

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И. Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Биотехнология» кафедрасы

Сатан Анар Нұржауғанқызы

Мұнай ыдыратушы тиімділігі мол *Mycobacterium* және *Rhodococcus* туыстарының бактерияларының өсіру жағдайлары мен режимдерін таңдау.

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

5B070100 - «Биотехнология» мамандығы

Алматы 2019

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И. Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Биотехнология» кафедрасы



ҚОРҒАУҒА ЖІБЕРІЛДІ

Биотехнология кафедрасы
менгерушісі, PhD, профессор
З.К. Туйебахова

«6» мамыр 2019 ж.

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

Тақырыбы: «Мұнай ыдыратушы *Mycobacterium* және *Rhodococcus* туыстарының тиімділігі мол бактерияларының өсіру жағдайлары мен режимдерін таңдау»

5B070100 - «Биотехнология» мамандығы бойынша

Орындаған

Сатан А.Н.

Ғылыми жетекші

Биол.ғыл.д-ры, профессор

Курбанова Г.В.
«6» мамыр 2019 ж.

Алматы 2019

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И. Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Биотехнология» кафедрасы

5B070100 - «Биотехнология»



БЕКІТЕМІН

БТ кафедра меңгерушісі

PhD, профессор

З.К Туйебахова

2019 ж.

**Дипломдық жұмыс орындауға
ТАПСЫРМА**

Білім алушы: Сатан Анар Нұржауғанқызы

Тақырыбы: Мұнай ыдыратушы *Mycobacterium* және *Rhodococcus* туыстарының тиімділігі мол бактерияларының өсіру жағдайлары мен режимдерін таңдау.

Университет басшысының 2018 жылғы «16» қазан №1163-б
бұйрығымен бекітілген

Аяқталған жұмысты тапсыру мерзімі «22» 04. 2019 ж.

Дипломдық жұмыстын бастапқы берілістері Диплом алды өнеркәсіптік практикадан алынған материалдар.

Дипломдық жұмыста қарастырылатын мәселелер тізімі

а) Мұнай ыдыратушы *Mycobacterium* және *Rhodococcus* туысының тиімді бактерияларын бөліп алу

ә) Мұнай ыдыратушы *Mycobacterium* және *Rhodococcus* туысының эффективті бактерияларының морфологиялық және физиолого-биохимиялық қасиеттерін зерттеу

б) Мұнай ыдыратушы *Mycobacterium* және *Rhodococcus* туысының тиімді бактерияларына қолайлы қоректік орталарды таңдау

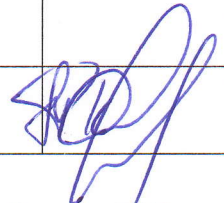
в) Мұнай ыдыратушы *Mycobacterium* және *Rhodococcus* туысының тиімді бактерияларының сақтау жағдайларын таңдау

Ұсынылған негізгі әдебиет: 19 атау

Дипломдық жұмысты дайындау
КЕСТЕСІ

Бөлімдер атауы, қарастырылатын мәселелер тізімі	Ғылыми жетекші мен кенесшілерге көрсету мерзімдері	Ескерту
Мұнай ыдыратушы <i>Mycobacterium</i> және <i>Rhodacoccus</i> туысының тиімді бактерияларын бөліп алу	ақпан	
Мұнай ыдыратушы <i>Mycobacterium</i> және <i>Rhodacoccus</i> туысының тиімді бактерияларына қолайлы қоректік орталарды таңдау	наурыз	
Мұнай ыдыратушы <i>Mycobacterium</i> және <i>Rhodacoccus</i> туысының тиімді бактерияларының сақтау жағдайларын таңдау	сәуір	

Дипломдық жұмыс бөлімдерінің кенесшілері мен
норма бақылаушының аяқталған жұмысқа қойған
қолтаңбалары

Бөлімдер атауы	Кенесшілер, аты, әкесінің аты, тегі (ғылыми дәрежесі, атағы)	Қол қойылған күні	Қолы
Норма бақылау	Ғылыми магистрі Тұрғымбаева Қ.Қ.	06.08.13	

Ғылыми жетекші

 Кұрбанова Г.В.

Тапсырманы орындауға алған білім алушы

 Сатан А.Н.

Күні

« 6 » мамыр 2019 ж.

АНДАТПА

Жұмыстың басты мақсаты: Мұнай ыдыратушы *Mycobacterium* және *Rhodococcus* туысының эффективті бактерияларының өсіру жағдайлары мен режимдерді анықтау

Жұмыстың міндеттері:

Мұнай ыдыратушы *Mycobacterium* және *Rhodococcus* туысының тиімді бактерияларын бөліп алу

Мұнай ыдыратушы *Mycobacterium* және *Rhodococcus* туысының эффективті бактерияларының морфологиялық және физиолого-биохимиялық қасиеттерін зерттеу

Мұнай ыдыратушы *Mycobacterium* және *Rhodococcus* туысының тиімді бактерияларына қолайлы қоректік орталарды таңдау

Мұнай ыдыратушы *Mycobacterium* және *Rhodococcus* туысының тиімді бактерияларының сақтау жағдайларын таңдау

Зерттеу нысаны: Зерттеу жұмысында Атырау облысы Құлсары мұнай кен орнының мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған топырақ қабаттарынан бөлініп алынған штамм изоляттар пайдаланылды.

Жұмыстың нәтижесі: Мұнайоттықтырушы микроорганизмдер: *Mycobacterium thermoresistibile* 119-3ГМ, *Rhodococcus equi* 51КС, *Mycobacterium* sp. 229С3, *Rhodococcus* sp. 1С3, *Mycobacterium* sp. 222АТ, *Mycobacterium* sp. 229С3, *Rhodococcus ruber* 114 КС, *Bacillus subtilis* 26АТ, *Pseudomonas cepacia* 122АС, *Pseudomonas* sp. 102 АС, *Candida chilensis* В2 және *Trichosporon cutaneum* Р20СО2. тұратын үш композицияның жоғары шығуын қамтамасыз ететін 30 мл/л дизельді жанармайы бар минеральді қоректік орта 8Е таңдалды. 8Е қоректік ортасында фосфорлы қышқылды амоний $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ және фосфорлы қышқыл калий K_2HPO_4 1 г/л мөлшерде композициялардың клеткалық биомассасының шығуын жоғарлатады.

АННОТАЦИЯ

Задачи дипломной работы: выделение композиции нефтеокисляющих штаммов бактерий рода *Mycobacterium* и *Rhodococcus* из загрязненных почв углеводородами.

Изучение антагонистических качеств композиции углеводородоокисляющих бактерий *Mycobacterium* и *Rhodococcus*

Оптимизация благоприятной питательной среды для сохранения композиции углеводородоокисляющих бактерий *Mycobacterium* и *Rhodococcus*

Оптимальная условия хранения композиции углеводородоокисляющих бактерий *Mycobacterium* и *Rhodococcus*

Объектом исследования: являются композиция углеводородоокисляющие бактерий выделенные из слоев загрязненных почв

Полученные результаты: Показано, что признак биodeградации углеводородов у штаммов (*Mycobacterium sp. 229C3*, *Rhodococcus sp. 1C3*, *Pseudomonas sp. 102 AC* и *Bacillus sp. 19KC*, *Candida sp. 42 PP* и *Trichosporon sp. 7PB*), взятых из коллекции лаборатории характеризуются стабильностью в неселективных условиях. Подобрана питательная минеральная среда 8Е, содержащая 30 мл/л дизельного топлива, обеспечивающая высокий выход биомассы трех композиции, состоящих из углеводородоокисляющих микроорганизмов: *Mycobacterium thermoresistibile* 119-3ГМ, *Rhodococcus equi* 51КC, *Mycobacterium sp. 229C3*, *Rhodococcus sp. 1C3*, *Mycobacterium sp. 222AT*, *Mycobacterium sp. 229C3*, *Rhodococcus ruber* 114 КC, *Bacillus subtilis* 26AT, *Pseudomonas cepacia* 122AC, *Pseudomonas sp. 102 AC*, *Candida chilensis* B2 и *Trichosporon cutaneum* P20CO2. Выявлено, что при содержании в среде 8Е фосфорнокислого аммония $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ и двухзамещенного фосфорнокислого калия K_2HPO_4 в количестве 1 г/л повышает выход клеточной биомассы композиций.

ANNOTATION

The purpose of the thesis: Determination of growth conditions and regimes for the preparation of active compositions of hydrocarbon oxidizing bacteria of *Mycobacterium* and *Rhodococcus* species.

The tasks of the thesis: isolation of the composition of oil oxidizing bacteria from contaminated soils with hydrocarbons *Mycobacterium* and *Rhodococcus*.

- study of antagonistic qualities of the composition of hydrocarbon oxidizing bacteria *Mycobacterium* and *Rhodococcus*.

- optimization of a favorable nutrient medium for the preservation of the composition of hydrocarbon oxidizing bacteria *Mycobacterium* and *Rhodococcus*.

- optimization storage conditions for the composition of hydrocarbon oxidizing bacteria *Mycobacterium* and *Rhodococcus*.

The object of the study is a composition of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from layers of contaminated soils in Atyrau region, Kulsary oil field.

A nutrient mineral medium 8E containing 30 ml / l of diesel fuel was obtained, which ensures a high biomass yield of three compositions consisting of hydrocarbon oxidizing microorganisms: *Mycobacterium thermoresistibile* 119-3GM, *Rhodococcus equi* 51KS, *Mycobacterium* sp. 229C3, *Rhodococcus* sp. 1C3, *Mycobacterium* sp. 222AT, *Mycobacterium* sp. 229C3, *Rhodococcus ruber* 114 KC, *Bacillus subtilis* 26AT, *Pseudomonas cepacia* 122AC, *Pseudomonas* sp. 102 AS, *Candida chilensis* B2 and *Trichosporon cutaneum* P20CO2. It was found that with the content of ammonium phosphate $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and dibasic potassium phosphate K_2HPO_4 in the amount of 1 g / l in the medium 8E, the yield of the cellular biomass of the compositions increases.

МАЗМҰНЫ

	Кіріспе	9
1	Әдебиеттерге шолу	10
1.1	Мұнай өнімдерінен топырақты тазарту	10
1.2	Мұнаймен ластанған топырақтың биоремедиациясы	13
2	Зерттеу материалдары мен әдістері	15
2.1	Зерттеу объектілері	15
2.2	Қоректік орталар және микроорганизмдерді культиверлеу жағдайлары	15
2.2.1	Жалпы микроб санын анықтау	15
2.2.2	Микроорганизмдердің таза культурасын алу.	15
2.2.3	Микроорганизмдердің физиолого-биохимиялық және морфологиялық ерекшеліктерін зерттеу.	16
2.3	Мұнай деструкциясының деңгейін анықтау	16
2.4	Сақтаудан соң КС қатынасында клеткалардың белсенділігі және өміршендігін анықтау	17
3	Зерттеу нәтижелері және оларды талдау	18
3.1	Мұнаймен ластанған топырақтан изоляттарды бөліп алу	18
3.2	Мұнай тотықтырушы микроорганизмдердің жаңа композициясын алу үшін негізгі параметрлерді жетілдіру	22
3.2.1	Мұнай тотықтырғыш микроорганизмдердің негізгі параметрлерін жетілдіру	22
	Қорытынды	36
	Пайдаланылған әдебиеттер тізімі	37

КІРІСПЕ

Бүгінгі таңда қоршаған ортаны түрлі ластаушылардан, соның ішінде мұнай және мұнай өнімдерінен тазарту мәселесі ерекше деңгейде орын алып отыр. Бұл мұнай және оның өнімдерінің күрделі компонентті құрамына, токсикалық әсеріне, жоғары миграциялы қабілеттілігіне және таралу аумағына байланысты. Жалпы дүниежүзілік деңгейде қарастыратын болсақ, мұнайды алу, өңдеу, пайдалану кезіндегі бұл шикізаттың қоршаған ортаға төгілуі жылына 45 млн. тоннадан асады, яғни бұл жылдық алынымның 2% жуығын құрап отыр. Оның ішінде 22 млн. тоннасы жер бетіне, 7 млн. тоннасы теңізге, 16 млн. тоннасы әр типті двигательдер жұмысында мұнай өнімдерінің толық жанбауынан атмосферада болады.

Сонымен қатар, мұнай және мұнай өнімдерімен қоршаған ортаны ластау көптеген кері, зиянды өзгерістердің туындауына әкеліп соқтырады. Топырақтың мұнай көмірсутегісімен ластануы, оның су мен ауа режимінің бұзылуына әкеледі және оның физика-химиялық құрамы өзгереді. Топырақ деградацияға ұшырап, өсімдік қабаты мүлдем жойылады. Көптеген ғалымдардың пайымдауынша, мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған табиғи орталардың қайта қалпына келуі үшін 10-25 жылдан астам уақыт керек екен[1].

