

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И.Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Биотехнология» кафедрасы

Мамбетова Сымбат Калмуханбетовна

Мұнаймен ластанған топырақты биотехнологиялық жолмен тазарту

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

5B070100 – «Биотехнология»

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

БТ кафедра меңгерушісі

PhD профессор

З.К.Түйебахова

«06» _____ 2019 ж.

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

Тақырыбы: «Мұнаймен ластанған топырақты биотехнологиялық жолмен тазарту»

5B070100 – «Биотехнология»

Орындаған

Мамбетова С.К.

Ғылыми жетекші

биол.ғыл.д-ры, профессор

Анапияев Б.Б.

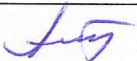

«06» _____ 05 _____ 2019 ж.

Алматы 2019


Дипломдық жұмысты дайындау
КЕСТЕСІ

Бөлімдер атауы, қарастырылатын мәселелер тізімі	Ғылыми жетекші мен кеңесшілерге көрсету мерзімдері	Ескерту
Әдебиетке шолу	Қаңтар	
Материалдар мен әдістер	Ақпан	
Зерттеу нәтижелері	Наурыз	

Дипломдық жұмыс бөлімдерінің кеңесшілері мен норма бақылаушының аяқталған жұмысқа қойған қолтаңбалары

Бөлімдер атауы	Кеңесшілер, аты, әкесінің аты, тегі (ғылыми дәрежесі, атағы)	Қол қойылған күні	Қолы
Әдеби шолу	Б.Б. Анапияев биол.ғыл.д-ры, профессор	06.05.2019	
Зерттеу объектісі және әдісі			
Зерттеу нәтижелері			
Норма бақылаушы	А.Ж. Абильдаева ғылым магистрі	06.05.2019ж.	

Ғылыми жетекші  Анапияев Б.Б.

Тапсырманы орындауға алған білім алушы  Мамбетова С.К.

Күні « 06 » 05 2019 ж.

АҢДАТПА

Қазақстанда ең өзекті мәселеле – топырақ бетінің және де сулардың мұнай қалдықтарымен ластануы болып табылады. Яғни, топырақ құрамын мұнай қалдықтарынан биотехнологиялық жолмен тазарту әдістері қарастырылды. Мұнай өндіруді жеделдетудің кері әсері – қоршаған ортаны мұнай және мұнайдың өнімдерінің ластануы. Ауыл шаруашылықтағы мұнаймен едәуір дәрежеде ластанған егіншілік алқаптары жарамсыз болып қалуда. Сонымен қатар табиғи ландшафтардың, агрожүйелердің компоненттері, экологиялық тепе-теңдігі бұзылады. Өңделмеген мұнаймен ластанғаннан кейін экожүйелердің қайта қалпына келуі және табиғи тазалану үрдісінің мерзімі өте баяу жүреді және бірнеше жылдарға созылуы мүмкін. Мұнаймен ластанған топырақты ауторемедиациялау деңгейі 5 г/кг топырақ 30 жылға созылады. Солтүстік аймақтарда мұнайдың деструкциялану мерзімі 50 жыл және одан көп жылдарға созылады. Осыған орай топырақты мұнайдың ластануынан тазалаудағы маңызды биотехнологиялық міндеттеріне қоршаған ортаны қорғау да кіреді.

АННОТАЦИЯ

Наиболее актуальной проблемой в Казахстане является загрязнение почвенной поверхности и вод нефтяными отходами. То есть были рассмотрены методы биотехнологической очистки почвенного состава от нефтяных отходов. Еще одним отрицательным эффектом ускорения добычи нефти является загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами. Посевные площади, в значительной степени загрязненные нефтью в сельском хозяйстве, остаются непригодными. Также нарушаются компоненты природных ландшафтов, агросистем, экологическое равновесие. После загрязнения сырой нефтью срок восстановления экосистем и процесса естественной очистки происходит очень медленно и может длиться несколько лет. Уровень ауторемедиации нефтезагрязненных почв 5 г/кг почвы длится 30 лет. В северных регионах срок деструкции нефти составляет 50 лет и более. В связи с этим в важнейшие биотехнологические задачи очистки почв от нефтяного загрязнения входит и охрана окружающей среды.

ANNOTATION

The most urgent problem in Kazakhstan is the pollution of the soil surface and water with oil waste. That is, the methods of biotechnological purification of soil composition from oil waste were considered. Another negative effect of accelerating oil production is the pollution of the environment with oil and petroleum products. Acreage heavily contaminated with oil in agriculture remains unusable. Components of natural landscapes, agricultural systems, ecological balance are also disturbed. After crude oil pollution, the recovery of ecosystems and the natural purification process is very slow and can take several years. The level of autoremediation of oil-contaminated soils 5g/kg of soil lasts 30 years. In the Northern regions, the period of oil destruction is 50 years or more. In this regard, the most important biotechnological tasks of soil purification from oil pollution include environmental protection.

МАЗМҰНЫ

Кіріспе	9
1 Әдеби шолу	10
1.1 Мұнай тасымалдаушы және өндіруші аймақтардың экологиялық жағдайы	10
1.2 Мұнаймен ластанған экожүйелерді тазалауда қолданылатын биопрепараттар	13
1.3 Мұнаймен ластанған топырақты микроағзалар көмегімен тазарту жолдары	14
2 Зерттеу материалдары мен әдістері	16
2.1 Зерттеу объектілері және зерттеу әдістері	16
2.2 Мұнаймен ластанған топырақтан мұнай тотықтырғыш микроағзаларды бөліп алу	16
2.3 Мұнай тотықтырғыш микроағзалардың арасынан белсенділерін іріктеп алу және оларды идентификациялау	18
2.4 Минералды қоректік ортада NaCl әр түрлі концентрациясында белсенді мұнай тотықтырғыш культураларды өсіру	20
3 Зерттеу нәтижелері	21
3.1 Мұнай тотықтырғыш микроағзаларды бөліп алу және сұрыптау нәтижелері	21
3.2 Белсенді мұнай тотықтырғыш микроағзаларды идентификациялаудың нәтижелері	24
3.3 Концентрациясы әртүрлі минералды қоректік ортада өсетін белсенді мұнай тотықтырғыш микроағзалардың өсу нәтижелері	27
3.4 Мұнай өнімдерінде өсетін белсенді мұнай тотықтырғыш микроағзалардың көрсеткен нәтижелері (бензин, керосин, дизельді жанармай)	28
Қорытынды	31
Қолданылған әдебиеттер	32

КІРІСПЕ

Топырақтың мұнай және мұнай өнімдерімен ластануы қазіргі кезде Қазақстан үшін ең өзекті мәселе болып отыр. Мұнай шикізаттарын барлауда, өндіруде, дайындауда, өндеуде және тасымалдауда қоршаған ортаның мұнаймен ластануын экономикалық және экологиялық шығындарға алып келеді. Сондай-ақ, ең бастысы табиғат пен адамзаттың денсаулығына қауіп туғызып отыр [1,2]. Мұнай басқа ластағыштар сияқты емес, және оның таралу кеңдігі (ендігі) бойынша, ластаушылардың саны жағынан және бір мезгілде түскен ластаушы шамасы қоршаған ортаның барлық компоненттерінің салмағымен салыстыруға болмайды [3].

XX ғасырдың екінші жартысында мұнайды өндіру кеңінен дамытуы сипатталады. Мұнай өндіруді жеделдетудің тағы бір кері әсері – қоршаған ортаны мұнай және мұнайдың өнімдерінің ластауы. Ауыл шаруашылықтағы мұнаймен едәуір дәрежеде ластанған егіншілік алқаптары жарамсыз болып қалуда. Сонымен қатар табиғи ландшафтардың, агрожүйелердің компоненттері, экологиялық тепе-теңдігі бұзылады. Өңделмеген мұнаймен ластанғаннан кейін экожүйелердің қайта қалпына келуі және табиғи тазалану үрдісінің мерзімі өте баяу жүреді және бірнеше жылдарға созылуы мүмкін. Мұнаймен ластанған топырақты ауторемедиациялау деңгейі 5г/кг топырақ 30 жылға созылады. Солтүстік аймақтарда мұнайдың деструкциялану мерзімі 50 жыл және одан көп жылдарға созылады. Осыған орай топырақты мұнайдың ластануынан тазалаудағы маңызды биотехнологиялық міндеттеріне қоршаған ортаны қорғау да кіреді.

