмов, выращенных на твердой питательной среде NA (бензин)

Таблица 3.3 – Культуральные свойства колоний микроорганизмов, выращенных на твердой питательной среде NA (керосин).

## **Приложение В. Номер и наименование рисунков**

- Рисунок 1 – чашки Петри 90 мм,
- Рисунок 2 – Автоклав ВК-75-01,
- Рисунок 3 - Ламинарный бокс ВО-120-РР,
- Рисунок 4 – Среда разлитая в чашки Петри,
- Рисунок 5 – Лабораторные весы РА114,
- Рисунок 6 – Дозатор,
- Рисунок 7 – Термостат ТС-1/80 СПУ,
- Рисунок 8 – Питательная среда, Nutrient Agar,
- Рисунок 3.1 – Исследовательская часть работы, основанная на применении микробиологических методов исследования,
- Рисунок 3.2 – Выросшие колонии на питательной среде NA

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Fathepure BZ (2014) Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *FrontMicrobiol* 5: 173.
- 2 Bordenave S, Goñi-Urriza MS, Caumette P, Duran R (2007) Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Appl Environ Microbiol* 73: 6089-6097.
- 3 Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* 59: 201-222.
- 4 Stancu MM (2018) Bacterial Degradation of Petroleum and Petroleum Products. *J Mol Microbiol*. Vol. 2 No. 1:2.
- 5 Gaylarde, Christine C., Fátima M. Bento, and Joan Kelley. "Microbial Contamination of Stored Hydrocarbon Fuels and Its Control." *Revista de Microbiologia* 30.1 (1999): 01–10. Web.
- 6 Arjoon, Karuna. "Bioremediation of Petroleum and Petroleum Products." *Bioremediation of Petroleum and Petroleum Products* (2012): n. pag. Print.
- 7 Speight, J.G. 2007. *The Chemistry and Technology of Petroleum*. 5th Edition. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida.
- 8 Opoku, Patrick. "Kerosene Review." *Kerosene Review* (2020): n. pag. Print.
- 9 Ribeiro, Núbia M. et al. "The Role of Additives for Diesel and Diesel Blended (Ethanol or Biodiesel) Fuels: A Review." *Energy & Fuels* 21.4 (2007): 2433–2445. Web.
- 10 Harayama, S., Kasai, Y., & Hara, A. (2004). Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Current opinion in biotechnology*, 15(3), 205-214.
- 11 Dutta TK, Harayama S: Fate of crude oil by the combination of photooxidation and biodegradation. *Environ Sci Technol* 2000, 34:1500-1505
- 12 Bossert, I., and R. Bartha. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems, p. 434-476. In R. M. Atlas (ed.), *Petroleum microbiology*. Macmillan Publishing Co., New York.
- 13 MacNaughton SJ, Stephen JR, Venosa AD, Davis GA, Chang Y-J, White DC: Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl Environ Microbiol* 1999, 65:3566-3574
- 14 Kasai Y, Kishira H, Syutsubo K, Harayama S: Molecular detection of marine bacterial populations on beaches contaminated by the Nakhodka tanker oil-spill accident. *Environ Microbiol* 2001, 3:246-255

15 Kasai Y, Kishira H, Sasaki T, Syutsubo K, Watanabe K, Harayama S: Predominant growth of *Alcanivorax* strains in oil-contaminated and nutrient-supplemented sea water. *Environ Microbiol* 2002, 4:141-147

16 Syutsubo K, Kishira H, Harayama S: Development of specific oligonucleotide probes for the identification and in situ detection of hydrocarbon-degrading *Alcanivorax* strains. *Environ Microbiol* 2001, 3:371-379.

17 Hara A, Syutsubo K, Harayama S: *Alcanivorax* which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation. *Environ Microbiol* 2003, 5:746-753.