Мұнай табиғаты жағынан көмірсутектердің, оттекті, күкіртті және азотты қосындылардан тұратын күрделі қоспа. Оның құрамында 1000 нан аса жеке органикалық заттар кездеседі. Жеңіл фракциялар тірі организмдерге өте токсинді болып келеді, алайда оның әсері тез ыдырап, биодеградацияға ұшырайтындықтан, ұзаққа созылмайды. Ауыр фракциялар алдыңғыға қарағанда токсинділігі аз болғанымен, топырақтың қасиетін төмендетіп, ауа мен су алмасуын тежейді. Ол компоненттер тұрақты және жерде ұзақ уақыт бойы сақталуы мүмкін. Мұнай құрамына көптеген химиялық қосылыстар кіретіндіктен, бір штамм барлық ферменттік спектрге ие бола алмайды, яғни бір штамм осы компоненттерді толығымен ыдырата алмайды. Ластанған субстратқа пайдаланатын заттардың спектріне түрлі штаммдарды енгізу мұнайдан тиімді тазалауға алып келеді.

Жұмыстың басты мақсаты: Мұнай ыдыратушы *Mycobacterium* және *Rhodococcus* туысының эффективті бактерияларының өсіру жағдайлары мен режимдерді анықтау

Жұмыстың міндеттері:

- Мұнай ыдыратушы *Mycobacterium* және *Rhodococcus* туысының эффективті бактерияларын бөліп алу
- Мұнай ыдыратушы *Mycobacterium* және *Rhodococcus* туысының эффективті бактерияларының морфологиялық және физиолого-биохимиялық қасиеттерін зерттеу
- Мұнай ыдыратушы *Mycobacterium* және *Rhodococcus* туысының эффективті бактерияларына қолайлы қоректік орталарды таңдау
- Мұнай ыдыратушы *Mycobacterium* және *Rhodococcus* туысының эффективті бактерияларының сақтау жағдайларын таңдау

1. Әдебиетке шолу

1.1 Мұнай өнімдерінен топырақты тазарту

Мұнай өнімдерін активті ыдырататын микобактериялар мен оларға туыс формалар климат жағдайлары әр түрлі топырақтарда табылған. Осылайша, активті көмірсутегін тотықтыратын микрофлора мамандандырылған болып табылмайды. Бактериялар мен нокардиялар арасында атмосфера азотын өзіне көміртектік қоректің жалғыз көзі ретінде көмірсутегілерді пайдаланып сіңіре алатын қабілеті бар түрлер табылған. Барлық көмірсутегілер қолайлы жағдай кезінде микробты әсер етуге бейім келетіні дәлелденді. Бөлек түрлердің түрлі көмірсутегілерге ара қатынасы арнайы болады: бөлек жеке көмірсутегілерге бейімделген микроорганизмдер кейде басқаларын да тотықтыра алады. Микроорганизмдердің мұнайды тотықтыратын топтары жұмысын ластанудан соң бірден бастайды, олар топырақтағы мұнайдың жоғары концентрациясына қарамайды. Мұнайды тотықтыратын микроорганизмдердің микробиологиялық іс-әрекеті мұнай затының бөлшектік минерализациясына әкеп соқтырады да, сонымен қатар органикалық ерітінділерде ерімейтін мұнай метаболизм өнімдерінің пайда болуын болдырады [2].

Көмірсутегі молекулаларының биодеградация процесі олардың гидроксилденуінен басталады деп тұжырымдайды. Сосын окситуындылар органикалық қышқылдарға айналады, алкандар монотерминальды тотығады, ал аренаалар - аромат сақинасының ыдырауымен жүреді. Ең соңында молекуланың көмірсутектік қаңқасы клетканың жалпы метаболизміне енеді [3].

Топырақтардағы мұнайдың өзгеру жылдамдығы біркелкі болмайды. Мұнайдың негізгі массасы топыраққа түскен соң бастапқы кезеңде жоғалады. Одан кейін осы өзгеріс өте баяу жүреді, әдетте ол мұнайдың топырақтағы концентрациясы 1,0-1,5% жеткен кезде іске асады [4].

Мұнайдың концентрациясының өзгерісімен қатар олардың құрамы да өзгереді. Ең жылдам болып метан-нафтен фракциясы бұзылысқа ұшырайды. Физико-химиялық және микробиологиялық әсер ету процестердің нәтижесінде 1-1,5 жыл ішінде 70% астам мұнайдың жеңіл көмірсутегілері жоғалады, негізінен н-алкандар. Қарапайым полициклды аромат көмірсутегілердің бөлшектік дергадациясы жүреді.

Мұнайдың биодеградациясынан кейін көміртегін тотықтыратын бактериялар саны одан сайын артады, ол біріншідегі санынан әлдеқайда артық болады. Осы кезде қарапайым полициклды аромат көмірсулардың деструкциясы жалғаса береді, осының нәтижесінде н-алкандардың саны қайтадан артады. Тотықтыратын жағдайлар пайда болады, ол ауыр полициклды аромат көмірсутегілердің деструкциясы үшін қолайлы жағдайларды қалыптастырады [5].

Бактериялар ең жақсы н-парафиндерді өзіне сіңіретіндігі дәлелденді. Микроорганизмдердің көбісі тетрадекан, гексадекан, додекан және

парафин майын өзіне сіңіреді. Керісінше олар циклды және аромат көмірсутектерді нашар сіңіреді. Көміртегінің тізбегі қысқарған сайын микроорганизмдердің көмірсутегілерді өзіне сіңіру қабілеті азаяды. Нонан, октан, гексан және декан микроорганизмдердің тек аз санымен ғана өзіне сіңіріледі. Қазіргі кезде көмірсутегілер тек клетка ішінде ғана тотығатындығы дәлелденді. Сондықтан осы қосылыстардың тотығуы біріншіден клетка ішіне кіру сипатына тікелей байланысты. Көміртегі тізбегінің C-10- атомдарын өзіне сіңіру үшін негізінен микроорганизмдермен тікелей қатынас керек. Осындай қатынас бактериялардың, ашытқылардың және саңырауқұлақтардың өсуі тек көмірсутегісі бар орталарда ғана жүзеге асады.

Гидрофобты субстратты сіңіру үшін клеткалардың липофильді клеткалық қабықша қасиеті болу керек. Микобактериялардың басқа бактериялардан айырмашылығы оларда клеткалық қабықшада липидтердің саны артады, ол көмірсутегілер бар орталарда жақсы өседі. Микол қышқылдардың алифат тізбектері гидрофобты бөліктерге ие. Ол барлық штаммдардың құрам бөлігі болып табылады.

Осылайша, көмірсутегілер бар микроорганизмдер клеткаларында олардың клетка қабыршағы үлкен маңызға ие болады, ол көмірсутегілермен тікелей қатынас орнатады [6].

Мұнайдың табиғи жағдайларда деструкцияға ұшырауының зерттеулері осы процестің басқа микроорганизмдермен ассоциациясын болдырады. Олардың компоненттері күрделі қарым қатынастарға түседі.

Олардың ең белсенділері күрделі көмірсутегілерді ыдыратады да, басқа микроорганизмдердің мұнайды деструкциялау процесін жеңілдетеді. Биологиялық активті заттарды синтездеуге қабілеті бар жоғары түрлер ортаны байытады да, оларда басқа микроорганизмдердің пайда болуына жағдай жасайды. Микроорганизмдер ассоциациясы қоршаған ортаның жағдайларына байланысты болады [7].

Барлық топырақтарда көп мөлшерде сұйық парафиндерді тотықтыра алатын микроорганизмдер кездеседі, ал ұшқыш көмірсутегілерді тотықтыра алатын микроорганизмдер өте сирек кездеседі. Құрамында мұнай бар топырақтарда н-алкандарды және аромат көмірсутегілерді ассимиляциялайтын микроорганизмдер саны, осы қосылыстар жоқ топырақтарға қарағанда артық болады. Топырақ микрофлорасына селекциялық әсер ететін, бөлек жеке көмірсутегі қажет ететін, мұнайдың әрекеті біркелкі емес [8].

Мұнаймен ластанған топырақтың, көміртегі атомдарының аз саны (ұшқыштардан басқа) бар парафиндерді тотықтыратын микроорганизмдерді таңдау коэффициенті парафиндердің ұзын тізбектері бар микроорганизмдерімен салыстырғанда әлдеқайда жоғары.

Мұнай өнімдері бар топырақтардағы микроорганизмдер формаларының бар болуына: газтәрізді көмірсутегілерді тотықтыра алатын, қатты парафиндерді қорыта алатын, аромат көмірсутегілерді пайдаланатын бактериялар тән.

Мұнаймен ластанған топырақтардан көмірсутегілерді сіңіре алатын термофильді спора түзетін аэробты бактериялардың өсуінің оптимальды температурасы 45-65. Олар *Baccilus subtilis*, *Bac.coagulans*-қа жатады. Штаммдардың үлкен тобы *Bac.circulans ssp.thermopilus nov.ssp* жаңа түрлері ретінде сипатталған.

Жеңіл парафиндерді (C_6-C_{10}) *Pseudomonas*, *Rhodococcus* туыстарына жататын бактериялар мен кейбір ашытқылармен сіңіре алады [9].

Алифат көмірсутегілер мен мұнай өнімдерін тотықтыру қабілетіне негізінен *Mycobacterium* және *Arthrobacter* туысының түрлері ие [10].

Барлық микробактериялар үшін гидрофобты клеткалық қабыршақ тән, оның құрамында жоғары молекулалы микол қышқылдары бар, осы қышқылдар ортадан н-алкандарды пассивті диффузия жолымен жұту мүмкіндігі арқылы клеткаларға беріледі [11].

Микробактериялар мен псевдомонадалар табиғатта және мұнаймен ластанған аймақтарда кең таралған, осы аймақтарда олар көмірсутегілердің активті ыдыратушылары болып табылады [12].

Mycobacterium mucosum және *Pseudomonas aeruginosa* микроорганизмдері үшін ең қолайлы болып тізбегінің ұзындығы 14-18 көміртегі атомдарынан тұратын н-алкандар жатады. Осы бактериялардың саны таза дақылда 1,5 есе артық болады. Н-алкандардың *P.aeruginosa* клеткаларымен тотықтырған кезде хемотаксис үлкен маңызға ие болады, яғни көмірсутегінің молекулаларына бағытталған қозғалысы, ол микобактериялардың клеткалық қабырғасындағы мамандандырылған липидтердің ассоциациясымен байланысты.

P. aeruginosa микобактериялардың аралас дақылында жақсы өседі. Ол микобактериялар беті липофильді болғандықтан, дамыған кезде ортада көмірсутегілердің эмульгациясы жүретінін көрсетеді. Ал липолфильді қабырғасы жоқ псевдомонадалар үшін бұл жағдай өте маңызды себебі, ол гидрофильді субстратпен әрекеттесу бетін жеңілдетеді [13].

Мұнай өнімдерін активті ыдырататын микобактериялар мен оларға туыс формалар климат жағдайлары әр түрлі топырақтарда табылған. Осылайша, активті көмірсутегін тотықтыратын микрофлора мамандандырылған болып табылмайды. Бактериялар мен нокардиялар арасында атмосфера азотын өзіне көміртектік қоректің жалғыз көзі ретінде көмірсутегілерді пайдаланып сіңіре алатын қабілеті бар түрлер табылған. Барлық көмірсутегілер қолайлы жағдай кезінде микробты әсер етуге бейім келетіні дәлелденді. Бөлек түрлердің түрлі көмірсутегілерге ара қатынасы арнайы болады: бөлек жеке көмірсутегілерге бейімделген микроорганизмдер кейде басқаларын да тотықтыра алады. Микроорганизмдердің мұнайды тотықтыратын топтары жұмысын ластанудан соң бірден бастайды, олар топырақтағы мұнайдың жоғары концентрациясына қарамайды. Мұнайды тотықтыратын микроорганизмдердің микробиологиялық іс-әрекеті мұнай затының бөлшектік минерализациясына әкеп соқтырады да, сонымен қатар органикалық ерітінділерде ерімейтін мұнай метаболизм өнімдерінің пайда болуын болдырады [14].

Көмірсутегі молекулаларының биодеградация процесі олардың гидроксилденуінен басталады деп тұжырымдайды. Сосын окситуындылар органикалық қышқылдарға айналады, алкандар монотерминальды тотығады, ал аренадар - аромат сақинасының ыдырауымен жүреді. Ең соңында молекуланың көмірсутектік қаңқасы клетканың жалпы метаболизміне енеді [8].

1.2 Мұнаймен ластанған топырақтың биоремедиациясы

Ал екінші кезеңде – микробиологиялық, яғни топырақта қалып қойған мұнай өнімдерінің микробиологиялық деградациясын тездету болып табылады. Ол үшін топырақтың қышқылдық және оптималды су-ауалық мінездемесін өндіріп, қажетті минералды қорек пен микроэлементтерді енгізеді. Кезеңнің аяқталғанын топырақ микробиотасының орташа қалпына келуінен және өсімдіктердің өсуі мен дамуынан білуге болады. Бірақ та, топырақ құрамында мұнай деструктор бактериялары бар биопрепараттарды ендіру арқылы барлық кезеңнің мерзімдерін қысқартуға болады [15].