Жұмыстың мақсаты мен міндеті:

- 1 Мұнаймен ластанған топырақты биотехнологиялық жолдармен тазарту.
- 2 Мұнай тотықтырғыш микроағзаларды мұнаймен ластанған топырақтан микробиологиялық жолмен бөліп алу және оларды іріктеу.
- 3 Микроағзалардың белсенділігін анықтап, идентификациялау.

1 Әдеби шолу

1.1 Мұнай өндіруші және тасымалдаушы аймақтардағы экологиялық жағдай

Қазіргі замандағы экологиялық мәселелер антропогенді әсерлер мен табиғи ресурстарды тиімсіз пайдаланудың салдарынан пайда болғанын көрсетеді. Мұндай ластануды топырақ қабаттарынан байқауға болады. Осының салдарынан экологиялық жағдайлардың тұрақсыздануы Республикамыздағы табиғи зоналардың барлық жерлерін бұзылуына әкеліп соқты. Қазақстан территориясы негізінен қуаң жерлерден (құрғақшылық) тұрады, оның негізгі бөлігін бетпақ далалар, жартылай шөл дала және қатты континенталді шөл дала, таулы климатты жерлерді құрайды. Бүкіл Қазақстан территориясы бойынша түсетін жауын-шашынның орташа жылдық көлемі 207 мм/жыл. Мұндай жағдайларда топырақтың құнарлығы төмен болады [4, 5].

Негізгі мұнай өндіруші аймақ Қазақстанның Батыс өңірі болып есептеледі. Бұл аймақ ерекше жартылай шөл және шөл далаларға жатады және бұл батыс аудандарда климаттық, географиялық, топтарына байланысты, ерекше өсімдіктердің бірлестігінің түрлілігімен ерекшеленеді. Аталған аймақ шөлейттілігі мен құрғақшылығымен ерекшеленеді. Шөл аймақтарда белгілі биопрепараттарды қолдануға бірқатар қиындықтар туғызады және микробтық препараттарды пайдалануда арнайы жағдайларды енгізудің өңделуін талап етеді. Атырау облысының экожүйесі өте әлсіз және қайта қалпына келу қасиеті өте төмен. Тіпті аз мөлшерде мұнаймен ластанған топырақ болса да, онда микроағзалардың санының төмендегендігін көрсетеді. Бұл микроағзалар топырақтың тазалануына ықпал етеді [1].

Еліміздің Батыс аймақтары бүкіл Қазақстан бойынша экологиялық апаттық аймақ болып есептеледі. Өйткені бұл аймақтардағы экологиялық жағдайлар антропогендік факторлар мен табиғи әсерлердің салдарынан түзіледі. Мұның ішінде ең маңыздысы болып отырған Каспий теңізінің деңгейінің көтерілуі және мұнай-газ кешендерінің қарқынды дамуы болып табылады. Батыс Қазақстанда мұнай-газ кен орындары Прорва, Өзен, Жетібай, Қаламқас, Қаражанбас, Бұзачи, Кенбай, Королевское, Тенгиз, Каратон, Тажифәлі, Тереңөзек, Мартыши, Камышовые, Қарачағанак, Жанажол, Кенкияк, Алибекмолада (құрлықта) ашылған және пайдалануда (1-сурет). Көптеген кен орындары 40 жыл бойы пайдаланылып келеді. Каспий теңізіндегі Қашаған кен орыны өңделіп жатыр [2].



1 Сурет – Қазақстандағы мұнай және газ кен орындарының орналасқан жерлері

Мұнай – алкандардың (парафинді және ациклді қаныққан көмірсутектер) күрделі қосындысы, циклоалкандар (нафтендер) және арендер (ароматты көмірсутектер), молекулалық массасы әртүрлі сонымен бірге, оттекті, күкіртті және азотты туындылардың көмірсутектері болып табылады.

Мұнайдың негізгі компоненттері-көмірсутектер (98 % дейін) – 4 бөліктен тұрады.

1 Парафиндер (алкандар) (90% мұнайдың жалпы құрамынан тұрады)-тұрақты қаныққан қосындылар C_nH_{2n+2} , молекулалары тіке немесе тармақталған (изоалкандар) көмірсутектердің атомдарының қатарынан тұрады.

2 Циклопарафиндер (нафтендер) қаныққан циклді C_nH_{2n} қосындылары 5-6 атомды көміртек сақинасынан тұрады (жалпы мұнайдың 30-60% құрайды). Көміртек молекуласындағы екі атомы $CH_2-C_2H_5$ алькилді топтармен байланысуы мүмкін. Мұнайда циклопентан мен циклогексаннан басқа бициклді және полициклді нафтендер кездеседі. Бұл қосындылар өте тұрақты және биологиялық ыдырауға оңайлықпен берілмейді.

3 Ароматты көмірсулар (жалпы мұнайдың 20-60% құрайды) бірқатар бензолдың қанықпаған циклді қосындылары, бензолдың сақинасында көміртектің 6 атомы кемірек, нафтендерге қарағанда. Сондай-ақ, бұл қосындыларда көміртектің атомын алкильді топтардың орнын басуы мүмкін. Мұнайда ұшқыш қосындыларда болады. Олар бір ғана ароматты (бензол, толуол, ксилол) тұрады, ал содан кейін бициклді (екі сақиналы) (нафтолин),

трициклді (үш сақиналы) (антрацен, фенонтрен) және полициклді (мысалы: пирен 4 сақиналы) көмірсулар.

4 Олефиндер (алкендер) (мұнайдың 10% құрайды) – қанықпаған циклді емес қосындылар әрбір көміртектің молекуласындасутектің бір немесе екі атомдарымен байланысқан, тіке немесе тарамдалған тізбектен тұрады [3].

Қазіргі кезде табиғи ортада мұнайдың көмірсутектердің биологиялық ыдырауының жеделдететін екі негізгі жолы бар:

1 Табиғи мұнай тотықтырғыш микрофлораға өсуіне қолайлы жағдайлар жасау арқылы (азотфосфорлы тыңайтқыштарды енгізу, аэрациялау және т.б.)

2 Ластанған экожүйеге белсенді мұнай тотықтырғыш микроағзаларды енгізу арқылы [7].

Бұл әдісті қолданғанда алдын ала бұзушы (ыдыратушы) микроағзаларды іріктеп аламыз. Олар келесі талаптарға сай болуы тиіс:

- Мұнайдың көптеген компоненттерін ыдырату;
- Генетикалық тұрақты;
- Сақтау барысында тіршілікке бейімді;
- Сақтаудан кейін жылдам өсуі;
- Қоршаған ортада өсуі мен ферментативті белсенділігінің жоғарғы дәрежесі;
- Жергілікті микроағзалармен бәсекелестік қабілеті;
- Патогенді емес және уытты метоболиттерді шығармайтын микроағзалар болуы қажет.

Топырақтағы мұнайдың көмірсутектерін деструкциялайтын бірқатар микроағзалар. Оларға негізінен *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, микромициттер *Fusarium*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Penicillium* [2-6].

Ластанған топыраққа микроағзаларды енгізуде бірқатар қолайлы жағдайлар жасау қажет (t° , pH, rEh, N, P, Mg) [7, 8].

Мұнай мен мұнай өнімдерінен тазалау әдістерінде ыдыратушы микроағзаларды қолдану өте тиімді, бірақ оларды топырақтың құнарлығын қалпына келтіру үшін тереңдетілген лабораториялық зерттеулер жасау керек. Бұл зерттеулер экологиялық, физиологиялық-биохимиялық бағытта көптеген сұрақтарды шешуге тиісті [10].