18 Dutta TK, Harayama S: Biodegradation of n-alkylcycloalkanes and n-alkylbenzenes via new pathways in *Alcanivorax* sp. Strain MBIC 4326. *Appl Environ Microbiol* 2001, 67:1970-1974

19 Kasai Y, Kishira H, Harayama S: Bacteria belonging to the genus *Cycloclasticus* play a primary role in the degradation of aromatic hydrocarbons released in a marine environment. *Appl Environ Microbiol* 2002, 68:5625-5633

20 Iwabuchi N, Sunairi M, Urai M, Itoh C, Anzai H, Nakajima M, Harayama S: Extracellular polysaccharides of *Rhodococcus rhodochrous* S-2 stimulate the degradation of aromatic components in crude oil by indigenous marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2002, 68:2337-2343

21 Leahy, J. G., & Colwell, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, 54(3), 305-315

22 von der Weid, I., Marques, J.M., Cunha, C.D., Lippi, R.K., Santos, S.C.C., Rosado, A.S., Lines, U., Seldin, L., 2007. Identification and biodegradation potential of a novel strain of *Dietzia cinnamea* isolated from a petroleum-contaminated tropical soil. *Syst. Appl. Microbiol.* 30 (4), 331-339

23 Chaudhary KD, Bajagain R, Jeong W and Kim J 2020 Biodegradation of diesel oil and n-alkanes (C18, C20, and C22) by a novel strain *Acinetobacter* sp. K-6 in unsaturated soil. *Environmental Engineering Research.* 25(3): 290-298. <https://doi.org/10.4491/eer.2019.119>

24 Das N and Chandran P 2011 Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International.* 1-13. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>

25 Head IM, Jones DM, Roling WF: Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat Rev Microbiol* 2006, 4:173-182.

26 Oluwafemi Adebayo Oyewole, Clement S Olusanya, Olusegun I Akinlade et al. Biodegradation of Selected Petroleum Hydrocarbons Using Indigenous Microorganisms, 27 January 2022, PREPRINT (Version 1) available at Research Square [<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1267852/v1>]



27 Yakimov, M. M., Golyshin, P. N., Lang, S., Moore, E. R. B., Abraham, W. R., Lünsdorf, H., ... & Timmis, K. N. (2007). Genome sequence completed of *Alcanivorax borkumensis*, a hydrocarbon-degrading bacterium that plays a global role in oil removal from marine systems. *Journal of Biotechnology*, 127(3), 277-292.

28 Harakawa, T., & Miyazaki, M. (2001). *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 489-493.

29 Agogue H, Joux F, Obernosterer I, Lebaron P: Resistance of marine bacterioneuston to solar radiation. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71:5282-5289

30 Vetriani C, Chew YS, Miller SM, Yagi J, Coombs J, Lutz RA, Barkay T: Mercury adaptation among bacteria from a deep-sea hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71:220-226.

31 de Souza MP, Amini A, Dojka MA, Pickering IJ, Dawson SC, Pace NR, Terry N: Identification and characterization of bacteria in a selenium-contaminated hypersaline evaporation pond. *Appl Environ Microbiol* 2001, 67:3785-3794.

32 Holmes AJ, Tujula NA, Holley M, Contos A, James JM, Rogers P, Gillings MR: Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia. *Environ Microbiol* 2001, 3:256-264.

33 Kleinsteuber S, Riis V, Fetzer I, Harms H, Muller S: Population dynamics within a microbial consortium during growth on diesel fuel in saline environments. *Appl Environ Microbiol* 2006, 72:3531-3542

34 Walker JJ, Spear JR, Pace NR: Geobiology of a microbial endolithic community in the Yellowstone geothermal environment. *Nature* 2005, 434:1011-1014.

35 Dutta TK, Harayama S: Biodegradation of n-alkylcycloalkanes and n-alkylbenzenes via new pathways in *Alcanivorax* sp. strain MBIC 4326. *Appl Environ Microbiol* 2001, 67:1970-1974.