Ең соңғы кезеңі – фиторемедиация деп аталады, яғни мұнайға толерантты өсімдіктерді отырғызу. Тазаланып жатқан қалдықтарға арнайы топырақтан бөлініп алып, селекциялап қолдануға дайын препарат формасында көбейтілген таңдамалы микроорганизмдер енгізіледі. Нәтижесінде қажетті жерде және уақытта жасанды түрде микроптық қауымдастық клеткаларының жоғары концентрациясы құрылады, олар негізгі энергия көзі ретінде органикалық ластаушы заттарды қолданып, метоболизм өніміне айналдырады: CO_2 , H_2O . Осының нәтижесінде топырақтың биохимиялық өздігінен тазалануының табиғи процессіне ластаушының басым әсері төмендеп, метаболизм қалпына келіп топырақ түзілу процестері де қалпына келеді [16].

Мұнай мен мұнай өнімдерімен ластанған топырақты қалпына келтіру үшін биотехнологиялық әдістер қолданылады. Осы техникалық әдістерді бірнеше топтарға бөледі. Олар : агротехникалық, фитологиялық және биологиялық әдістер. Олардың міндеттері:

- топырақ микрофлорасын активтендіру;
- минералды және органикалық тыңайтқыш ретінде биогенді элементтерді енгізу;
- әртүрлі жасыл өсімдіктердің санын көбейтіп енгізу әсері;

Әдістерінің ішіндегі ең қолайлысы – агротехникалық әдіс болып есептеледі. Ол топырақтағы мұнай биодеградация процессін қарқындатады. Агротехникалық әдіс көмегімен, көмірсутек тотықтырушы микроорганизмдер қарқынды тіршілік етеді, топырақ бөліктерінің бұзылуы азаяды және су-ауа режимі жақсарып, оның биохимиялық активтілігі жоғарлайды [17].

Фитологиялық әдісті қолданғанда, мұнаймен ластанған топырақтың биологиялық және сулы-физикалық құрамы жақсарады, азоттық қорек қалпына келеді. Ластанған экожүйелердегі мұнай өнімдері деградациялау әдістерінің ең

тиімді және пайдалы әдісі – биологиялық немесе микробиологиялық әдіс болып есептеледі. Ол жоғарыда айтылған әдістерге қосымша болып табылады. Соңғы жылдары агротехникалық және фитологиялық әдістерді қолданып топыраққа белсенді заттарды, адсорбенттерді, тыңайтқыштарды енгізеді. Осы заттарды енгізгенде топырақтың микробиологиялық белсенділігі қарқынды жүреді. Топырақтың мұнаймен ластануы диспертті мұнаймен тікелей байланысты. Негізінде осы заттар топырақ микрофлорасына әсер етеді. Сонымен қатар олар белсенді деструкторларды тауып, микроорганизмдердің белсенділігін көтеріп мұнай және мұнай қалдықтарын ластанған топырақты қарқынды түрде тазалауға көмектеседі [17].

Биодеградация биоценоздарды регенерацияға әкеледі. Бұл микроорганизмдердің азаюына алып келеді. Мұнаймен ластану кезінде экологиялық үш факторларға әсер етеді.

А. Мұнайдың күрделілігі, ерекше құрамы, әрқашанда өзгеру жағдайында;

Б. Экожүйенің күрделілігі, гетерогенді құрамы, құрлысы;

В. Сыртқы факторлардың көптүрлілігі және өзгергіштігі;

Осыдан қарап, топырақтың мұнаймен ластануын осы үш факторлармен байланыстырып бақылау керек. Рекультивациялау - бұл өзін-өзі тазарту процессі. Мұнда экожүйенің мынадай резервтері қолданылады:

- климаттық;
- микробиологиялық;
- биохимиялық;

Ал экожүйенің өзін өзі тазарту және оның қалпына келуі бұл кезеңделген биохимиялық трансформациялық процесс [18].

Рекультивация механикалық және химиялық әдістері топырақтағы мұнайды толығымен жоймайды. Мұнайдың топыраққа табиғи сіңуі – биохимиялық процесс. Мұнда ең бастысы топырақ микроорганизмдермен функционалдыбелсенділігі. Себебі бұл жағдайда түгелдей мұнайды көмірқышқыл газына, суға дейін минерализациялайды. Рекультивациялау процессінің мерзімі топырақтың климаттық жағдайына оның ластану деңгейіне байланысты [19].

2 Зерттеу материалдары мен әдістері

2.1 Зерттеу объектілері

Атырау облысы Құлсары кен орынан алынған мұнаймен ластанған топырақ үлгілерінен 250 изолят бөлініп алынды.

2.2 Қоректік орталар және микроорганизмдерді культиверлеу жағдайлары

Гравметикалық анализ үшін жинақталған культураларды алу үшін модифицерленген орта 8Е г/л қолданды;

Ортаны дистелденген суда дайындадық және 30 минут ішінде 0,5 атм-да автоклавта залаласыздандырдық.

Модельді көмірсутек субстраты ретінде Теңіз кен орнынан алынған шикі мұнай және дизельді жанармайды қолдандық, яғни оларды герметикалық стақандарда 30 минут ішінде 1 атм-да автоклавтап залаласыздандырды және залалсыздандырудан кейін бөлек ортаға 1% мөлшерде салдық. Микроорганизмдерді культиверлеуді 250 мл Эрленмейер колбасында 7-10 тәулікте 22-28° С-де 220-240 мин/айн тербелмеде жүргіздік.

Жалпы микроб санын есептеу үшін және таза культураларды алу үшін келесі қоректік орталарды қолдандық:

- 1 Модифицерленген орта ЕПА;
- 2 Модифицерленген орта 8Е. Тығыз орталарды алу үшін 20 г/л ұнтақталған агар («ФГУП ГНЦ ПМИБ», Оболенск) қолдандық.

2.2.1 Жалпы микроб санын анықтау

Жалпы микробтардың санын (Нетрусов және т.б 2005) Кох әдісімен анықтадық. Егілген микроорганизмдерді 4-7 тәулікте 4 °С де инкубацияладық.

Микроорганизмдердің өсуінің температурасын зерттеу.Микробтық жиынтықтардың өсуінің температурасының диапазонын 1 г/л глюкозамен байытылған 8Е минеральді ортада жүргізді.

Микроорганизмдердің биомассасының өсуі спектрофотометрдің (LKB Biochorm 4050) оптикалық тығыздықтың ұзындығы $\lambda=540$ нм және $l=10$ оптикалық қалыңдықта бағаладық.

2.2.2 Микроорганизмдердің таза культурасын алу

Мұнай деструкциясына мүмкіншілігі бар микроорганизмдердің таза культурасын бөліп алу 4°С температурада целлюлозды фильтрді салу әдісімен

жүргіздік. Қолданған әдістердің кейбір бөлшектері жұмыстың сәйкес бөліміне байланысты жүргізілді.

2.2.3 Микроорганизмдердің физиолого-биохимиялық және морфологиялық ерекшеліктерін зерттеу

Таза культуралардың боялған фиксацияланған клеткалары және микробтық жиынтықтың препараттардың морфологиялық ерекшеліктерін зерттеуді фазалық контрасттық құрылығысы бар $\times 1000$ ұлғайтатын жарық микроскопымен (Carl Zeiss Jena planchomat 40/0,65 объективімен) зерттедік. Препараттардың фотоға түсіруді Nikon D7000 PA-7Y 4.2 ЛОМО линза жүйесі бар фотоаппаратпен жүргізілді.

Таза культуралардың физиолого-биохимиялық қасиеттерін белгілі әдіспен (Нетрусов және т.б 2005) жүргізді.

Штаммдардың субстартты спектрін зерттеу Таусонның тығыз ортасында (Егоров 1976) қуыс әдісінің көмегімен жүргіздік. Микроорганизмдердің энергиясы үшін және көмірсутегінің жалғыз көзі ретінде минеральді ортаға келесі КС: *n*-алкан (актан, изооктан, ундекан, додекан, тетрадексан, гексадексан) нафтенді (цеклогексан), ароматтық (бензол, толуол, ксилол, бифенил), полиароматтық (нафталин, фенантрен, антрацен, тетралин, декалин, 1-метилнафталин), КС қоспалары (А-95 маркалы бензин, дизельді жанармай, керосин, маторлық май, смола) қостық. КС-ті Петри табақшасында агарлы минералдық ортасына 8мм қуыстарға залалсыздандырылған таяқшамен егіздік. Қуыстардың айналасын штрихмен субстратпен қуыстан Петри табақшасының шеткі бөлігіне дейін жүргізіп шықтық КС ассимиляция мүмкіншілігін 4°C инкубациясында 7-14 тәулікте культураның өсу интенсивтілігімен анықтадық.

2.3 Мұнай деструкциясының деңгейін анықтау

Мұнайдың деструкциясының деңгейі таразы (гравметикалық) әдіспен сұйық ортада (Леоненко және т.б 2010) мұнайдық суммарлы көрсеткіші бойынша анықтадық. Мұнайдық КС гексанмен экстракциясының гравметикалық анализін МЕСТ Р 52406-2005, ISO 9377-2:2000 бойынша жүргіздік. КС экстракциясын культиверлеудің 10-20 тәулік өткенсоң 4°C де жүргіздік. Экстракциялау үшін сынамаларға 20 мл эталонды *n*-гександы 20 мл құйдық, содан соң оларды 25 ° С 30 минутқа сулы және көмірсутегті фазаның және мұнай компоненттерінің толықтай экстракциясы үшін орбитальді шейкер (220 мин/айн) қойдық.

Араласу тоқтағансоң колбаларды дистелденген сумен КС полярлы емес фазасына дейін толықтырылды, содан соң әйнекті пипеткамен 1 мл экстракт алынды. Элюаттар фильтрмен бірге әйнекті воронкаға көшірілді. КС экстрактін 10 мл жылы (40°C) *n*-гексан бар әйнекті шприцпен араластрдық. Фильтрларды

шамалап өлшенген әйнекті колбаға жинадық, содан соң бөлме температурасында кептірдік. Толықтай буланудан соң тағы бір рет жиналған КС мөлшерін анықтау үшін өлшедік. КС деструкциясының деңгейін бақылаудан пайызбен көрсетті. Жеңіл көмірсутегі фракциясының булану деңгейін анықтау үшін бақылау тәжірибие үлгілері бар шейкерде тұрған бөлек колбадағы «мл НД (1:1) қосылған қоректік орта болып саналады.

2.4. Сақтаудан соң КС қатынасында клеткалардың белсенділігі және өміршендігін анықтау

Микроорганизмдердің клеткаларының өміршендігінің есебін анықтау үшін РСА модификацияланған тығыз ортаға стандартты сериялық егу әдісімен (Нетрусов және т.б 2005) жүргізілді. Өміршендікті бақылаудағы клеткалардың сақталған есебі шығушы клеткалардың өміршендігінің қатынасы бойынша анықталды (басынан аяғына дейін). Сақтаудың тиімділігін бағалау үшін колония түзуші бірлігіне (КТБ) есеп жүргіздік.

Криопробирка ішіндегіні ерітуді 32-35°C температурада жүргіздік. Криосақталған үлгілердің посеvін 40 мин соң ерітуден және модификацияланған орта Таусон НД қоспасымен бірге жақсылап араластырғаннан соң жүргіздік. Үлгілердің культиверленуі 7-10 тәулікте 4° С де ортамен араластыра отырып жүргіздік.

Лиофизацияланған культураларды ампулаға 0,5 мл Таусон ортасын құйдық, содан соң 15 мин ішінде клеткалардың регидратациясын жүргіздік, супензияларды араластыру вортексте жүзеге асты.

Жеделдетілген сақтауға тест (термотұрақтылыққа тест). Лиофилизделінген культурасы бар ампулалар 35-50 °С температурада сақтауға орналастырдық. Белгілі бір уақыт яғни 10-17 тәуліктен соң клеткалардың өміршендігін анықтау үшін ампулаларды аштық, РСА модификацияланған қоректік ортасында клеткалардың регидратациясын жүргіздік. Сақтаудың белгілі бір уақытын анықтау үшін 4° С температурада Аррениус теңестірілуін қолдандық. $K=K_0 e^{-E/RT}$, бұл жерде K_0 экспоненциальді көбейткіш, E - активация энергиясы, R -тұрақты газ, T -абсолютті температура ($273^{\circ}+t^{\circ}$) [Кузнецов және т.б 1977]. Экспериментальді мәліметтердің анализі үшін аз квадраттардың әдісін қолдандық (Gill, 1981)

Алынған нәтежиелердің статистикалық өңделуі. Алынған нәтежиелерді статистикалық өңдеуді Microsoft Excel 2010 бағдарламасы бойынша жасадық. Алынған нәтежиелер орташа арифметикалық және оның стандартты қатесімен көрсетілді ($M \pm m$). Алынған нәтежиелердің нақты айырмашылығын Стьюдент коэффициентін ($P > 0,95$) қолдануымен бағаладық.