Мұнаймен ластанған аумақтарды тазалау барысында, ең алдымен мұнай тотықтырушы микроорганизмдерге әсер ететін факторларды толықтай білу қажет. Олар: біріншіден температура, оттегі көлемі, рН, биогенді элементтер және т.б.

Көптеген тәжірибелер нәтижесінде, мұнай тотықтырушы микроорганизмдердің рН 6,0-7,5 аралығында белсенді өсетіндігі дәлелденген. Зерттелген культуралардың 50% атап айтқанда, *Pseudomonas liquefacins*, *Ps. liquida*, *Ps. nebulosum*, *Ps. Liquefacins maidis*, *Bacterium jophagum* және т.б..

Түрлі микроорганизмдердің 2000-дай культураларын зерттегенде, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium* туыстастарының өкілдері көміртегі

көзі ретінде қалыпты алкандары бар қоректік ортада өсетіндігі зерттелді [11].

Қазіргі таңда мұнай және мұнай өнімдерінің ластануы судың, топырақтың микрофлорасын құртуда. Мәселен, тәулігіне 200-500 мың баррель мұнай өндіретін Үлкен мұнай химиялық зауыт жылына 10 мың м³ қалдық шығарады. Қалдықтар құрамына биодеградацияға төзімді қосылыстар енуі мүмкін. Мысалы, полициклді ароматты көмірсутегілер, жеңіл ұшқыш ароматты қосылыстар, олардың метилденген туындылары, мұның барлығы да канцерогенді және уытты болып келеді. Бөлінген штамдар өз аумақтарының климаттық жағдайларына сай мұнай және мұнай өнімдерін жақсы ыдыратқан.

Қорытындылай келгенде түрлі көмірсутегілерді тотықтыру қабілеті жоғары микроорганизмдер ішінен *Pseudomonas* туыстастарының бактериялары әлдеқайда белсенділігімен ерекшеленеді. Бұл туыс микроорганизмдері табиғатта өте кең таралған. Олардың табиғаттағы көмірсутек қосылыстарын қабылдай алатындығы кез-келген экологиялық жағдайда өсе беретінін көрсетеді. Олар теңіздерде, су ағысында, тоғандарда, (*Ps. desmoliticum*), топырақтарда, мұнай кен орындарында (*Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens* және т.б.) кездеседі [12].

Шешуші маңызы бар көмірсутектердің метаболизміне дайындық процесінде ең басты қызмет атқаратын микроағзалар болып табылады. Олар жасушаның ішінде көмірсутектің тотығуын іске асырады. Сондықтан адамзаттың топырақтағы мұнай көмірсутегінің деградациясына кірісуі ең алдымен микроағзалардың қатысымен болуына жағдай жасау қажет [13,14].

1.2 Мұнай ластануларын тазалайтын технологияларды қолдану

Кейбір мұнай компаниялар, мұнаймен ластанған аудандарды тазалауда аттестациядан өтпеген тазалау технологиялары мен әдістерді пайдалануда. Бұл техникалық шешімдер экологиялық келеңсіз жағдайлардың салдарын жоймайды, керісінше оны кейде күшейтеді. Соңғы кезде төгілген мұнайды жою үшін жергілікті механикалық түрмен жию, кейде сорбенттерді пайдалана отырып қалған қалдықтарын жағып немесе топырақ пен құммен көміп тастайды. Осындай әдістерді баяғыдан бері жатқан қалдықтарды жою барысында қолдануда. Қоршаған ортада қалдықтарды жағу ең қауіпті әдістерге жатады. Мұнай толығымен жанып кетпеген соң тұрақты канцерогенді заттар түзіледі. Олар кейіннен таралып, өсімдіктердің және жануарлардың азық тізбегіне түскеннен соң, тұрғылықты жердегі халықтың арасында онкологиялық науқастардың санының өскендігін көрсетті. Сонымен қатар жағылған мұнай өнімдері «парниковый эффект» (булы әсерлердің) пайда болады, бұл эффект климаттың өзгеруіне әкеп соғады. Құм мен топырақпен көму арқылы мәселеден құтылатын әдіс емес екендігі көрсетіледі, өйткені ол қалдықтарды тек жасырып қана қояды. Шын мәнінде мұнайды көму және косервілеу топырақтың төменгі қабатына өтеді, бұл жағдай төменгі

температура мен оттегінің жетіспеуін көрсетеді. Өсімдік қабатының толығымен бұзылуы көрсетілген [15, 16-29].

Мұнаймен ластанған аумақтарды рекультивациялауда кері нәтижелерді алудың себептерінің бірі-кәсіпорында тиісті білімі бар экология, топырақтану, биолог-эколог мамандарының болмауы. Сонымен қатар топыраққа түскен мұнайдың табиғи ыдырау механизмінің кезеңдерінің әсерін елемей болып отыр.

Топырақты мұнай өнімдерінен тазалауда жалпы қабылданған экологиялық әдістерді қарастырсақ, оны екі топқа бөлеміз:

I) Биологиялық әдістер:

- 1) агротехникалық;
- 2) биоремедияциялық;
- 3) компостілеу;
- 4) биовентиляциялау.

II) Физико-химиялық әдістер:

- 1) мұнай өнімдерін қайта қалпына келтіреміз;
- 2) термодесорбция;
- 3) жандыру;
- 4) топырақты жуу;
- 5) терең горизонттарға құю;
- 6) литификация / қатаю

Кез келген әдіс өзінің ерекшеліктеріне ие. Сондай-ақ, биологиялық тазалау әдістері де, бірқатар ерекшеліктерімен сипатталады: ұзақ мерзімде тазалануы 1-дан 12 айға дейін ластануда 80 % дейін төмендейді; ыдыраудың соңғы өнімдері су мен CO₂ болады; басқа тазалау әдістеріне қарағанда шығыны аз; мұнайдың концентрациясы мен топырақтың сол кездегі күйі; тазалау барысында тұрақты түрде мониторинг пен лабораториялық зерттеулер жүргізу биодegradация процесінің жалғасып жатқанын дәлелдеп отыру [8, 9, 13].

1.3 Мұнаймен ластанған топырақты микроағзалар көмегімен тазарту жолдары

Қазақстан дүние жүзі бойынша мұнай державасы болып саналатын елдердің қатарында. Мұнай қоры бойынша дүние жүзінде 13-ші орынды иеленсе, ал мұнай шикізатын өндіру көлемі бойынша 18-ші орынды алады. Европа және Азия елдері ішінде Қазақстан Ресей, Ұлыбритания, Норвегиядан кейінгі төртінші орында тұр. Территориямыздың 1 млн 700 мың шаршы шақырымын мұнай және газ қоры алып жатыр. Қазіргі таңда 208-ден астам мұнай газ кен орындары ашылған. Басым көпшілігі Батыс Қазақстан облысы аумағында шоғырланған [30].

Мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған топырақтың өзіндік тазару және қайта қалпына келу процестері өте ұзақ, көптеген ғалымдардың айтуы бойынша шамамен 20-25 жыл уақыт аралылығында жүзеге асады екен.

Мұнай өнімдерін топырақтан тазартудың әлемдік тәжірибеде қолданылатын әдістері экстракция, физикалық адсорбция, пиролиз, өртеу және т.б. әдістер экономикалық және экологиялық жағынан тиімсіз болып келеді.

Сондықтан бұл проблемаға байланысты жүргізілген бірнеше зерттеулерге қарамастан, аймақтың табиғи жағдайларының ерекшеліктерін есепке ала отырып тазарту әдістерінің тиімді түрін қажет етеді. Қазіргі уақытта тазартудың тиімді тәсілінің бірі көмірсутектерді тотықтырушы микроағзалар көмегімен тазарту болып табылады.