36 Schneiker S, Martins dos Santos VA, Bartels D, Bekel T, Brecht M, Buhrmester J, Chernikova TN, Denaro R, Ferrer M, Gertler C et al.: Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nat Biotechnol* 2006, 24:997-1004

37 Yakimov, M. M., Timmis, K. N., & Golyshin, P. N. (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 257-266.

38 Harayama, S., Kasai, Y., Hara, A., & Chiba, H. (2004). *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(2), 651-655

- 39 Dyksterhouse, S. E., J. P. Gray, R. P. Herwig, J. C. Lara, and J. T. Staley. 1995. *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:116–123.
- 40 Kodama, Y., Watanabe, K., & Kawai, S. (2006). Bacteria belonging to the genus *Cycloclasticus* play a primary role in the degradation of aromatic hydrocarbons released in a marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 146-151.
- 41 Coulon F, McKew BA, Osborn AM, McGenity TJ, Timmis KN: Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters. *Environ Microbiol* 2007, 9:177-186.
- 42 Gutierrez, T., Shimmield, T., & Zanardi-Lamardo, E. (2013). Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process in polluted environments. *Journal of microbiology and biotechnology*, 23(1), 13-22.
- 43 J. I. Medina-Bellver, P. Marín, A. Delgado, A. Rodríguez-Sánchez, E. Reyes, J. L. Ramos, and S. Marqués, “Evidence for in situ crude oil biodegradation after the Prestige oil spill,” *Environmental Microbiology*, vol. 7, no. 6, pp. 773–779, 2005.
- 44 W. Ulrici, “Contaminant soil areas, different countries and contaminant monitoring of contaminants,” in *Environmental Process II. Soil Decontamination Biotechnology*, H. J. Rehm and G. Reed, Eds., vol. 11, pp. 5–42, 2000
- 45 Das N, Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol Res Int.* 2011;2011:941810. doi: 10.4061/2011/941810. Epub 2010 Sep 13. PMID: 21350672; PMCID: PMC3042690.
- 46 Peixoto RS, Vermelho AB, Rosado AS. Petroleum-degrading enzymes: Bioremediation and new prospects. *Enzyme Research.* 2011:1-7. DOI: 10.4061/2011/475193
- 47 Christof Holliger, Sarra Gaspard, Guy Glod, Cornelis Heijman, Wolfram Schumacher, René P. Schwarzenbach, Francisco Vazquez, Contaminated environments in the subsurface and bioremediation: organic contaminants, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 20, Issue 3-4, July 1997, Pages 517–523, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00334.x>
- 48 J. Jones, M. Knight, and J. A. Byron, “Effect of gross population by kerosene hydrocarbons on the microflora of a moorland soil,” *Nature*, vol. 227, p. 1166, 1970.
- 49 Y. Pinholt, S. Struwe, and A. Kjoller, “Microbial changes during oil decomposition in soil,” *Holarctic Ecology*, vol. 2, pp. 195–200, 1979.
- 50 S. L. Hollaway, G. M. Faw, and R. K. Sizemore, “The bacterial community composition of an active oil field in the Northwestern Gulf of Mexico,” *Marine Pollution Bulletin*, vol. 11, no. 6, pp. 153–156, 1980.

51 G. J. Mulkins Phillips and J. E. Stewart, "Distribution of hydrocarbon utilizing bacteria in Northwestern Atlantic waters and coastal sediments," *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 20, no. 7, pp. 955–962, 1974.

52 Nilanjana Das, Preethy Chandran, "Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview", *Biotechnology Research International*, vol. 2011, Article ID 941810, 13 pages, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>

53 R. J. W. Brooijmans, M. I. Pastink, and R. J. Siezen, "Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew," *Microbial Biotechnology*, vol. 2, no. 6, pp. 587–594, 2009.

54 G. Floodgate, "The fate of petroleum in marine ecosystems," in *Petroleum Microbiology*, R. M. Atlas, Ed., pp. 355–398, Macmillan, New York, NY, USA, 1984.

55 R. Bartha and I. Bossert, "The treatment and disposal of petroleum wastes," in *Petroleum Microbiology*, R. M. Atlas, Ed., pp. 553–578, Macmillan, New York, NY, USA, 1984.