3 Зерттеу нәтижелері және оларды талқылау

3.1 Мұнаймен ластанған топырақтан изоляттарды бөліп алу

Атырау облысы Құлсары кен орынан алынған мұнаймен ластанған топырақ үлгілерінен 250 изолят бөлініп алынды, оның ішінде 100 изолят құрамында мұнай концентрация 1%-ге тең минералды ортада өсе алатын мүмкіншілігіне ие болды.

Орта құрамында мұнайдың әр түрлі көрсеткіштерінде (2%, 3%, 5% және 7%) өсуді бағалау кезінде, көбінесе (98) изолят құрамында мұнай концентрациясы 2%-ке тең ортада жақсы өскендігін көрсетті. Мұнайдың құрамын ортада жоғарлатудың нәтежиесінде дақылдар нашар өсті. Осылайша 15 изолят құрамында мұнай концентрациясы 3%-ке тең ортада жақсы өсті. Мұнай концентрациясы 5%-ке тең минералды ортада тек қана 5 изоляттың өсуін жақсы деп белгіледік. Басқа дақылдарда өсу байқалмады. Осылайша мұнай концентрациясы 5%-ке тең ортада жақсы өсетін 5 дақылды сұрыптап алдық.

Изоляттардың жаңа түрлерінің мұнай жинақтаушы және мұнай ыдыратушы қасиеттерін сулы ортаның беткі бөліктеріне мұнайды құю модельді тәжірибие бойынша зерттедік. Мұнайды ыдырату белсенділігіне 35 изолят ие болды, яғни мұнай дағының ыдырауы жүрді. Көптеген изоляттарда дақтың қалыңдығының кішірейгендігі бақыланды және ақырын оның жоғалуы байқалды. Айрықша белсенді изоляттарда дақтың қалыңдығының өзгеруі 3 тәулікте белгіленді. Мұнай жинақтаушы мүмкіншілік 19 изолятта байқалды. Мұнайды жинақтаудың еселігі 5-ші тәулікте 4,09-4,12 және 10-шы тәулікте 6,11-6,45 құрады. Мұнаймен ластанған топырақтарды тазалауда көмірсутектотықтырушы микроорганизмдерді практикада қолдану үшін мұнай және мұнай өнімдерінің жоғары концентрацияларын деградациялай алатын дақылдар тиімді болып табылады. Мазут қиын деградацияланатын мұнай өнімдеріне жатады, сондықтан 19 изолятты құрамында 10 нан 30 мл/л мазут бар ортада өсу мүмкіншілігін бақылады. Осылайша, 10-20 мл/л концентрациялы мазуты бар ортада 3 изолят жақсы өсті.

Барлық зерттелген көмірсутектотықтырушы изоляттар құрамында мұнайдың жоғары концентрациясы бар ортада өсуге мүмкіншілігі бар екендігі анықталды. Тексеріліген 19 изоляттың ішінде тек 5 —уі 30-50 мл/л мазуты бар ортада өскенін байқадық (кесте 1).

1 Кесте - Мұнай және мазуттың әр түрлі концентрациялы сұйық ортада өсу мүмкіншілігі бойынша дақылдарды сұрыптау

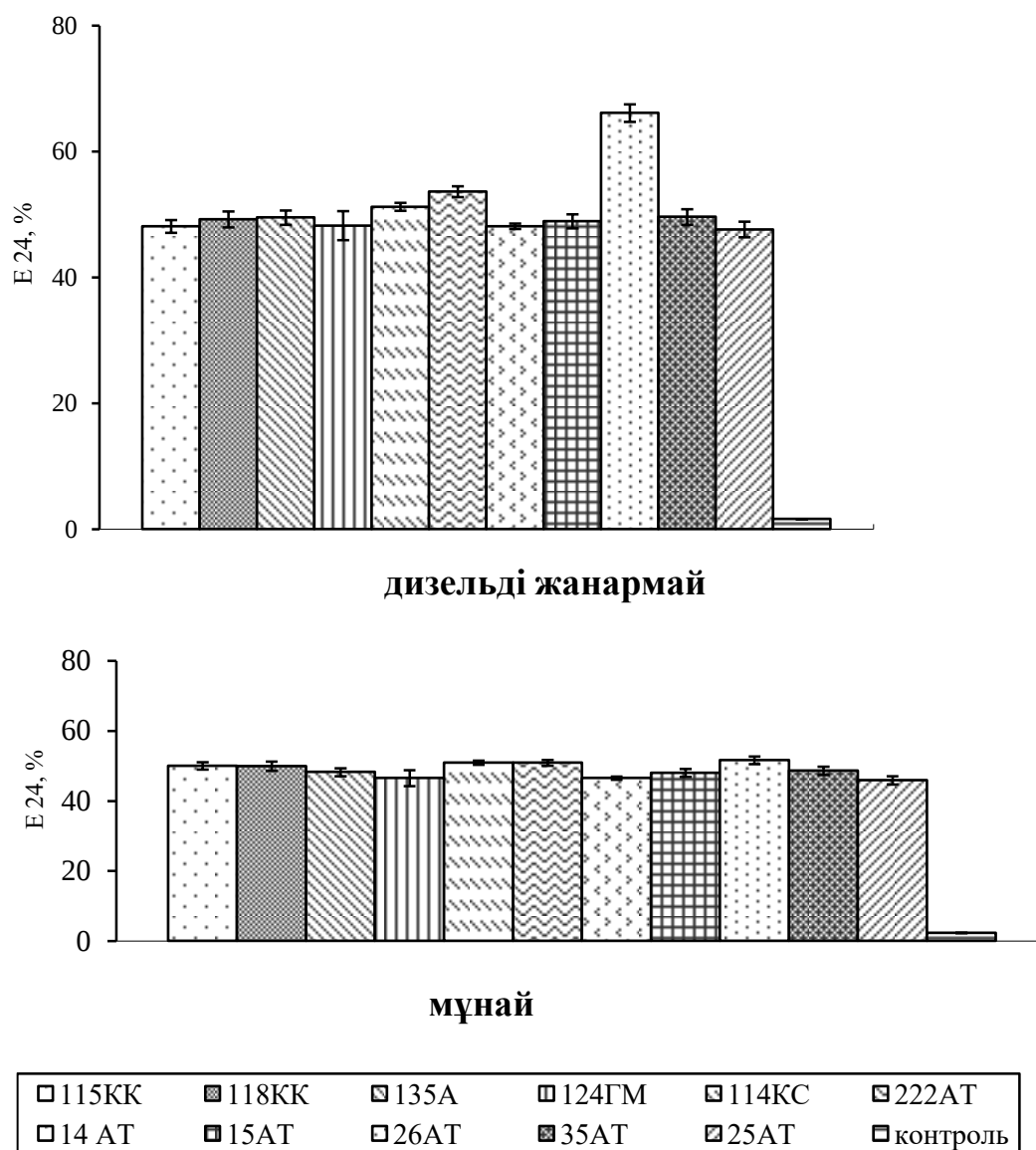
Изоляттар	мазут			мұнай	
	Көмірсутек құрамы, мл/л				
	10 мл/л	20 мл/л	30 мл/л	30 мл/л	50 мл/л
14 АТ	+++	++	+	+++	+++

Изоляттар	мазут			мұнай	
	Көмірсутек құрамы, мл/л				
	10 мл/л	20 мл/л	30 мл/л	30 мл/л	50 мл/л
15АТ	+++	++	+	+++	+++
9АТ	++	++	+	++	+
6АТ	++	+	+	++	+
3АТ	++	++	+	++	+
18АТ	++	+	+	++	+
13АТ	+++	++	+	++	+
15АТ	++	++	+	++	+
33АТ	++	+	+	++	+
26АТ	+++	+++	+	+++	+++
35АТ	+++	+++	+	+++	+++
25АТ	+++	+++	+	+++	+++
11АТ	++	+	-	++	+
22АТ	++	+	-	++	-
77АТ	++	+	-	++	+
43АТ	++	+	-	++	-
112АТ	++	+	-	++	+
10АТ	++	+	+	++	+
38АТ	+++	++	+	++	+
Ескерту: «+++» - жақсы өсу, «+» - нашар өсу; «-» - өсу жоқ;					

Мұнай тотықтырушы микроорганизмдер дақылдау ортасында көмірсутектің болуына жауап ретінде беткейлі белсенді заттарды синтездей алады. Сондықтан зерттелетін штаммдардың беткейлі белсенді заттарының синтезделу мүмкіншілігін эмульгациялау индексі (E_{24}) бойынша бағаладық.

Эмульгациялау индексін бағалау кезінде көмірсутек субстраты ретінде мұнай, дизельді жанармай және вазелин майын пайдаландық. Көмірсутектотықтырушы штаммдардың культуральді сұйықтығының эмульгациялау индексі 50 % құрайтындығы анықталды.

Дақылды сұйықтықтың жоғары эмульгациялау индексі дизельді жанармай қолданғанда байқалды. Дизельді жанармай және мұнайда 3 изоляттың эмульгациялау индексі $51,2 \pm 0,48$ % тен $66,1 \pm 1,02$ дейін құрады. Қалған көмірсутектотықтырушы бактериялардың эмульгациялау индексі барлық көмірсутек субстраттарында 50 % төмен болды (сурет 1). Бәрімізге белгілі егер дақылдың эмульгациялау индексі 50% жоғары болса, онда беткейлі белсенді заттардың тиімді продуценттері болып саналады. Осылайша көмірсутектотықтырушы бактериялардың 3 изоляты беткейлі белсенді заттарды белсенді продуцирлей алады.



1 Сурет – микроорганизмдердің жаңа штаммдарының дизельді жанармай және мұнайды эмульгациялау индексі

Зерттеу жұмысының келесі бөлімінде топырақта мұнайдың жоғары концентрацияларын жоя алатын белсенді штаммдардың мүмкіншілігі тексерілді. Бұл үшін Атырау облысының Құлсары кен орнының мұнаймен ластанған топырақтарына қосымша 95000 мг/кг дейін топыраққа мұнай енгізді.

Зерттеу нәтижесі бойынша 30 тәуліктен соң мұнай мөлшері бақылауда микроорганизмдерді енгізбей топырақта $94940,1 \pm 8,9$ мг/кг дейін төмендеді. Тәжірибие нұсқаларында 26АТ дақылын енгізу нәтежиесінде 30 тәулікте мұнай мөлшері $41230 \pm 9,1$ мг/кг дейін төмендеді. 222АТ және 114КС дақылдары осылайша жақсы деструктивті белсенділікке ие болды. Олар топырақта мұнайды белсенді ыдырата түсті және топырақта көмсірсутек концентрациясы 30 тәулікте сәйкесінше $44300 \pm 8,5$ және $42360 \pm 9,6$ мг/кг құрады (кесте 2).

2 Кесте - Мұнаймен ластанған (10 %-ке дейін мұнай) топырақ үлгілерінде жаңа штаммдарының деструктивті белсенділігі

Нұсқалар	Мұнайдың бастапқы концентрациясы, мг/кг құрғақ топырақта	Құрғақ топырақта мұнайдың қалдықты концентрациясы, мг/кг			Мұнайдың азаюы, %
		тәулік			
		0	10	20	
26АТ	94312±9,1	72240±1,4	5456±8,7	41230±9,1	57,9±5,9
222АТ	94312±8,2	78930±9,5	65163±9,6	44300±8,5	54,7±3,9
114КС	95298±1,2	79600±7,6	58045±7,9	42360±9,6	56,1±3,4
Бақылау	95309±8,9	64200±6,2	64004±5,6	89400±8,9	7,1±4,6

Мұнаймен ластанған топырақтарды тазалауда үлкен қиындықтар мұнаймен топырақтың қатты ластану кезінде пайда болатындығы белгілі, яғни бұндай топырақтар пайдаланудан алып тасталады. Осылайша қатты ластанған топырақтардың биоремедиациясы үшін жоғары ластану жағдайларында өмір сүре алатын микроорганизмдер тиімді болып табылады. Осыған байланысты қатты жағдайда жоғары концентрациялы мұнайы бар топырақта мұнайототықтырғыш микроорганизмдердің деструктивті белсенділік мүмкіншілігінің бағалауы жүргізілді (кесте 3).

26АТ изоляты қолданылған тәжірибие нұсқасында мұнай құрамы 10 тәулікте 196000±3,4 мг/кг дейін төмендеді. 222АТ және 114КС биомассасы қолданылған нұсқада 10 тәулікте мұнай мөлшері топырақта 196060±9,5 мг/кг дейін төмендеді. Осы изоляттардың тәжірибиенің 30 тәулікте жойылу деңгейі сәйкесінше топырақта 160900±1,6 және 169900±1,4 мг/кг құрады.