2 Зерттеу материалдары мен әдістері

2.1 Зерттеу объектілері және зерттеу әдістері

Зерттеулерді жүргізу үшін мына заттар қолданылған:

- спиртовка, пинцет (іскек), лабораториялық стакандар көлемі 100-250мл, градуирленген пипеткалар 1-2мл 20292-74 МССТ, пробиркаларға арналған штатив, конусты немесе жайпақ түпті колбалар 100-500мл 25336 МССТ, диаметрі 56мм Петри чашкалары, бұйымдық (предметные) және жапқыш шынылары, микроскоп, фильтровалды қағаздар, кептіргіш шкаф, тоңазытқыш, бактерицидті лампа, фотоэлектроколориметр (ФЭК).

- Қоректік орталар: балық пептонды агар (РПА), балық пептонды сорпасы (РПБ), Ворошилова-Дианова (ВД), агар-агар, ет пептонды сорпасы (МПБ).

Стерильді дистилденген су, этиль спирті, желатин, крахмал, глюкоза, манноза 5 % H_2SO_4 ертіндісі, 0,2 % KNO_3 ертіндісі, қорғасынның сірке қышқылды ертіндісі, Грисс реактиві, Эрлих реактиві, 0,01 % триптофан ертіндісі, 1 %-ті тетраметил-р-фенилендиаминнің ертіндісі, ерігіш крахмал, H_2O_2 10 % ертіндісі 1, 2, 3 % $NaCl$ тұздары, 1,6 % бромкрезолпурпур, K_2HPO_4 , пептон, Цил фуксині, метилді көк.

Зерттеу объектісі болып:

1 Мұнаймен ластанған топырақ;

2 Мұнайтотықтырғыш микроағзалар.

2.2 Мұнаймен ластанған топырақтан мұнайтотықтырғыш микроағзаларды бөліп алу

Мұнаймен ластанған топырақтан мұнай тотықтырғыш микроағзаларды бөліп алу, жинақтаушы культураның әдісі арқылы, Ворошилова-Дианова минералды сұйық қоректік ортасында өсірілді. Ворошилова-Дианова қоректік ортасы мынадай заттардан тұрады: (г/л) NH_4NO_3 – 1,0, K_2HPO_4 – 1,0, KH_2PO_4 – 1,0, $MgSO_4$ – 0,2, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,02, $FeCl_3$ – іздері ғана [16].

Зерттеліп отырған Атырау облысының аймақтары тұздалған аймақтарда орналасуын ескере отырып, жасушаның лизисінен құтылу үшін $NaCl$ – ң 1% ертіндісін қосамыз. Жинақтаушы культура мынадай тәсілмен алынды: 1:1000 топырақтың суспензиясын (1г топыраққа 99мл стерильді сұйық орта құйылады) 250 мл колбаға құямыз, көміртек қоректік көзі ретінде стерильді шикі мұнай қосылады. Культураны тоңазытқышқа +4 °C қоямыз. Қоректік ортаны 1 атм.да стерильдейміз, ортаның рН 7,0-7,2, стерильді мұнайды стерильді қоректік ортаға 1 % (көлемі бойынша) енгізілді.

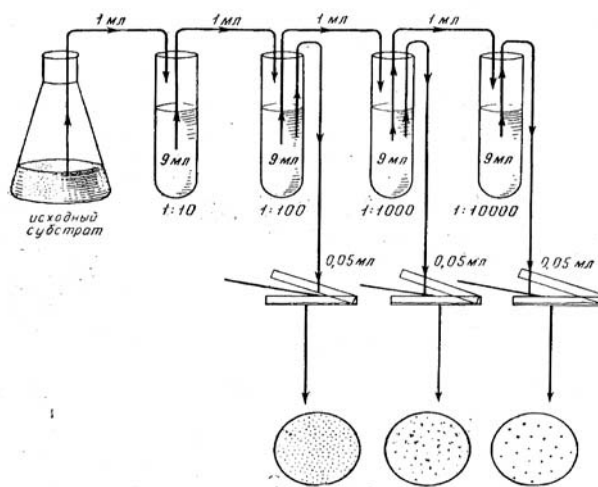
Мұнайды лабораториялық жағдайда пеницилин флакондарында, резеңке тығындармен жабылып автоклавта 0,5 атм. стерилизацияланады.

Тәжірибеге 100 мл стерильді қоректі орта қолданылды, топырақтың мөлшері 5 г, ал енгізілетін мұнайдың көлемі 1 мл. Бұл қоректік ортасы бар колбаны 10 тәулік бойы +4 °С ұстаймыз. Бақылау ретінде мұнайы бар қоректік орта тек бактериасыз болып алынады.

Таза белсенді микроағзалардың культураны бөліп алу үшін, оларды (РПА) БПА чашкаларға егеміз, +4 °С. Таза культураларды Кох әдісімен жеке колонияларды бөліп алды. Әдістің ерекшелігі белгілі бір көлемдегі зерттелініп отырған суспензияның қатты қоректік ортаға егілуі және өскеннен кейінгі колонияның санын есептеу болып табылады. Сұйылтуды стерильденген құбыр суымен жүргізген. Сұйылту үшін дозатормен 9 мл құбыр суын құямыз және оларды 1 атм. стерильдейміз. Содан кейін стерильді пипеткамен 1мл жинақтаушы культурадан стерильді құбыр суы бар пробиркаға құямыз (2-сурет). Бұл сұйылтудағы 1мл суспензияны келесі пробиркаға құямыз. Осылай қайталанып жасалған шараны 10-шы сұйылтуға дейін жасаймыз.

Петри чашкасына егу мынадай тәсілмен егіледі. Стерильді жағдайда әрбір Петри чашкаларына БПА 20-30 мл құямыз да, қоректік орта кепкенше көлденеңінен қалдырамыз. Одан кейін чашкаларды 2-3 тәулікке төңкеріп (беткі жағын төмен) қоямыз. Егу үшін чашкалардың стерильді, яғни ластанбағанын пайдаланамыз.

Егу үшін 3,6 және 9-шы сұйылтуларды аламыз, суспензияны 0,1 мл осы сұйылтулардан Петри чашкаларына тамызып, шпательмен жақсылап жағамыз. Егілген чашкаларды тоңазытқышқа қоямыз. 10 тәуліктен соң өскен колонияларды, чашкаларды ашпай сыртынан санаймыз. әрбір өскен колонияны екі пробиркадағы БПА (косягына) егеміз. Егілген пробирканы 10 тәулікке тоңазытқышқа қоямыз. Бөлініп алынған культуралардың штрихтің сызығымен өскен колонияны көріп, олардың таза екендігіне көз жеткіземіз. Біркелкі штрихтің өскендігін байқаған соң, келесі зерттеулерге осы штамдарды қалдырамыз.



2 Сурет – Микроағзалардың суспензиясына сұйылту жасау және егу схемасы

2.3 Мұнай тотықтырғыш микроағзалардың арасынан белсенділерін іріктеп алу және оларды идентификациялау

Бөлініп алынған мұнайда өсу қабілетін Ворошилова-Дианова қоректік ортада зерттелінген Ворошилова-Дианова қоректік ортасы бар пробиркаларға 0,5 % стерильді мұнай және 1 % 14 тәуліктен соң инокулятты құямыз. Культивациялау 4 °С болды. Қоректік орта өскендігін бағалау үшін 4-балдық шкаласымен көзбен шолып бақылаумен салыстырып белгілейміз.

Белсенді мұнай тотықтырғыш штаммдардың түрін анықтау үшін, оның морфологиялық, культуральды, физиологиялық, биохимиялық қасиетінің ерекшеліктерін, қазіргі заманғы классификациялау қағидаларымен зерттелінген [30].

Жасушаның формасы (құрылысы) және қосылысын фиксациясын (кептірілген) және кептірілмеген препараттарды микроскопиялау арқылы анықталды; біріншісі фазалы контрасты құрылғымен, екіншісі – иммерсионды жүйемен.

Жасушаның өлшемін микроскоппен анықтайды, окулярлы өлшегішпен (сызғышпен) мкм. кокктардың диаметрін өлшейді, ал таяқшалардың ұзындығы мен енін өлшейді. Өлшемдердің нәтижесін мкм белгілейді. өлшеу жасау үшін тірі жасушаларды пайдаланады. өйткені фиксация мен бояулар жасушаның өлшемін өзгертуі мүмкін [25-30].