56 F. Chaillan, A. Le Flèche, E. Bury, Y.-H. Phantavong, P. Grimont, A. Saliot, and J. Oudot, "Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms," *Research in Microbiology*, vol. 155, no. 7, pp. 587–595, 2004.

57 H. Singh, *Mycoremediation: Fungal Bioremediation*, Wiley-Interscience, New York, NY, USA, 2006.

58 M. L. Brusseau, "The impact of physical, chemical and biological factors on biodegradation," in *Proceedings of the International Conference on Biotechnology for Soil Remediation: Scientific Bases and Practical Applications*, R. Serra, Ed., pp. 81–98, C.I.P.A. S.R.L., Milan, Italy, 1998.

59 R. M. Atlas, "Effects of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 30, no. 3, pp. 396–403, 1975

60 J. J. Cooney, "The fate of petroleum pollutants in fresh water ecosystems," in *Petroleum Microbiology*, R. M. Atlas, Ed., pp. 399–434, Macmillan, New York, NY, USA, 1984.

61 R. M. Atlas, "Effects of hydrocarbons on micro-organisms and biodegradation in Arctic ecosystems," in *Petroleum Effects in the Arctic Environment*, F. R. Engelhardt, Ed., pp. 63–99, Elsevier, London, UK, 1985.

62 Fernandes, Luanny, et al. 'Oil Spill Incidents on Coral Reefs: Impacts and Remediation Technologies'. *Corals - Habitat Formers in the Anthropocene*, IntechOpen, 22 Feb. 2023. Crossref, doi:10.5772/intechopen.105354.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН  
СӘТБАЕВ УНИВЕРСИТЕТІ

РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу  
Бектуров Данарбек Рустамбекулы  
6В05101 – Химическая и биохимическая инженерия

На тему: Изучение особенностей колонизации нефтяных продуктов микроорганизмами

Выполнено:

- а) графическая часть на 1 листах
- б) пояснительная записка на 38 страницах

Оценка работы

Дипломная работа Бектурова Д. на тему «Изучение особенностей колонизации нефтяных продуктов микроорганизмами» была выполнена с соблюдением требований по оформлению работы и с выполнением поставленной работой задачей. Актуальность работы состоит в высокой обсеменённости нефтепродуктов на заправочных станциях, что с одной стороны приводит к повреждению колонок, а с другой коррозионному износу трубопроводов и резервуаров. Рассмотрены особенности роста микроорганизмов на нефтепродуктах, а также их морфологические особенности.

Представленная дипломная работа состоит из 3 разделов, из которых аналитический обзор литературы составлен из 3 подразделов, выполненных с использованием и на основании 62 литературных источников, что показывает на полноценное теоритическое исследование и подробную проработку материала. В введении четко сформулирована цель, научное и прикладное значение работы. В заключении описаны полученные результаты и сделаны выводы, полученные в результате исследования.

Представленная дипломная работа выполнена на достойном уровне, соответствует всем требованиям, предъявляемым к работам данного уровня, а его автор заслуживает оценки «отлично».

Рецензент

И. о. доцента кафедры ЮНЕСКО  
по устойчивому развитию КазНУ  
им. Аль-Фараби, к.т.н.



Курбанова Л.С.



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН  
СӘТБАЕВ УНИВЕРСИТЕТІ

**ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ**

на дипломную работу

Бектуров Данарбек Рустамбекұлы

6B05101 – Химическая и биохимическая инженерия

Тема: «Изучение особенностей колонизации нефтяных продуктов микроорганизмами»

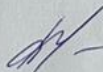
Дипломная работа Бектурова Д. представляет из себя хорошо проделанную, подробно изученную и проанализированную работу, которая показывает значительное понимание своей специальности и темы работы. В данной дипломной работе представлено изучение особенностей роста микроорганизмов на нефтепродуктах, которое дает понимание причин повреждения инженерно-технических средств, связанных с нефтепродуктами.

Автор работы провел подробное теоретическое исследование по теме используя в основе теоретические данные 62 научных, опубликованных работ. Практическая часть описывает методы, использованные в лабораторной работе, а также иллюстрирована таблицами и рисунками. В заключении приведены выводы, научное и прикладное значение о проведенных исследованиях.