Мұнайды жоюдың ең жақсы нәтежелері 26АТ енгізу кезінде алынды, 30-шы тәулікте мұнайдың мөлшері 153000±1,1 мг/кг дейін төмендеді. Топыраққа көмірсутекототықтырушы микроорганизмдерді енгізу микроорганизмдердің 3-4 есеге жоғарлауына ықпалын тигізеді.

3 Кесте - Мұнаймен ластанған (20%-ке дейін мұнай) топырақ үлгілерінде жаңа штаммдарының деструктивті белсенділігі

Нұсқалар	Мұнайдың бастапқы концентрациясы, мг/кг құрғақ топырақта	Құрғақ топырақта мұнайдың қалдықты концентрациясы, мг/кг			Мұнайдың азаюы, %
		Тәулік			
	0	10	20	30	
26АТ	200400±3,4	196000±3,4	188200±7,7	153000±1,1	24,1±1,2
222АТ	201130±3,2	196060±9,5	189009±4,6	160900±1,6	21,2±0,9

3 Кестенің жалғасы

Нұсқалар	Мұнайдың бастапқы концентрациясы, мг/кг құрғақ топырақта	Құрғақ топырақта мұнайдың қалдықты концентрациясы, мг/кг			Мұнайдың азаюы, %
		Тәулік			
	0	10	20	30	
114КС	208900±4,2	198000±8,1	195000±6,9	169900±1,4	19,2±0,7
Бақылау	201200±3,1	201000±1,2	199000±1,1	196100±3,2	2,1±0,02

Осылайша алынған нәтижелер бойынша тексерілген мұнайотықтырушы микроорганизмдер жоғары концентрациялы жағдайда мұнайдың деструкциясын жүзеге асыра алатын мүмкіншілікке ие екендігі анықталды. Атырау облысының топырақ үлгілерінен бөлініп алынған 26АТ,222АТ және 114КС жаңа изоляттарды мұнаймен ластанған топырақтарды тазалауға арналған биопрепараттар шығару үшін негізі ретінде ұсынуға болады.

3.2 Мұнай тотықтырушы микроорганизмдердің жаңа композициясын алу үшін негізгі параметрлерді жетілдіру

3.2.1 Мұнай тотықтырғыш микроорганизмдердің негізгі параметрлерін жетілдіру

Қорашаған ортаның өздігенен тазаланудың кешендік процессінде басты рөлді көмірсутектотықтырушы микроорганизмдер атқарады. Көптеген микроорганизмдерге тән негізгі экологиялық өте маңызды қасиеті жалғыз көмірсутекті қоректену көзі ретінде көмірсутектерді сіңіре алады. Осылайша олар басқа органикалық әлемнен ерекшеленеді.

Көмірсутектерді қолданатын микроорганизмдер табиғатта кеңінен таралғаны белгілі[8-10].

Көмірсутектотықтырушы микроорганизмдер мұнайдың әр түрлі көмірсутектерін ыдырата алады және осыған қатысты үлкен ғылыми және практикалық қызығушылық көрсетеді. Осылайша ластанған топырақтың және қоршаған ортаны қорғау үшін қажетті қасиеттерге ие мұнай тотықтырушы микроорганизмдерден жаңа композицияларды құрастыру үшін олардың морфологиялық, физиолого-биохимиялық белгілерін зерттеу қажет.

Атырау облысы, Құлсары кен орнының топырағынан бөлініп алынған 8 белсенді штаммдардың морфологиялық белгілері зерттелген. Барлық

изоляттардың клеткалары тізбектеле орналасқан таяқша тәрізді пішінге ие екендігі байқалды.

Барлық изоляттар Грамм бойынша оң боялды, ортада пигменттер бөлінбеді. Споралар түзілді.

4 Кесте - Мұнайтотықтырғыш микроорганизмдердің морфологиялық белгілері

Сипаттамасы	Белгінің болуы және болмауы							
	62М	63М	64М	65М	67 М	26АТ	222АТ	114КС
Клетка пішіні	Таяқша	Таяқша	Таяқша	Таяқша	Таяқша	Таяқша	Таяқша және кокка	Таяқша және кокка
Клетка көлемі, мкм	0,3 - 1,5 х 0,8-4,8	0,5 - 1,4х 0,9-4,8	0,5 - 1,4 х 0,8-4,2	0,3-1,3 х 0,6-0,9	0,2-1,3 х 0,4 - 1,3-	0,5 -1,4 х 0,8-4,2	0,2-0,4 х 0,5-0,8	0,2-0,3 х 0,5-0,8
Қозғалуы	-	-	-	-	-	-	-	-
Грамм бойынша боялуы	+	+	+	+	+	+	+	+
Спора түзілуі	+	+	+	+	+	+	-	-

ЕПА ортасында 62М ақ, ірі, диаметр 5-10 мм жалпақ колониялар түзді. Өсудің тиімді температурасы 28-32° С және ортаның рН шамамен 6,8-7,4. 63М изолятының колониясы ақ, түссіз, консистенциясы майлы, колонияшеттері тегіс, өсудің тиімді температурасы 28-32 °С. 64МС және 26АТ изоляттарының колониясының түсі крем түстес ақ, колониялар түссіз емес және үлпекті консистенцияға ие, шеттері толқынды болып келді. 65МС және 67 МС изоляттарының колонияларының көлемі 3-7 мм, колония түсі крем түстес, колониялар түссіз емес, шеткі бөліктері толқынды. (кесте 4, сурет 2).

222 АТ изолятының клеткалары қысқа таяқшалар және коккалар. Олар ЕПА да ірі, дөңгелек, 2-4 диаметрге тең шығыңқы колониялар түзді, колония түсі ал қызғылт, майлы консестенциялы, колония шеттері тегіс болып табылды. Өсудің тиімді температурасы 28-32° С және ортаның рН шамамен 6,8-7,4. Барлық изоляттар Грамм бойынша оң боялды, ортада пигменттер бөлінбеді (кесте 10, сурет 7). Бактериальді изоляттар құрамында 2% NaCl бар ортада жақсы өсті, ал 5% жоғары концентрациялы ортада тек қана екі изолят: 62 Мжәне 63М өсті (кесте 5).

5 Кесте - Мұнайтотықтырушы микроорганизмдердің физиологиялық белгілері

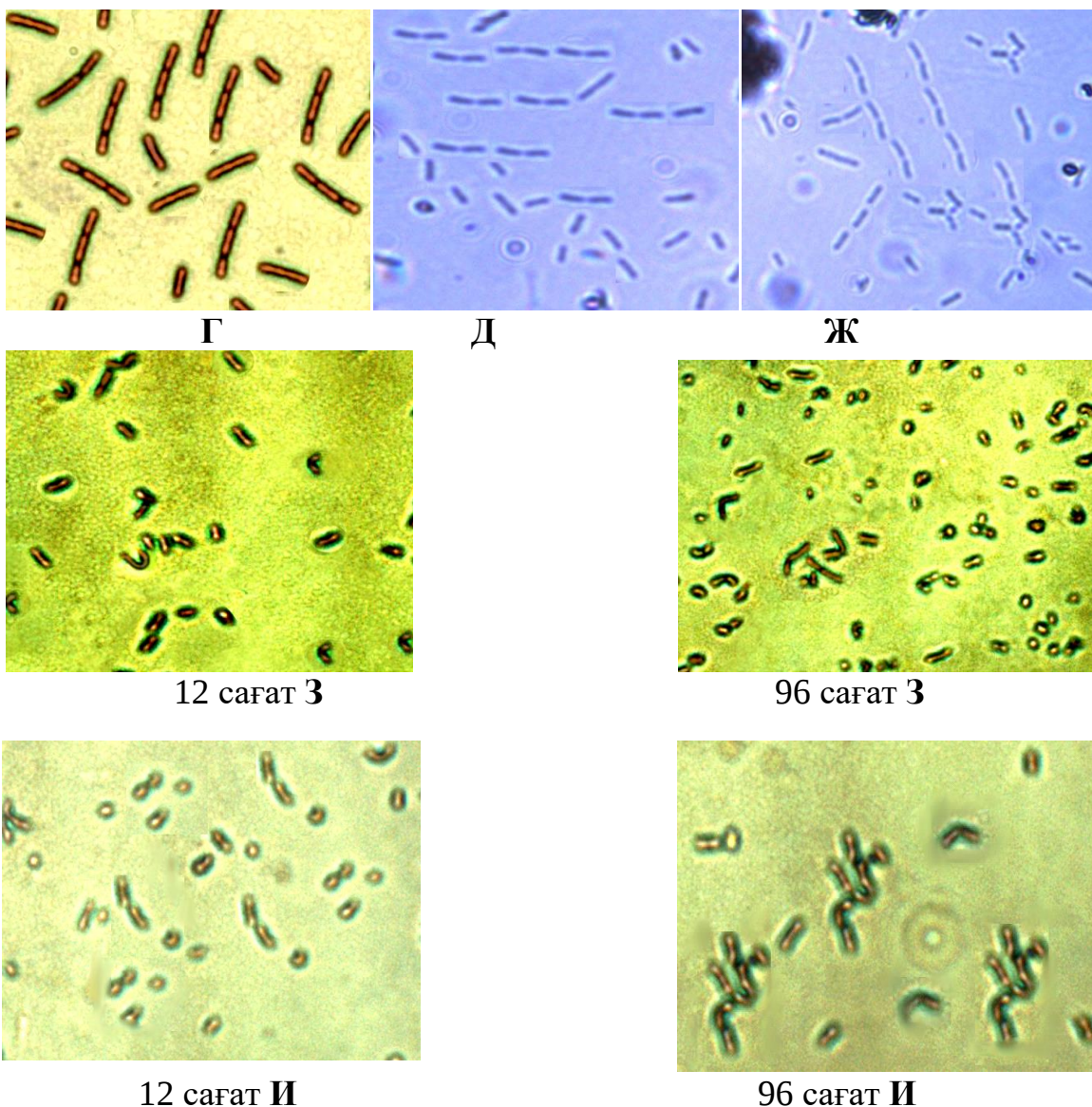
Сипаттамасы	Белгінің болу және болмауы							
	62М	63М	64М	65М	67 М	26АТ	222АТ	114КС
Оптимум температура, ° С	28-32	28-32	28-32	28-32	28-32	28-32	28-32	28-32

5 Кестенің жалғасы

Сипаттамасы	Белгінің болу және болмауы							
	62М	63М	64М	65М	67 М	26АТ	222АТ	114КС
Әр түрлі температурада өсуі: 4°								
10°	+	+	+	+	+	+	+	+
25°	+	+	+	+	+	+	+	+
37°	+	+	+	+	+	+	+	+
45°	+	+	+	+	+	+	+	+
55°	-	-	+	+	+	+	+	+
	-	-	+	+	+	+	+	+
Оптимум температура, ° С	28-32	28-32	28-32	28-32	28-32	28-32	28-32	28-32
О ₂ қатысы	аэробты	аэробты	аэробты	аэробты	аэробты	аэробты	аэробты	аэробты
Оптимум рН	6,8-7,4	6,8-7,4	6,8-7,4	6,8-7,4	6,8-7,4	6,8-7,4	6,8-7,4	6,8-7,4
Синтеетикалық ортада өсуі	+	+	+	+	+	+	+	+
Қышқылғы тұрақтылығы	-	-	-	-	-	-	+	+
NaCl өсуі								
2%	+	+	+	+	+	+		
5%	+	+	-	+	-	-	+	+
							+	+
Ескерту: «+» - көрсетілген белгі, «-» - белгі жоқ.								

Барлық бактериялар тек 64 М және 26АТ штаммдарынан басқасы глюкоза, фруктоза, арабинозаны қолданды. Барлық зерттелген бактериялар лактозаны қолданбады, ал сахарозаны 65 МС изоляты қолданды. Рамнозаны 62М, 63 М, 64 МС және 26АТ изоляттары қолданды, ал 65МС және 67МС изоляттары маннитты қолданды (кесте 6).





Ескерту : А - 62М; Б – 63М; В – 67М; Г – 64М; Д – 65М; Ж – 26АТ; З – 222АТ; И -114КС

2 Сурет – Бактерия клеткаларының морфологиясы

Ферменттік белсенділікті зерттеу кезінде барлық бакетериальді изоляттар каталазалық белсенділікке ие екендігі анықталды. Көмірсутекті бакетриялардың ішінде 5 изолят (62М, 63М, 64 М, 26 АТ және 67 М)желатинді сұйылтты (кесте 6).