Жасушаның жылжымалығын «асылулы тамшының» препаратымен анықтаймыз. Грам бойынша бояу жалпылама әдіспен жасалынады.

Қышқылға төзімділігін Циль-Нильсен әдісімен анықтайды. Масызданған шыныда екі мазок жасалынады: зерттелген жасуша және қышқылға тұрақты микобактериялардың жасушасының препараттын ауада кептіреді және оттың үстіне фуксинін құяды және 2-3 рет оттың үстінде бу шыққанға да дейін ұстаймыз. Бу шыққаннан кейін шетке шығарып қойылады. Содан кейін суытып, фильтр қағазын алып тастаймыз бояуды төгіп, сумен шайып тастаймыз.

Препаратты 5 % H_2SO_4 ертіндісімен түссіздендіру үшін өңдейміз, предметті шыныны 2-3 рет қышқылды стаканға саламыз, бірақ ұзақ ұстамаймыз. Препаратты сумен шайып және метиленді көкпен 3-5 минут боялынады. Бояуды шайып, тағы да сумен шаямыз, кептіріп және иммерсионды жүйемен зерттейміз. Қышқылға төзімді жасушалар қызыл түске, ал түсі көк болса, онда төзімді емес екендігі көрсетіледі.

Культураның сұйық қоректік ортада РПА өсуін анықтаймыз. Крахмалдың гидролиздеу қабілетін анықтау үшін, мынандай заттардан тұратын қоректік орта пайдаланылды (%): пептон – 1,0; KH_2PO_4 – 0,5; ерігіш крахмал – 0,2; агар-агар – 1,5; рН – 6,8-7,0. Қоректік ортаны 1 атм. стерилизациялаймыз және Петри чашкаға құйып шығамыз. Қоректік орта суыған соң, зерттеліп отырған ағзаның штрихын чашкаға егеміз. Культивациялауды 10 тәулікке дейін жалғастырамыз 4°С. Крахмалдың гидролизін қоректік орта егілген штрихтің айналасының (тұнық) мөлдірленуі байқалады [31].

Желатинді еріту қабілетін анықтау үшін, бөлініп алынған белсенді мұнайотықтырғыш штаммдарды ЕПЖ (ет пептонды желатинді) қоректік ортаға егеміз. ЕПЖ қоректік ортасын былай дайындаймыз: МПБ-ға 10-15 % желатин қосамыз да, желатиннің ісінуі үшін 20-30 минут қалдырамыз, одан кейін қоспаны қайтадан толық ерігенге дейін желатинді қыздырамыз және бұл ЕПЖ-ны пробиркаға 8-10мл құямыз. Егуді инемен шаншу арқылы жасаймыз және егілген пробиркаларды тоназытқышқа 4 °С-қа 10 тәулікке қоямыз. Желатиннің сұйылтылуы немесе сұйылтылмауын көзбен қарап білеміз.

Бөлініп алынған белсенді мұнайотықтырғыш микроағзалардың индол сақинасын түзу қабілеттілігін анықтау үшін эрлих реактивімен сапалық реакциясын пайдаланамыз.

0,01 % триптофаны бар ЕПС пробиркаға 8-10мл құямыз және 0,5 атм. стерилизациялаймыз. Одан кейін зерттеліп отырған микроағзаны егеміз, 7 тәулік өткен соң индолдың қатысуын сапалық реакциямен өткіземіз. Бұл үшін қоректік ортаның бетіне (араластырмай) 1-2 мл Эрлих реактивін тамызамыз. Егер қызыл түске боялмаса индолдың түзілмегендігін көрсетеді. Бақылау ретінде стерильді ортада сапалық реакцияны жүргіземіз [32].

(H₂S) Күкірт сутекті түзу бойынша психрофильді мұнайотықтырғыш микроағзаларды өсіру барысында, ЕПБ (сорпасы) 8-10 мл пробиркаға құямыз, 1атм. стерилизациялаймыз және зерттеліп отырған штаммды егеміз. Егіп болған соң қоректік ортаға қорғасынның сірке қышқылын қағазды жолағын пробирканың аузына және тығын ортасына қыстырып қоямыз. Культивациялау 10 тәулікке жалғастырылады. ЕПС-да микроағзалардың даму барысында H₂S күкірт сутекті бөлуі қағаздың қараюынан, яғни қорғасын сульфидінің түзілуін көрсетеді.

Қоректік ортада нитраттардың (тотықсыздану) қалпына келтіру қабілетін анықтау ЕПС-на 0,2 % KNO₃ тұрады.қоректік ортаны пробиркаларға құйып шығамыз да, қолтқыны тастаймыз және 1 атм. стерилизациялаймыз. Стерилизациядан кейін қоректік ортаға зерттеліп отырған микроағзаларды егеміз және оны 10 тәулікке 4 °С – қа тоназытқышқа қоямыз. Алынған нәтижелерді тіркеп аламыз. Нитриттерді Грис реактивімен анықтаймыз.

Зерттеліп отырған микроағзалардың штаммдардың оттегіне қатынасы былайша анықталады. ЕПА пробирканың биіктігінің ½ құйып шығамыз да 1 атм. стерилизациялаймыз. ЕПА егу инемен шаншумен жасалады. Шаншудың бойымен өскен микроағзаларды оттегіне қатынасы осы қарқынды өсуімен бағалаймыз.

Микроағзалардың оксидазалық белсенділігін анықтау үшін зерттеліп отырған 1% тетраметил-р-фенилендиаминінің ерітіндісінің бірнеше тамшысын Петри чашкасына тамызамыз.

Зерттеліп отырған микроағзалардың барлығы оксидазалық белсенділік қабілетінің жоқтығы анықталған.

Ал катализдік белсенділікті анықтау үшін, зерттеліп отырған микроағзалардың қатты қоректік ортаға егіп, өсіреміз. Одан кейін өскен

микроағзалардың (колонияның) үстіне 10 %-ті H_2O_2 ерітіндісін тамызамыз. Оттегінің бөлінуін, газдың көпіршуінен байқауға болады, яғни жасушада катализдың барын көрсетеді.

Бөлініп алынған мұнайоттықтырғыш белсенді микроағзаларды идентификациялау үшін, қандай көмірсутектерді өсуіне пайдаланады. Микроағзалардың өсуіне пайдаланатын: глюкоза, лактоза, манноза көмірсутектері қолданылған. Көмірсутектерді қоректік ортаға 1 % етіп қосамыз. Қоректік ортаны құбыр суымен дайындайды және оған 0,5 % пептон, 0,1 % K_2HPO_4 қосамыз. Содан кейін оған бромкрезолпурпур құямыз, ортаның рН өзгерту үшін 2мл 1,6 % спиртті ерітіндіні 1 литрге қосамыз. Егер рН 6,8 болса, онда қан-қызыл түсті, ал рН 5,2 болса, онда индикатор сары түс көрсетеді. Қоректік ортаны пробиркаға қалтқысымен 9мл-ден құямыз, содан кейін 1атм. стерилизациялаймыз. Көмірсутектері бар қоректік ортаға 0,1-0,2 мл зерттеліп отырған суспензиясын егеміз және оны тоңазытқышқа 4 °С-қа 10 тәулікке қоямыз. Қоректік ортаның лайлануы мен (жұқа) үлпек (қабыршық), тұнбаның пайда болуы немесе болмауын көзбен шолып байқау арқылы бағаладық.

Индикатордың түсінің өзгеруі бойынша мынадай нәтижелер жасалынды, субстраттарды қолдану қышқылданумен немесе орта сілтіленуімен, немесе ортаның рН өзгеруі болмайды.

Бөлініп алынған культураларды тесестіру Бергидің анықтағышымен өткізілді [31].