Дипломная работа заслуживает оценки «отлично», а ее автор Бектуров Д.Р. присвоения квалификации «Бакалавр техники и технологий» ОП «6B05101 – Химическая и биохимическая инженерия».

**Научный руководитель**

к.с.х.н., доцент, ассоц. профессор



Джамалова Г.А.



## Metadane

Tytuł

Изучение особенностей колонизации нефтяных продуктов микроорганизмами.docx

Autorzy

Бектуров Данарбек Рустамбекулы

Promotor

Гуля Джамалова

Jednostka organizacyjna

ИГИНГД

## Alerty

W tej sekcji znajdują się statystyki występowania w tekście zabiegów edytorskich, które mogą mieć na celu zaburzenie wyników analizy. Niewidoczne dla osoby zapoznającej się z treścią pracy na wydruku lub w pliku, wpływają na frazy porównywane podczas analizy tekstu (poprzez celowe błędy pisowni) w celu ukrycia zapożyczeń lub obniżenia wyników w Raporcie podobieństwa. Należy ocenić, czy zaznaczone wystąpienia wynikają z uzasadnionego formatowania tekstu (nadważliwość systemu), czy są celową manipulacją.

Znaki z innego alfabetu		0
Rozstrzelenia		0
Mikrospacje		5
Ukryte znaki		0
Parafrazy		3

## Metryka podobieństw

Należy pamiętać, że wysokie wartości Współczynników nie oznaczają automatycznie plagiatu. Raport powinien zostać przeanalizowany przez kompetentną / upoważnioną osobę. Wyniki są uważane za wymagające szczegółowej analizy, jeśli WP 1 wynosi ponad 50%, a WP 2 ponad 5%.



WP1

25

Długość frazy dla WP 2



WP2

4609

Liczba słów



CYT

37012

Liczba znaków

## Aktywne listy podobieństw

Uwagi wymagają szczególnie fragmenty, które zostały włączone do WP 2 (zaznaczone pogrubieniem). Użyj linku "Pokaż w tekście" i zobacz, czy są to krótkie frazy rozproszone w dokumencie (przypadkowe podobieństwa), skupione wokół siebie (parafraza) lub obszerne fragmenty bez wskazania źródła (tzw. "kryptocyaty").

### 10 najdłuższych fragmentów

Kolor w tekście

LP	TYTUŁ LUB ADRES URL ŹRÓDŁA (NAZWA BAZY)	IDENTYCZNYCH SŁÓW (FRAGMENTÓW)	
1	<a href="https://www.medsnab.ru/catalog/942">https://www.medsnab.ru/catalog/942</a>	10	0.22 %
2	<a href="https://www.medsnab.ru/catalog/942">https://www.medsnab.ru/catalog/942</a>	9	0.20 %
3	<a href="https://www.medsnab.ru/catalog/942">https://www.medsnab.ru/catalog/942</a>	9	0.20 %

### z bazy RefBooks (0.00 %)

LP	TYTUŁ	IDENTYCZNYCH SŁÓW (FRAGMENTÓW)
----	-------	--------------------------------

z bazy macierzystej (0.00 %)



LP	TYTUŁ	IDENTYCZNYCH SŁÓW (FRAGMENTÓW)
----	-------	--------------------------------

z Programu Wymiany Baz (0.00 %)



LP	TYTUŁ	IDENTYCZNYCH SŁÓW (FRAGMENTÓW)
----	-------	--------------------------------

z Internetu (0.61 %)



LP	ADRES URL ŹRÓDŁA	IDENTYCZNYCH SŁÓW (FRAGMENTÓW)	
1	<a href="https://www.medsnab.ru/catalog/9142">https://www.medsnab.ru/catalog/9142</a>	28 (3)	0.61 %

**Lista zaakceptowanych fragmentów (brak zaakceptowanych fragmentów)**

LP	TREŚĆ	IDENTYCZNYCH SŁÓW (FRAGMENTÓW)
----	-------	--------------------------------