6 Кесте - Көмірсуларды ассимиляциялау мүмкіншілігі

Изоляттар	Көмірсуларды қолдану мүмкіншілігі						
	Глюкоза	Сахароза	Фруктоза	Лактоза	Арабиноза	Рамноза	Маннит
62М	+	-	+	-	+	+	-

6 Кестенің жалғасы

Изоляттар	Көмірсуларды қолдану мүмкіншілігі						
	Глюкоза	Сахароза	Фруктоза	Лактоза	Арабиноза	Рамноза	Маннит
63M	+	-	+	-	+	+	-
64M	-	-	-	-	-	+	+
65M	+	+	+	-	+	-	+
67M	+	-	+	-	+	-	-
26AT	-	-	-	-	-	+	+
222AT	+	-	+	-	+	+	+
114KC	+	+	-	+	-	-	-
Ескерту : «+» - қолданады, «-» - қолданбайды.							

7 Кесте - Көміртектотықтырушы бактериялардың биохимиялық белгілері

Қасиеті	Изоляттар							
	62M	63M	64M	65M	67 M	26AT	222AT	114KC
Каталадық белсенділік	+	+	+	+	+	+	+	+
Оксидазалық белсенділік	-	-	-	-	-	-	-	-
Желатинді сұйылтуы	+	+	+	-	+	+	-	-
Крахмал гидролизі	+	+	+	+	+	+	+	+
Ацетоиннің түзілуі	-	-	-	-	-	-	-	-
Фенилаланиннің дезаминденуі	-	-	-	-	-	-	-	-
Индолдың түзілуі	-	-	-	-	-	-	-	-
Нитраттардың қайта қалпына келуі	+	+	+	+	-	+	+	+
Тирозиннің сұйылтуы	+	+	-	-	+	-	-	+
Жанармай қышқылының сұйылтылуы	-	-	-	+	-	-	+	+
Лимон қышқылының қолданылуы	-	-	-	-	-	-	-	+

Қасиеті	Изоляттар							
	62М	63М	64М	65М	67 М	26АТ	222АТ	114КС
Этанолдағы өсуі	-	-	-	-	+	-	-	-
Жасыл малахитта өсуі	+	-	+	-	-	+	+	-
Лизоцимды ортада өсуі	-	-	-	-	-	-	-	-
Пропионатта өсуі	-	-	+	+	-	+	-	-
Цитратта өсуі	-	-	+	+	-	+	-	-
Ескерту: «+» - көрсетілген белгі, «-» - белгі жоқ.								

Барлық бактериальді изоляттар синтетикалық ортада өсті және крахмал гидролизін жүзеге асырды. Ацетоин және индолды түзбеді, дезаминдену болмады. 62М, 62М және 67М изоляттар лизоцимомды ортада өспеді, тирозинді (кесте 7).

62М, 63М, 64М, 65М, 67 және 26 АТ изоляттары морфологиялық және физиолого-биохимиялық белгілері жиынтығы бойынша *Bacillus* түріне жатқызылды. 62М, 63 және 67 штаммдары глюкоза, фруктоза және арабинозаны ассимилиациялайды, олар сахароза, маннит, пропионат, цитритті пайдаланбайды, лизоцимды ортада өспейді, тирозинді сұйылтады. Осы белгілерге негізделі отырып олар *Bacillus brevis* түріне жақын болып табылады. Штамм 64, 65 және 26АТ нитраттан нитратқа дейін қайта қалпына келуі және тирозинді сұйылтпау белгілері бойынша *Bacillus subtilis* түріне жатқызылды.

Штамм 222АТ тез өсетін микобактерия түріне жатады және микобактерияның өмір сүру циклі ұқсас (таяқша-кокк-таяқша). Негізгі көмірсуларды пайдаланады, сахарозамен лактозадан басқасын, цитратты ассимилиацияламайды және жасыл малахитта өспейді, бензойды қышқылды сұйылтады және осы белгелерге негізделі отырып штамм 222АТ *Mycobacterium* түріне жақын деп есептелді (кесте 11-13).

Штамм 114КС өмір сүру циклі родококка үшін тән (кок-таяқша) қысқа таяқша немесе бұтақтанып өседі. Грамм оң, қышқылға тұрақты. Негізгі көмірсулар глюкоза, сахароза және лактозаларды пайдаланады, тирозинды, лимон және бензой қышқылын сұйылтады және осы белгілер бойынша штамм 114 КС *Rhodococcus ruber* туысына жақын.

Осылайша морфологиялық және физиолого-биохимиялық белгілері бойынша мұнаймен ластанған топырақтан бөлініп алынған 6 изолят *Bacillus* тобына жатқызды. Олардың арасында 3 штамм 62М, 63М және 67М идентификацияланған *Bacillus brevis* түріне жақын, 3 штамм 63М, 65М және 26АТ *Bacillus subtilis* түріне жатады. Штамм 222АТ *Mycobacterium* туысына жатады және штамм 114 КС *Rhodococcus ruber* түріне жақын.

Мұнайтотықтырғыш микроорганизмдерден биопрепарат құрастыру үшін жалпы микробиология лабораториясының коллекциясынан және сонымен қатар Құлсары кен орнының топырақтарынан бөлініп алынған жаңа белсенді штаммдарын қолданды [14].

Микроорганизмдердің әр түрлі түрлерінің 16 штаммдары зерттелді. Әр түрлі рН диапазонды ортада олардың өсуінің зерттеуі жүргізілді. Әр түрлі рН диапазонды ортада мұнайтотықтырғыш микроорганизмдердің өсуін бағалау үшін ЕПА және Сабуро қоректік орталарын пайдаландық. Ортаның рН деңгейін НСІ немесе 3 % КОН қосу арықлы анықтадық. Нәтежиелер 14-ші кестеде көрсетілген.

8 Кесте - Әр түрлі рН диапазонды ортада мұнайтотықтырғыш микроорганизмдердің өсуі

штаммдар	Дақылдың бөлініп алынған орын	Ортаның рН диапазоны				
		2,8	4,5	6,8	7,8	9,5
<i>Bacillus brevis</i> 62M	Құлсары кен орнының мұнаймен ластанған топырағы	+	+	+++	++	+
<i>Bacillus brevis</i> 63M		+	+	+++	++	+
<i>Bacillus subtilis</i> 64M		+	+	+++	++	+
<i>Bacillus subtilis</i> 65M		+	+	+++	++	+
<i>Bacillus brevis</i> 67 M		+	+	+++	++	+
<i>Bacillus subtilis</i> 26AT		+	+	+++	++	++
<i>Mycobacterium sp.</i> 222AT		+	+	+++	++	++
<i>Rhodococcus ruber</i> 114KC		+	+	+++	++	++
<i>Rhodococcus sp.</i> 115K	Құмкөл кен орнының мұнаймен ластанған топырақ	+	+	+++	++	++
<i>Micrococcus paraffinae</i> 135A		+	+	+++	++	++
<i>Mycobacterium sp.</i> 229 C3	Алматы локомотивті Депо мұнаймен ластанған топырақ	+	+	+++	++	++
<i>Rhodococcus sp.</i> 1 C3		+	+	+++	++	++

штаммдар	Дақылдың бөлініп алынған орын	Ортаның рН диапазоны				
		2,8	4,5	6,8	7,8	9,5
<i>Trichosporon terrestre</i> 7CKP		+	+	+++	++	+
<i>Trichosporon capitatum</i> MCM 57		+	+	+++	++	+
<i>Trichosporon terrestre</i> CM7		+	+	+++	++	+
<i>Trichosporon capitatum</i> 7CA		+	+	+++	++	+
Ескерту : «+++» - жақсы өсу, «++» - орташа өсу, «+» - нашар өсу, «-» өсу жоқ						

Ортаның рН 2,8 және 4,5 көрсеткішінде барлық мұнайотықтырушы микроорганизмдер нашар өсуді көрсетті, рН 6,8-7,8 диапазонды ортада жақсы өскен. Бактериальді штаммдар *Bacillus subtilis* 26AT, *Mycobacterium sp.* 222AT, *Rhodococcus ruber* 114KC, *Micrococcus paraffinae* 135A, *Mycobacterium sp.* 229 C3 и *Rhodococcus sp.* 1 C3 рН 9,5 диапазонды ортада орташа өсуді көрсетті, ал ашытқы *Trichosporon terrestre* 7CKP, *Trichosporon capitatum* MCM 57, *Trichosporon terrestre* CM7 и *Trichosporon capitatum* 7CA нашар өсуді көрсетті (кесте 8).

Ары қарай осы дақылдардың ас тұзының әр түрлі 2 % ден 15 %. Дейін концентрациясында бағалауы жүргізілді. Барлық осы микроорганизмдердің дақылдары құрамында 2 % және 5 % ас тұзы концентрациясы бар ортада жақсы өсті (кесте 9).

9 Кесте - Ас тұзының әр түрлі концентрациясы бар ортада мұнайотықтырушы микроорганизмдердің өсуі

штаммдар	Ас тұзының концентрациясы, %				
	2	5	7	10	15
<i>Bacillus brevis</i> 62M	+++	+++	+	+	+
<i>Bacillus brevis</i> 63M	+++	+++	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> 64M	+++	+++	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> 65M	+++	+++	+	+	+
<i>Bacillus brevis</i> 67M	+++	+++	+	+	+
<i>Mycobacterium sp.</i> 222AT	+++	+++	++	++	+
<i>Bacillus subtilis</i> 26AT	+++	+++	+++	++	+
<i>Rhodococcus ruber</i> 114KC	+++	+++	+++	++	+

штаммдар	Ас тұзының концентрациясы, %				
	2	5	7	10	15
<i>Mycobacterium sp. 229 C3</i>	+++	+++	+++	+++	+
<i>Rhodococcus sp. 115K</i>	+++	+++	++	++	+
<i>Rhodococcus sp. 1 C3</i>	+++	+++	+++	+++	+
<i>Micrococcus paraffinae 135A</i>	+++	+++	++	++	+
<i>Trichosporon terrestre 7CKP</i>	+++	+++	++	++	+
<i>Trichosporon capitatum MCM 57</i>	+++	+++	++	++	+
<i>Trichosporon terrestre CM7</i>	+++	+++	+++	+++	+
<i>Trichosporon capitatum 7CA</i>	+++	+++	++	++	+
Ескерту: «+++» - жақсы өсу, «++» - орташа өсу, «+» - нашар өсу, «-» өсу жоқ					

Ас тұзының 7 % ден 10 % дейінгі концентрациялы ортада тек қана 4 штамм (*Mycobacterium sp. 229 C3*, *Rhodococcus sp. 1 C3*, *Bacillus subtilis* 26AT және *Trichosporon terrestre CM7*) жақсы өсуді көрсетті. *Bacillus brevis* 62M, *Bacillus brevis* 63M, *Bacillus subtilis* 64M, *Bacillus subtilis* 65M және *Bacillus brevis* 67M штаммдар құрамында 7% ас тұзы бар ортада нашар өсуді көрсетті 15 % ас тұзы бар ортада барлық зерттеу штаммдар нашар өсуді көрсетті.

Осылайша мұнайотықтырушы микроорганизмдердің 16 изолятын ас тұзының жоғары концентрациясында 7% және 10 % өсуін зерттеуде өсуге қабілеті бар микроорганизмдердің 11 штаммын сұрыпталып алдық. Келесі зерттеу жұмыстарына осы сұрыптап алған штаммдарды қолдандық.

Табиғи экожүйелерде микроорганизмдердің негізгі бөлігі ассоциация түрінде өмір сүреді. Осыған байланысты басты міндет мұнайотықтырғыш микроорганизмдердің дақылы композиция өзара арасында олардың биосәйкестігіне қарай тандалуы қажет. Осы мақсат үшін микроорганизмінің штаммдары мұнай және оның өнімдерінің биодеградациясы процессін реттеу үшін өте маңызды.

Осыған байланысты мұнайотықтырғыш микроорганизмдердің арасындағы биосәйкестіктің өзара әсерлері қарастырылды. Бұл жаңа композицияларды құрастыру кезінде микроорганизмдердің өзара ара қатынасын анықтау үшін белгілі қызығушылықты көрсетеді. Біршама авторлардың айтуы бойынша мұнайотықтырушы микроорганизмдердің өзара құрастырылған композициялармен сәйкес болса, яғни бұл биопрепараттарды құрастыруда мүмкіншіліктерді байыта түседі.

Әр түрлі композицияларды құрастыру үшін мұнайотықтырушы микроорганизмдердің 16 дақылының сәйкестігін зерттеді. Олардың ішінде 5

дақыл (*Mycobacterium thermoresistibile* 119-3ГМ и *Rhodococcus equi* 51КС, *Candida nitrativorans* В1, *Candida chilensis* В2 және *Trichosporon cutaneum* Р20СО2) алдындары зерттелген[45-48], қалған 11 штамм жаңа препараттар сериясын құрасытуға қажет дәл сондай қасиеттерге ие болды.