2.4 Минералды қоректік ортада NaCl әр түрлі концентрациясында белсенді мұнай тоттықтырғыш культураларды өсіру

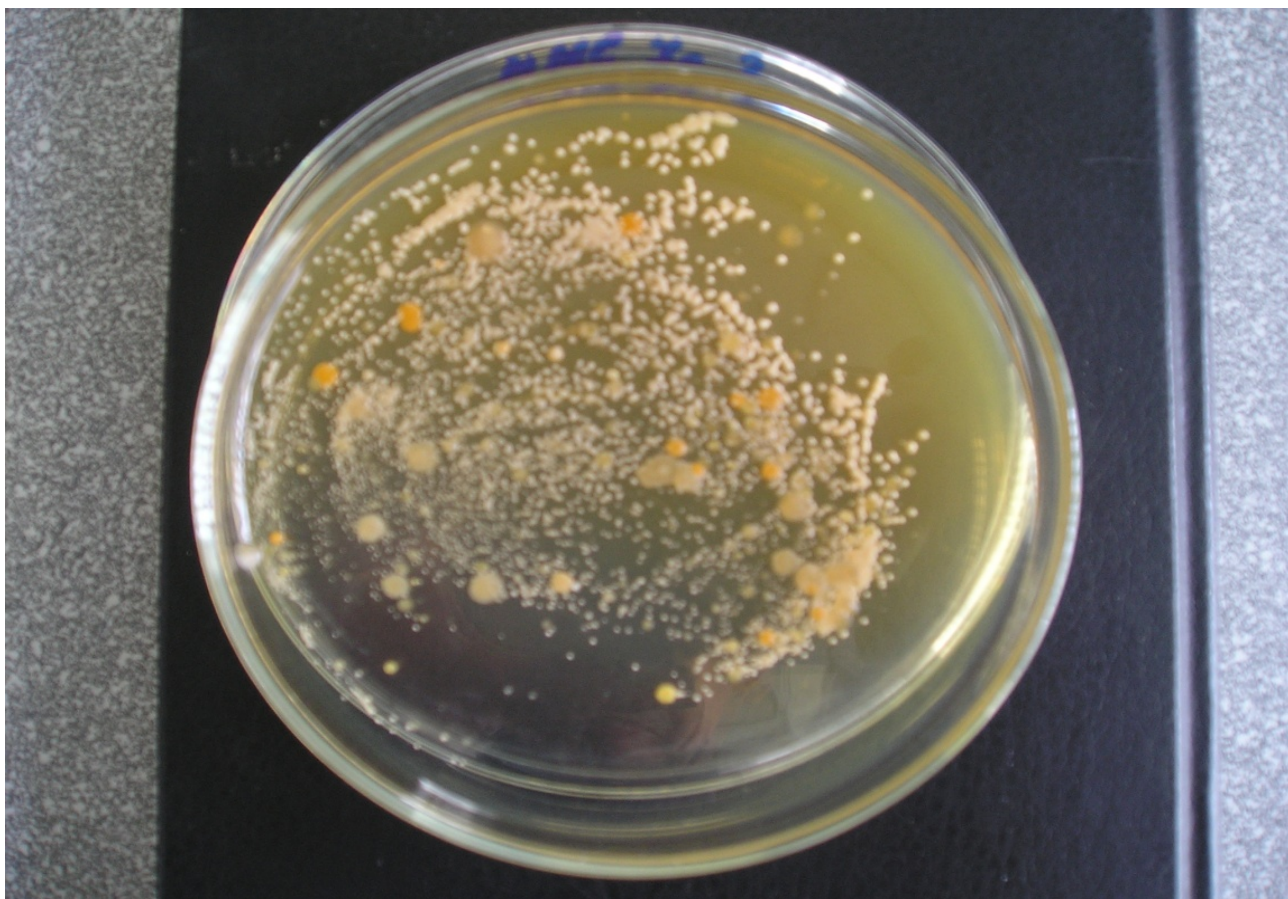
Мұнайоттықтырғыш штамдардың белсенділігін зерттеу үшін Ворошилова-Дианова минералды қоректік ортасын 1, 2, 3 % NaCl және тұзсыз орта қолданылды. Ортаға көміртектің жалғыз қайнар көзі ретінде мұнайдың әртүрлі жерлерінің қоспасын енгізді, көлемі 1 % (химиялық параметрлері әртүрлі көмірсутектердің кең спектрі пайдаланылды). Микроағзаларды өсіру Эрленмейер колбаларында өткізілді (көлемі 100 мл), тоңазытқышта 4 °С 14 тәулік қойылды. Колбаларға мұнай мен бактериялардың суспензиясы (5мл:100мл) арқылы белгілі оптикалық тығыздығын мөлшерімен инокуляциялау, ал қалған мұнайдың салмағын өлшеу әдісімен өткізілді [32].

Мұнай өнімдерінің биологиялық тоттығуын зерттеу барсында (бензин, керосин, дизель отыны) ВД қоректік ортасын қолданылды, көміртектің жалғыз қайнар көзі ретінде лайықты көмірсутекті қосып енгізілді. Микроорганизмдерді Эрленмейер колбаларында өсіріп, мұздатқышта 4 °С, 14 тәулік ішінде ұсталды. Колбаларды инокуляциялау мұнай өнімдерімен (бензин, керосин, дизель отыны) арқылы белгілі оптикалық тығыздығын мөлшерімен инокуляциялау өткізілді.

3 Зерттеу нәтижелері

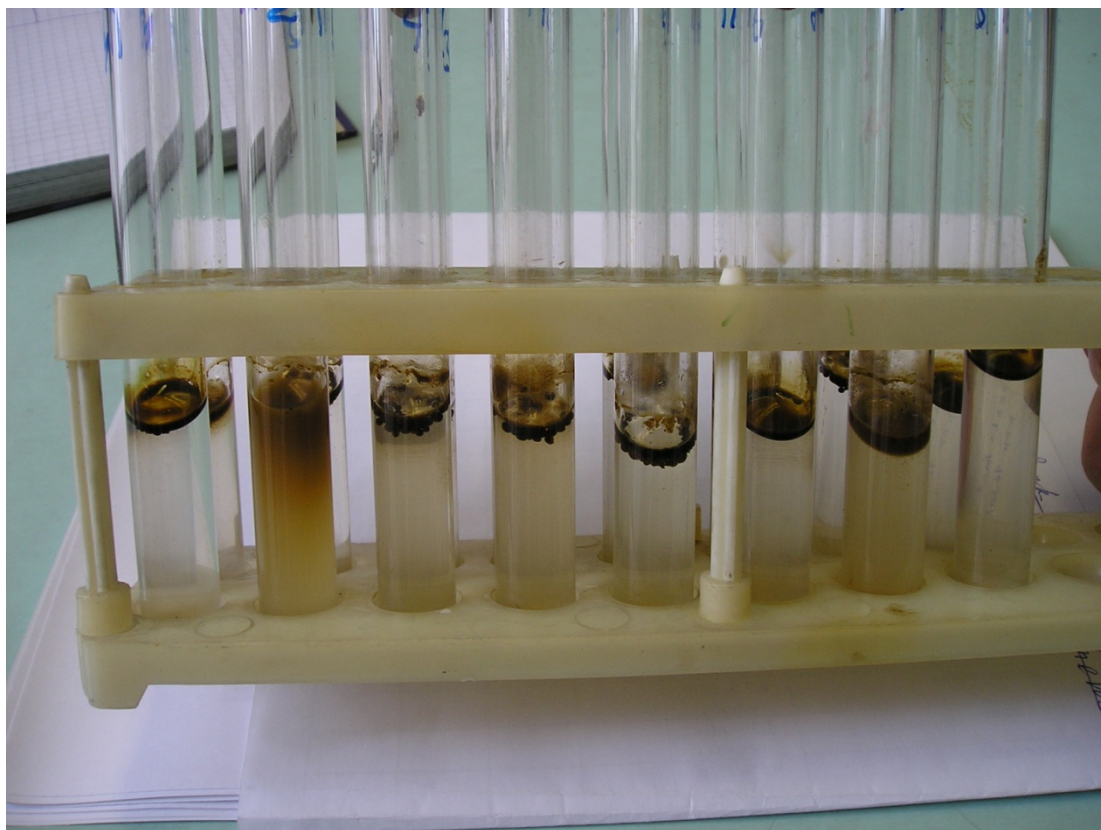
3.1 Мұнайтотықтырғыш микроағзаларды бөліп алу және сұрыптау нәтижелері

Микроағзалардың сұрыптауына арналған, белсенділігі жоғары мұнайтотықтырғыш культураларға мұнай қосу арқылы синтетикалық ортада өсіру және бұл мұнай көміртектің жалғыз қайнар көзі ретінде қолданылды. Зерттеу барысында белсенді мұнай тотықтырғыш деструкциялаушы штамдарды мұнаймен жинақтаушы культуралардан бөліп алып, оларды БПА қоректік ортасына Петри табақшасына топырақтың суспензисынан егеді. Оған мынадай келесі әдістерді қолдандық. Барлық бөлініп алынған штамдар Атырау облысының мұнаймен ластанған топырағынан жинақтаушы культураларды психрофильді микроорганизмдердің 31 штамм бөлінген болатын (3-сурет). Бұл штамдар БПА-ға өсу қабілеттілігі оларды теңестіру үшін сыналған болатын. Бақылауларда тұраралық микроорганизмдердің өсу шегі белгіленген болатын.



3 Сурет – Бактериялардың БПА мұнайда өскен жинақтаушы культураның колониясы

Жеке колонияларды тазалыққа тексеріп, оны пробиркаға егеміз. Содан кейін бөлініп алынған культуралардың өсіру қабілеттілігі тексерілді. Олардың өсу қабілетін 4 балды шкала бойынша бағаланады және бақылаумен салыстырғанда қандай өзгерістерге ұшырағанын 4-суретте көрсетеміз.



4 Сурет – Бактериялардың ВД қоректік ортада мұнаймен өсу қабілетін бағалау

Мұнай деструкцияланбаған жағдайда, сұйық ортада мұнай біркелкі мұнайдың қоңыр қабатымен жабылған пленка болады, колбаның іш жағында мұнайдың бірыңғай қабатымен қапталған. Мұнайды деструкциялаған жағдайда қоректік ортада тіпті басқа көрініс болады, пленкалар мен қабаттар бұзылып, майда бөлшектерге бөлініп кетеді де қоректік орта ашық-қоңыр түске боялады. Бөлініп алынған культуралардың белсенділігі 1-кестеде көрсетілген.

1 Кесте – Бөлініп алынған мұнайототықтырғыш микроағзалардың белсенділігін 4-балдық шкаласы бойынша бағалау

Штамм №	Сипаттамасы	Бағалау
1	Өспейді, мұнай дағы қоректік ортаның бетінде қалады.	0
2	Өспейді, мұнай дағы қоректік ортаның бетінде қалады.	0
3	Өспейді, мұнай дағы қоректік ортаның бетінде қалады.	0
4	Колбаның қабырғаларына мұнай жағылған, қоректік ортаның бетінде майда мұнайдың шариктері түзілген.	2
5	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады, бірақ майда мұнайдың шариктері түзілген.	1
6	Колбаның қабырғаларына мұнай жағылған, қоректік ортаның бетінде майда мұнайдың шариктері түзілген.	4
7	Колбаның қабырғаларына мұнай жағылған.	3
8	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады.	0
9	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады.	0
10	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады, бірақ майда мұнайдың шариктері түзілген.	1
11	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады.	0
12	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады, бірақ майда мұнайдың шариктері түзілген.	1
13	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады.	0
14	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады.	0
15	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады.	0
16	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады.	0
17	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады, бірақ майда мұнайдың шариктері түзілген.	2
18	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады, бірақ майда мұнайдың шариктері түзілген.	1
19	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады.	0
20	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады, бірақ майда мұнайдың шариктері түзілген.	1
21	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады, бірақ майда мұнайдың шариктері түзілген.	1
22	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады.	0
23	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады.	0
24	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады.	0
25	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады.	1
26	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады.	0
27	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады, бірақ майда мұнайдың шариктері түзілген.	1
28	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады.	0
29	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады.	0
30	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады.	0
31	Өспейді, мұнайдағы қоректік ортаның бетінде қалады, бірақ майда мұнайдың дисперсиялаған шариктері түзілген.	3

Ескертулер: 0 – өспеген; 1 – өте әлсіз өсуі; 2 – нашар өсуі; 3 – орташа өсуі; 4 – жақсы өсуі.

Кесте нәтижелерінен көрініп тұрғандай, барлық штамдар мұнайды ыдыратуға қабілетті емес. Барлық зерттелініп отырған психрофильді микроорганизмдердің арасында тек бір ғана штам (6) – 4 балдық белсенділік және 2 штам (7,31) – 3 балды көрсетті. Ал қалған штамдар минералды қоректік орталарда нашар өсті және мұнайды пайдаланбады. Сонымен бұл нәтижелер бойынша, бөлініп алынған психрофильді мұнайототықтырғыш микроорганизмдердің әртүрлі белсенділігі көрсетіп отыр.

Сайып келгенде, келешекте біздің жұмыс істейтін штамдарымыз мұнайда өсетін психрофильді микроорганизмдердің белсенді 3 штамдарын (6,7,31) іріктелініп алынған болатын және олар көміртектің жалғыз қайнар көзі ретінде мұнайды пайдалануда.

3.2 Белсенді мұнайототықтырғыш микроағзаларды идентификациялаудың нәтижелері

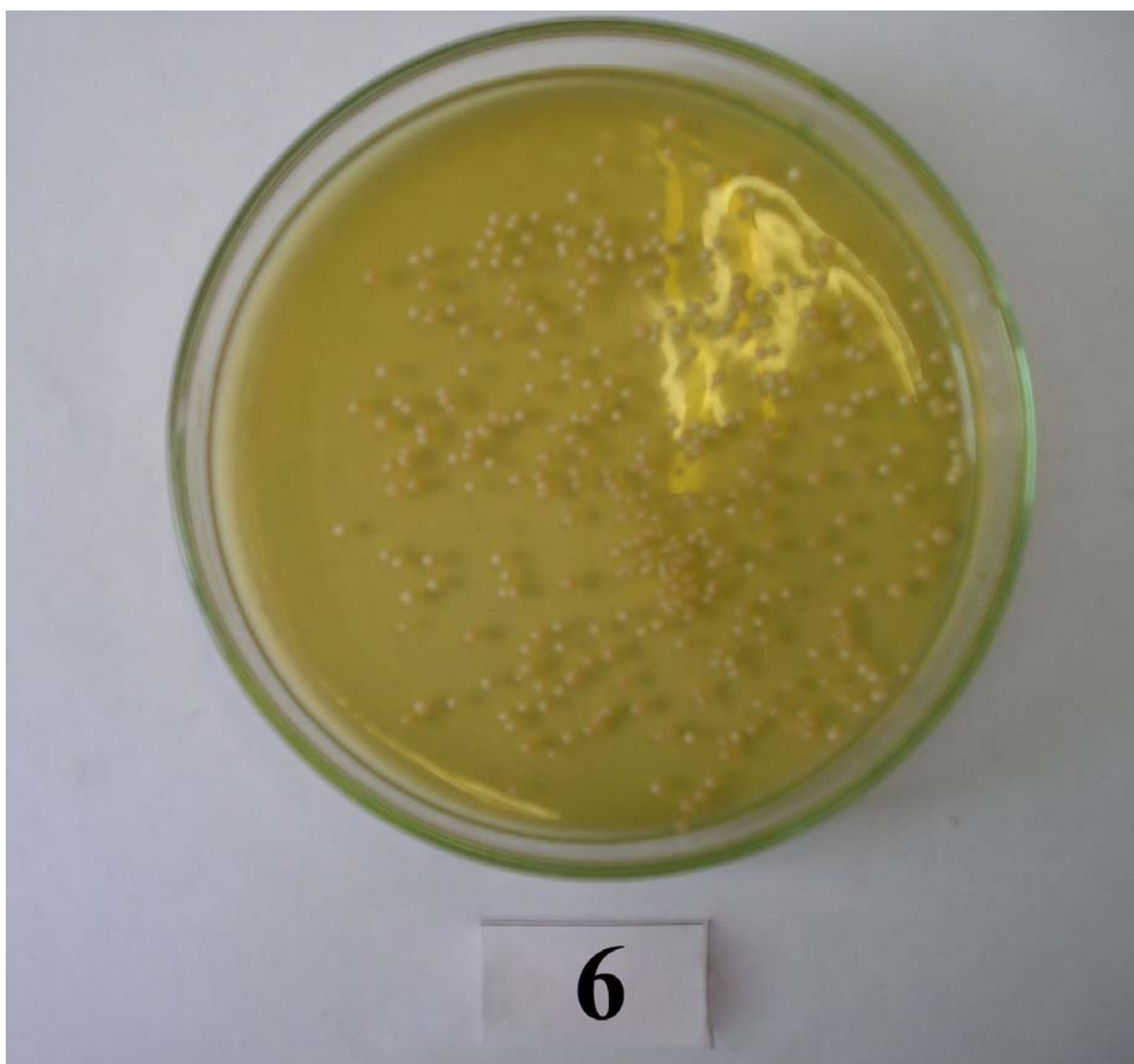
Іріктеліп алынған мұнайототықтырғыш культуралардың штамдарды идентификациялау – Берги анықтағышы арқылы морфологиялық және физиологиялық – биохимиялық белгілерін зерттеу барысында өткізілді. Бұл зерттеудің нәтижелері 2 кестеде көрсетілген. Алынған нәтижелердің негізінде бұл культуралар келесі жағдайда идентификациялаған болатын: т.ш. штам 7 – *Rhodococcus sp.*, штам 6 – *Pseudomonas sp.*, штам 31 – *Acinetobacter sp.*