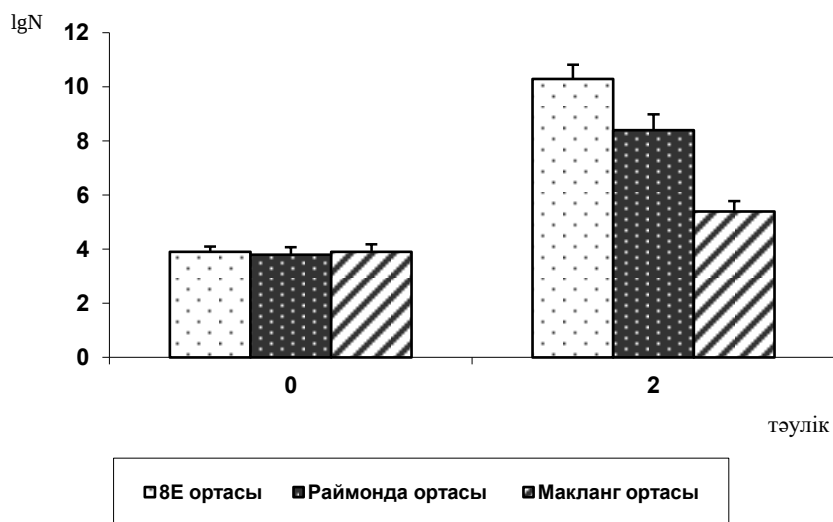
Биомассаны алуда технологиялық процесстерді интенсивті құрастырылудың алғышарттары субстарттың минимальді кезінде дақылдың өсу жылдамдығының максимальдылығын қамтамасыз ету болып табылады. Максимальді биомассаны алу үшін қоректік орта және көмірсутектотықтырушы микроорганизмдердің өсуіне көмірсу мөлшері сияқты факторлардың әсерін зерттедік.

Мұнайотықтырғыш микроорганизмдерден жаңа композицияларды құрастыру үшін бактериальді дақыл және ашытқы организмдері қолданылды. Тиміді ортаны таңдау үшін үш әр түрлі орта зерттелді: 8Е, Раймонд және Макланг [9, 10, 11]. Бактериальді штаммдар үшін тиімді температура 28⁰С және ашытқы дақылдарына – 30⁰С, ортаның рН 6,8, айналым 220 айн/мин. Бактериальді дақылдарды 2 тәулік бойы өсірдік, ал ашытқыларды 3 тәулік дақылдадық. Биомассаның жинақталуы ІgN клеткалардың өміршеңдігі бойынша анықтадық 2 тәулікте бакетриялар және 3 тәулікте – ашытқы дақылдары.

Бірінші композиция негізі 6 бактериальді дақылдан тұрды: *Mycobacterium thermoresistibile* 119-3ГМ, *Rhodococcus equi* 51КС, *Mycobacterium* 222А, *Mycobacterium* 229С3, *Rhodococcus* 1С3, *Rhodococcus* 115КК.

Бактериальді композициялардың жақсы өсуі 1% тік дизелтді жанармай қосылған 8Е минеральді ортада тереңдетіліп дақылдау кезінде бақыланды. Алынған нәтижелер бойынша минеральді орта 8Е де ІgN 6 бактериальді дақылдан тұратын тірі клетка саны бірінші тәулікпен салыстырғанда 2,6 есе жоғарылай түсті. Еселенудің жоғарлануы 3,8 есе құрады. Осы зерттеу жұмыстары Раймонд ортасында құрамында жалғыз энергия көзі ретінде 1% дизельдің жанармай қолдана отырып жүргізілді. 2 тәулікте өсудің жоғарлауы өміршең клеткалар 2,1 есе жоғарлай түсті. Бұдан басқа минеральді Рейдмонд ортасын 8Е ортасымен салыстыра отырып оның құрамы күрделі, қоректік элементтер қымбат болып табылатынын анықтадық. Қоректік орталарды сұрыптауда микроэлементтердің минимальді шығынын ескеру қажет, яғни қоректік ортаның компоненттері қымбат емес және қолжетімді болуы керек.

Мұнайотықтырушы бактериялардың композициясының клетка есебінің төменгі көрсеткіштері Макланг ортасында бекітілген, еселенудің жоғарлануы 0,8 есені құрайды. Келесі зерттеулерде Макланг ортасын қолданбадық (сурет3).



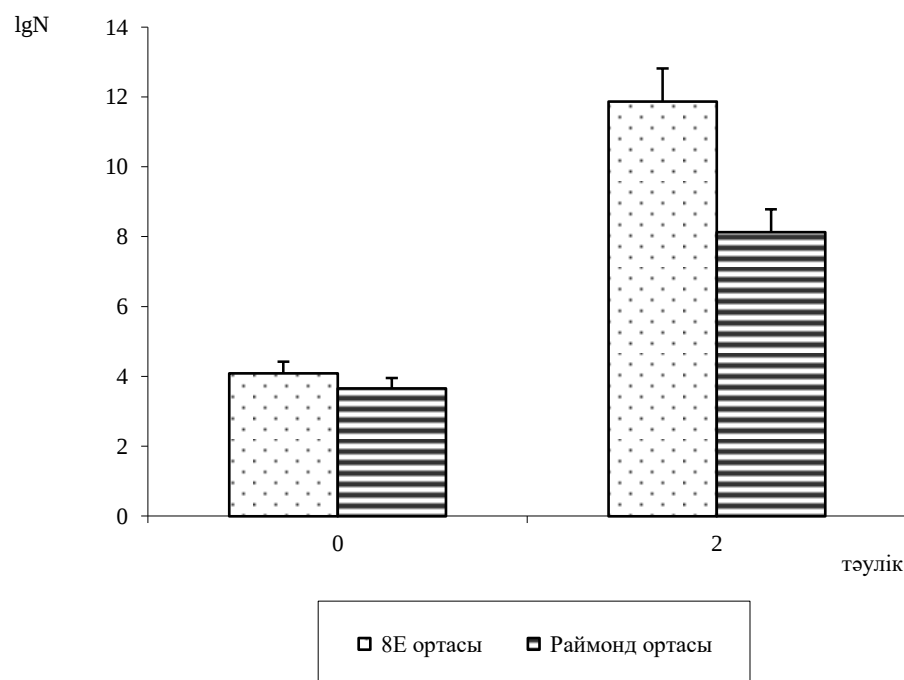
3 Сурет – Бактериальді дақылдан тұратын композицияның өміршең клеткаларының есебі

Осылайша жасалған зерттеу жұмысының нәтежиесі бойынша композициялар үшін 6 бактериальді штамм-деструкторларға сәйкес биомассаның тиімді мөлшерін алу үшін қоректік орта 8Е болып табылады.

Алдағы зерттеу жұмыстары үшін көмірсу көзі ретінде қоректік орта 8Е және дизельді жанармай 10 мл және 30 мл мөлшерде 1 л Рейдмонд ортасына енгіздік. Осы субстратты таңдау клеткада молекулалардың тасымалдануы және оның қышқылдануын жеңілдететін, басқа көмірсутегі компоненттерімен салыстырғанда еруі максималды жүретін, мұнай фракциялары жеңілдігіне байланысты. Көмірсутекті субстраттың мөлшері композиция әр түрлі мұнайотықтырушы бактериялардың түрінің санына байланысты болады. Композициялардың құрамында 10 мл/л дизельді жанармай бар 8Е ортасында биомассаның шығуы 2,89 есе болды.

Ал 8Е ортасына 30 мл/л дизельді жанармайды қосу барысында lgN өміршең клеткалардың саны бастапқы тәулікпен салыстырғанда 3,3 есеге көбейді.

Құрамында дизельді жанармай 10 мл/л бар Раймонд ортасында биомассаның өсуі 1,85 есе болды. Бірмассаның төмен өсуі 2,2 есе Раймонд ортасында және құрамында 30 мл/л дизельді жанармай бар 8Е ортасының салыстырылуы белгіленген (сурет 4).



4 Сурет – Бактериальді дақылдан тұратын композициялардың өміршенді клеткаларының (lgN) саны

Осылайша оптимальді көмірсутекпен 30 мл/л дизельді жанармай бар 8Е ортасында мұнай тотықтырушы бактериялар композициясының клеткалық биомассасының максимальді шығуын бақылап отырдық.

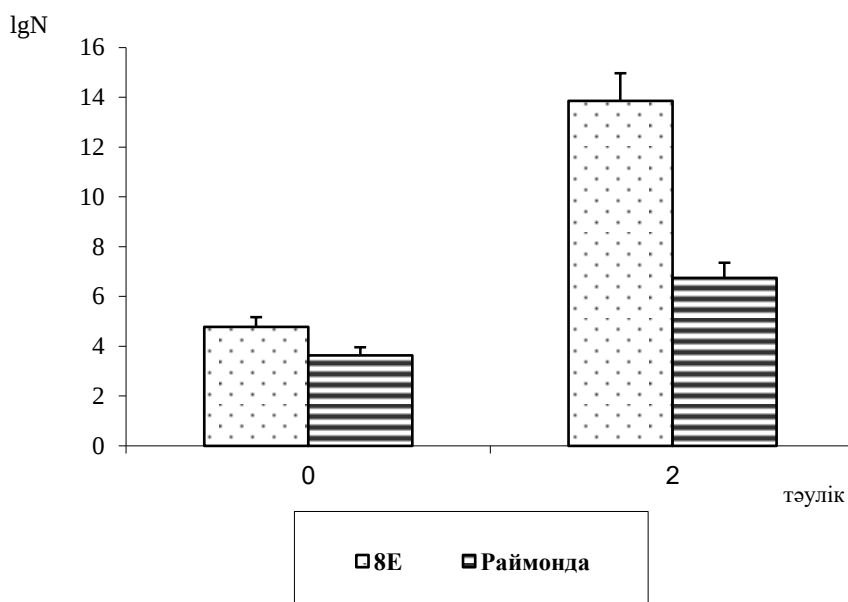
Штамм деструкторлардың қоректік қажеттіліктері туралы мәліметер жоғары мұнай тотықтырушы микроорганизмдердің жаңа композицияларынан биомассаны алу процессін бақылауды жүзеге асырады және биоремедация процессін *in situ* басқарады. Айта кететін жағдай биогенді қоспаларда микроорганизмдердің қажеттілігі қоректік орта және дақылдау жағдайына (рН, температура және т.б.) байланысты өзгеріп отыруы мүмкін. 8Е минералды ортасында азот және фосфор көзінің түрленуімен композицияның өсуі бойынша зерттеу жұмыстары жүргізіліді.

Бұл үшін композицияларды 8Е ортасында келесі құрам бойынша өсірді: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 1 г/л, KH_2PO_4 – 1 г/л, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8 г/л, NaCl – 0,5 г/л, жалғыз көмірсу және энергия көзі ретінде дизельді жанармайды 3% мөлшерде қостық. Ал ортаның екінші құрамы өзгерген және келесі компоненттерден тұрды $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 1,5 г/л, KH_2PO_4 – 1,4 г/л, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8 г/л, NaCl – 0,5 г/л. 8Е ортасына 1 г/л фосфорлы аммоний $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ және фосфорлы қышқылды калий K_2HPO_4 қосу барысында биомассаның өсуі шамамен 2,49 есе болды. Биогенді элементтерден тұратын қоректік орта 8Е : азот $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 1,5 г/л және фосфор KH_2PO_4 – 1,4 г/л, мұнай тотықтыратын бактериялардың биомассасының жинақталуына қолайлы болып табылды. lgN өміршенді клеткалардың саны 2,9 есеге жоғарлай түсті.

Алынған нәтижелердің негізінде қоректік орта 8Е алынды және 6 бактериальді штаммнан (*Mycobacterium thermoresistibile* 119-3ГМ,

Rhodococcus equi 51KC, *Mycobacterium* 222A, *Mycobacterium* 229C3, *Rhodococcus* 1C3, *Rhodococcus* 115KK) тұратын композицияларды дақылдау үшін азот және фосфордың мөлшері анықталды. Осы жоспарда қоректік ортада биогенді элементтердің жоғарлауы (азот және фосфор) КТМ биомассасы жинақталуы үшін қажет және практикалық мағынаға ие. Бактериальді дақылдардың композицияларының клеткалық биомассасының жоғарғы көрсеткіште шығуын алу үшін құрамына қосылған фосфорлы қышқыл амоний $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1,5 г/л және фосфорлы калий K_2HPO_4 - 1,4 г/л құрады. Қазіргі кезде құрамында әр түрлі микроорганизмдерден тұратын биопрепараттарды қолдана отырып ластанған топырақ және суды тазалауды жылдамдату процессі жайлы көптеген мәліметтер бар. Осыған байланысты бізбен бірінші композиция құрамына қосымша екі ашытқы дақылдары енгізілді (*Candida chilensis* B2 және *Trichosporon cutaneum* P20CO2). Мұнаймен ластанған топырақ және су қоймаларын тазалау мәселесін шешуде көптеген микроорганизмдер биомасса синтезіне жоғары жылдамдыққа ие және осыған байланысты қызығушылық ашытқыларға түседі. Оларға тез өсу, биомассаның тез жинақталу қасиеттері тән және олардың клеткаларының көлемі жеткілікті үлкен, өнеркәсіптік масштабтарда қолдануға өте ыңғайлы болып табылады.

Екінші композиция үшін тиімді қоректік ортаны таңдау үшін 8Е және Раймонд орталарын қолдандық. Мұнайотықтырғыш микроорганизмдердің клеткаларының жоғары санын 8Е ортасында бақыладық. Өміршен клеткалардың lgN санының еселеніп жоғарлауы 2,9 есеңі құрады. Ашытқы және бактериальді дақылдан тұратын композицияларды дақылдау кезінде Раймонд ортасында өміршенді клеткалар саны (lgN саны) барлық дақылда 1,85 есеге ғана жоғарлап отырды (сурет 5).



5 Сурет – Бактериальді және ашытқы дақылдарының композицияларының өміршенді клеткаларының саны

Осылайша мұнайтотықтырғыш микроорганизмдердің зертханалық жағдайда дақылдауда мұнайтотықтырғыш микроорганизмдерінен биомассаны алуда негізгі параметрлері сұрыпталды.

Үшінші композиция құрамына «көпкомпонентті» әр түрлі микроорганизмдердің 12 штаммын қостық: 119-3ГМ, 222АТ, 229СЗ – *Mycobacterium*; 1СЗ, 115КК, 51КС – *Rhodococcus*; 26АТ, 114КС – *Bacillus*; 102АС – *Pseudomonas*; В2 – *Candida*; P20CO2 және СМ7- *Trichosporon*.

Зерттеу жұмыстары бойынша КТМ 12 дақылдыортасында құрамында жалғыз энергия көзі ретінде 1% дизельді жанармай бар 8Е ортада клеткалардың максимальді мөлшері 2 ші күнінде бақыланды және өміршенді клеткалардың еслену мөлшері 1,7 есе құрады. Осылайша құрамында 3% ксенобиотик бар 8Е минералды ортасы дақылдың өсуі ІgN өміршенді клеткалардың саны бірінші алныған мәліметтермен салыстырғанда 2,48 есеге өсті.

8Е минералды ортасының құрамына азот және фосфор мөлшерін сұрыптау тәжірибие жұмыстарында олардың мөлшері өзертілді. Орта құрамында $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ және калия K_2HPO_4 1 г/л мөлшерде болуы микроорганизмдер популяциясының биомассасының өсуін ынталандырып отырды. Олардың әсерінен көп компонентті композицияларда өміршенді клеткалардың саны 3,16 есе болды. Бұл токсикалық қосылыстардың пайда болуы және ортада нитарттардың жинақталуының пайда болуымен байланысты болуы мүмкін.

Осылайша 12 дақылдан тұратын көп компонентті композицияларды өсіру үшін оптимальді жағдайды таңдау бойынша тәжірибиелер нәтежиесінде биогенді элементтердің (N және P) қатынасы анықталды, және клеткалық биомассасын максимальді шығуына ынталандыру әсерін тигізеді.

Алынған нәтижелер бойынша азотты фосфатты қоректік компоненттері орта құрамында жеткілікті түрде болып КТМ толықтай қолдана отырып тазалау процессін мақсатты түрде оңтайландыруға болады.

Келесі зерттеу жұмыстар мұнай көмірсутектерімен күрделі ластанған топырақтарды тазалау үшін биопрепараттардың тәжірибиелік үлгілерін құрастыруға бағытталған.

ҚОРЫТЫНДЫ

Барлық жүргізілген зертеу жұмыстарын түйіндей келе мынадай қорытынды жасадық:

- Зертхана коллекциясынан алынған (*Mycobacterium* sp. 229C3, *Rhodococcus* sp. 1C3, *Pseudomonas* sp. 102 AC және *Bacillus* sp. 19KC, *Candida* sp. 42 PP и *Trichosporon* sp. 7PB), штаммдар көмірсутек биодеградация белгілері көрсетілді және бұл штаммдар селективті ортада тұрақтылығымен сипатталды. Құлсары кен орнының мұнаймен ластанған топрақтарынан бөлініп алынған жаңа штаммдардың морфологиялық және физиолого биохимиялық белгілерінің жиынтығы бойынша келесі түрлерге: 62M, 63M және 67M *Bacillus brevis*, 63M, 65M и 26AT - *Bacillus subtilis*, 114 KC - *Rhodococcus ruber*, а 222AT - *Mycobacterium* жатантындығы анықталды. Олар мазутты дақылдаудың 10-шы тәулігінде $31,9 \pm 2,5$ % ден $35,7 \pm 1,1$ % дейін, $30,1 \pm 1,4$ % ден $50,4 \pm 1,1$ % мұнай дейін жойды.

- Мұнайототықтырушы микроорганизмдер: *Mycobacterium thermoresistibile* 119-3ГМ, *Rhodococcus equi* 51KC, *Mycobacterium* sp. 229C3, *Rhodococcus* sp. 1C3, *Mycobacterium* sp. 222AT, *Mycobacterium* sp. 229C3, *Rhodococcus ruber* 114 KC, *Bacillus subtilis* 26AT, *Pseudomonas cepacia* 122AC, *Pseudomonas* sp. 102 AC, *Candida chilensis* B2 және *Trichosporon cutaneum* P20CO2. тұратын үш композицияның жоғары шығуын қамтамасыз ететін 30 мл/л дизельді жанармайы бар минеральді қоректік орта 8Е таңдалды. 8Е қоректік ортасында фосфорлы қышқылды амоний $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ және фосфорлы қышқыл калий K_2HPO_4 1 г/л мөлшерде композициялардың клеткалық биомассасының шығуын жоғарлатады.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИТЕТЕР ТІЗІМІ

- 1 Jendonukleaza restrikcii Asi256I, uznajushhaja i rasshhepljajushhaja posledovatel'nost' nukleotidov 5-GATC-3 // Prikladnaja biohimija i mikrobiologija, 2008, tom 44, №1, s. 34-37.
- 2 Chernuhin V.A., Golikova L.N., Gonchar D.A., Abdurashitov M.A., Kashirina Ju. G., Netesova N.A., Degtjarev S. H. DNK-metiltransferazy M.BstF5I-2 i M.BstF5I-4 sistemy restrikcii-modifikacii Bst5I iz Bacillus stearothermophilus F 5 // Biohimija, 2003, tom 68, vyp. 9, s. 1183-1192.
- 3 Junusova A.K., Rogulin E.A., Artjuh R. I., Zheleznaja L.A., Matvienko N.I. Belok, kodiruemyj otkrytoj ramkoj schityvanija, raspolozhennoj rjadom
- 4 sgenomnikazy BspD6I, v komplekse s nikazoj obrazuetjendouklease restrikcii
- 5 Janulajtis A. A. Fermenty restrikcii i ih primenenie // Itoginauki i tehniki. Biotehnologija. T.17. Mju 1989. 202 S.
- 6 Bertani G. Studies on lysogenesis. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. 1951. J. Bacteriol. 62. 293-300.
- 7 Dryden, D.T.F. Cheng X., Blumenthal R.M. Eds In S-adenosylmethioine-dependent methyltransferases: structures and function. // Wold
- 8 Vinas M., Grifoll M., Sabate J., Solanas A.M. Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities // J. Industrial Microbiol. and Biotechnol. 2002. Vol. 28. P. 252–260.
- 9 Leahy J. G., Colwell R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment // Microbiol. Rev. 1990. Vol. 54. P. 305–315.
- 10 Churchill S. A., Harper J. P., Churchill P. F. Isolation and characterization of a Mycobacterium species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons // Appl. Environ. Microbiol. 1999. Vol. 65. P. 549–552.
- 11 Allard A.-S., Neilson A. H. Bioremediation of organic waste sites: A critical review of microbiological aspects // Intern. Biodeteriorat. and Biodegradation. 1997. Vol. 39, № 4. P. 253–285.
- 12 Sabate J., Grifoll M., Vinas M., Solanas A. M. Isolation and characterization of a 2-methylphenantrene utilizing bacterium: identification of ring cleavage metabolites // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. Vol. 52. P. 704–712.
- 13 Casellas M., Grifoll M., Sabate J., Solanas A.M. Isolation and characterization of a 9-fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorine by a consortium // Can. J. Microbiol. 1998. Vol. 44. P. 734–742.
- 14 Scentific, Singapore 1999 // pp. 283-340.
- 15 Ягафарова Г. Г., Скворцова И. Н. Новый нефтеокис-ляющий штамм бактерий Rhodococcus erythropolis // Прикл. биохим. и микробиол. 1996. Т. 32, № 2. С. 224–227.
- 16 Алехин В. Г., Фахрутдинов А. И., Малышкина Л. А., Ситников А. В., Емцев В. Т., Хотянович А. В. Сравни-Е. В. Плешакова. Интродукция

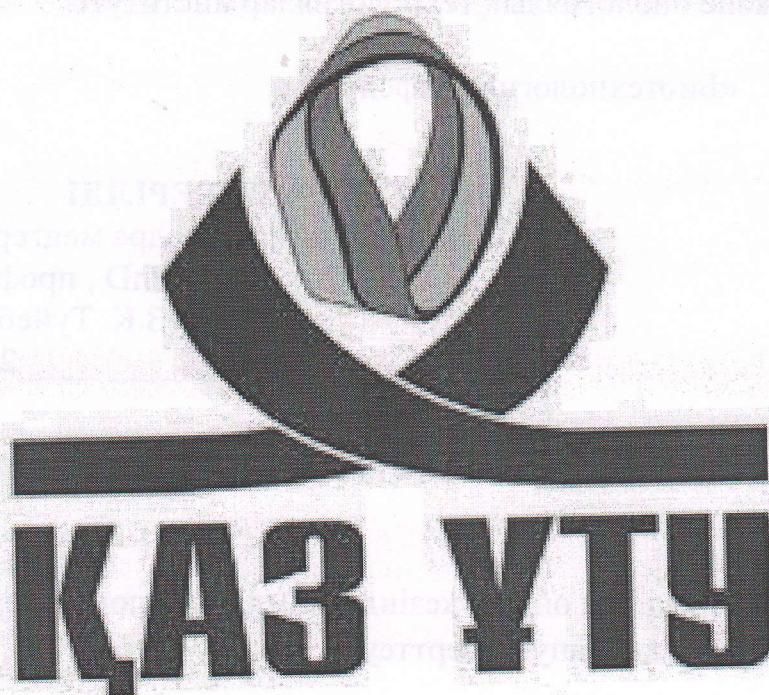
нефтеокисляющих микроорганизмов в загрязнённую почву Известия Саратовского университета. 2011. Т. 11. Сер. Химия. Биология. Экология, вып. 2 Научный отдел 110 ельная эффективность деструкции нефтепродуктов различными биопрепаратами при разных уровнях загрязнения торфогрунтов // Биологические ресурсы и природопользование: сб. науч. тр. Нижневартовск, 1999. Вып. 3. С. 96–106.

17 Щерблюкин И. Н., Бирюков В. В., Стехновская Л. Д., Бар-бот В. С., Биттеева М. Б., Боев Ю. В., Лобов Ю. А., Раз-живин А. В. Технология олеоворин – биологический способ обезвреживания нефтезагрязнённых осадков поверхностных сточных вод // Новые технологии для очистки нефтезагрязнённых вод, почв, переработки и утилизации нефтешламов : тез. докл. Междунар. конф. М., 2001. С. 166–167.

18 Сидоров Д. Г., Борзенков И. А., Ибатуллин Р. Р., Милехина Е. И., Храмов И. Т., Беляев С. С., Иванов М. В. Полевой эксперимент по очистке почвы от нефтяного загрязнения с использованием углеводородоокисляющих микроорганизмов // Прикл. биохим. и микробиол. 1997. Т. 33, № 5. С. 497–502.

19 Ильина А., Кастилю Санчес М. И., Винареаль Санчес Х. А., Рамирес Эскивель Г., Кандэлас Рамирес Х. Получение препарата на основе бактерий, выделенных из почвы, для биоремедиации нефтяных загрязнений // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2003. Т. 44, № 1. С. 88–91.

Краткий отчет



Университет:	Satbayev University
Название:	Мұнай ыдыратушы тиімділігі мол Mycobacterium және Rhodococcus туыстарының бактерияларының өсіру жағдайлары мен режимдерін таңдау
Автор:	Сатан Анар Нұржауғанқызы
Координатор:	Гульнара Курбанова
Дата отчета:	2019-04-22 10:12:29
Коэффициент подоби́я № 1: ?	18,3%
Коэффициент подоби́я № 2: ?	11,2%
Длина фразы для коэффициента подоби́я № 2: ?	25
Количество слов:	14 098
Число знаков:	114 983
Адреса пропущенные при проверке:	
Количество завершнных проверок: ?	9



К вашему сведению, некоторые слова в этом документе содержат буквы из других алфавитов. Возможно - это попытка скрыть позаимствованный текст. Документ был проверен путем замещения этих букв латинским эквивалентом. Пожалуйста, уделите особое внимание этим частям отчета. Они выделены