2 Кесте – Белсенді мұнайототықтырғыш микроорганизм культураларының морфологиялық және физиологиялық-биохимиялық белгілері

Белгілері	Культуралардың нөмерлері		
	6	7	31
Морфологиясы	Майда таяқшалар	Қысқа таяқшалар	таяқшалар
Қозғалғыштығы	+	-	-
Грам бойынша боялуы	Грам-	Грам+	Грам-
Қышқылға тұрақтылығы	-	-	-
Каталаза	+	+	+
Оксидаза	+	-	-
МПБ ¹ да өсуі	++	++	++
Оттегіне қатысы	аэроб	аэроб	аэроб
Желатинды сұйылтуы	-	-	+
Күкірт сутектің түзілуі	-	-	-
Нитриттердің түзілуі	+	+	-
Көмірсутектерді пайдалануы ² :			
глюкоза	А	А	АҚ
лактоза	А	А	А
манноза	АҚ	АҚ	АҚ

Ескертулер: 1: + - әлсіз өсуі, ++ - орташа өсуі, +++ - жақсы өсуі, 2: А-ассимиляцияланады, Қ-қышқылды түзу арқылы сіңіріледі

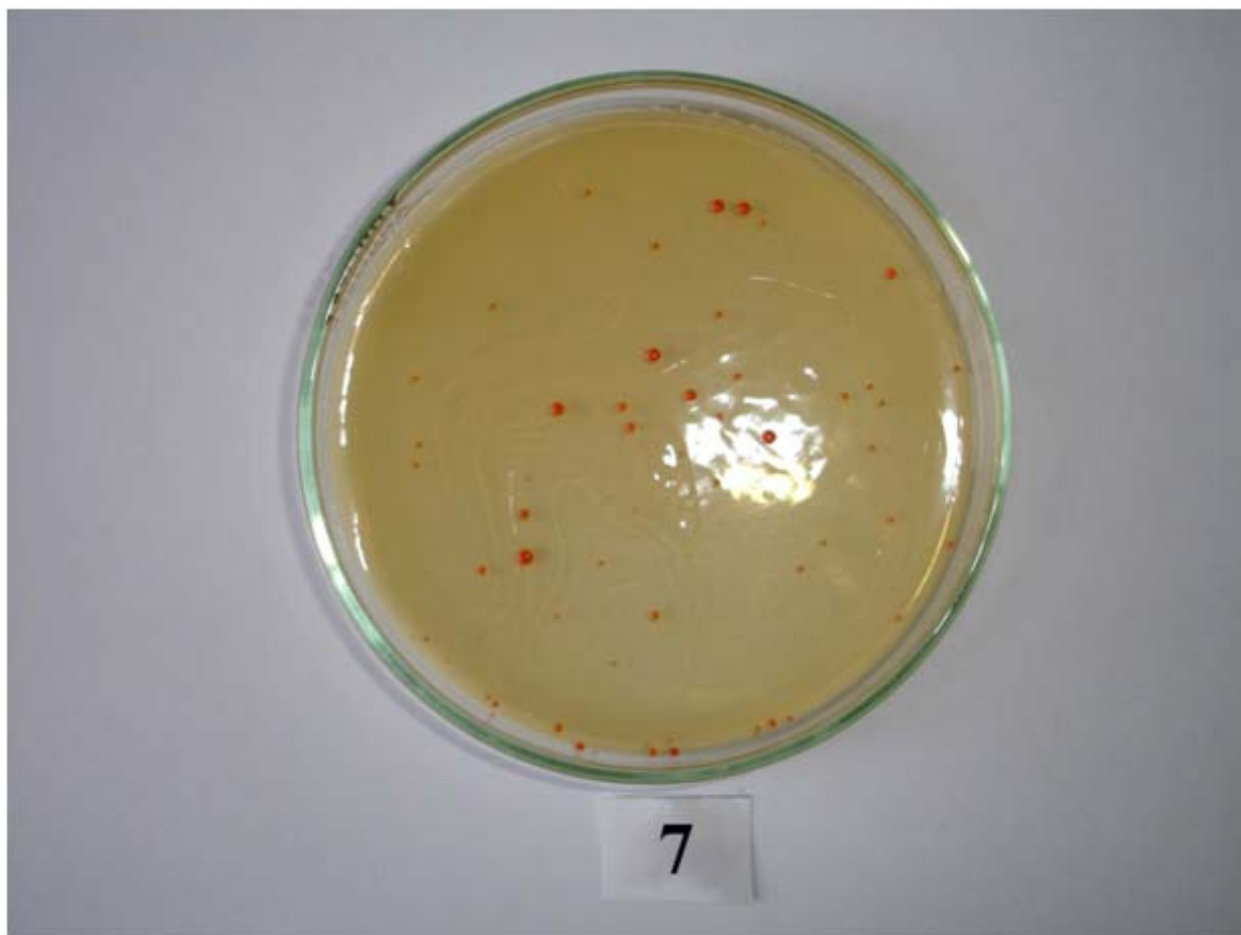
Штам 6 – қысқаша таяқшалар. Қозғалмайтын. Спора түзбейді, грамтеріс жасуша, ең қолайлы рН – 7 ретінде көрсетілген. Оксидаза теріс, Каталлаза теріс, 4-7 °С өседі. Қышқылға төзімсіз, Көміртектің жалғыз қайнар көзі және энергия көзі ретінде әртүрлі глюкоза, манноза субстраттарын пайдаланады, ал лактозаны қолданбайды. Ортаға пигмент бөлмейді. РПА қоректік ортасына екенде, сарғыш түсті, мөлдір, томпиған, тегіс колония түзеді. Желатинді гидролиздемейді, ал крахмалды гидролиздейді. Денитрификация процессін жүргізбейді. Индол сақинасы мен күкіртсутекті түзбейді. Анықталған биохимиялық белгілеріне қарай – *Pseudomonas sp* (5-сурет).



5 Сурет – *Pseudomonas sp.*

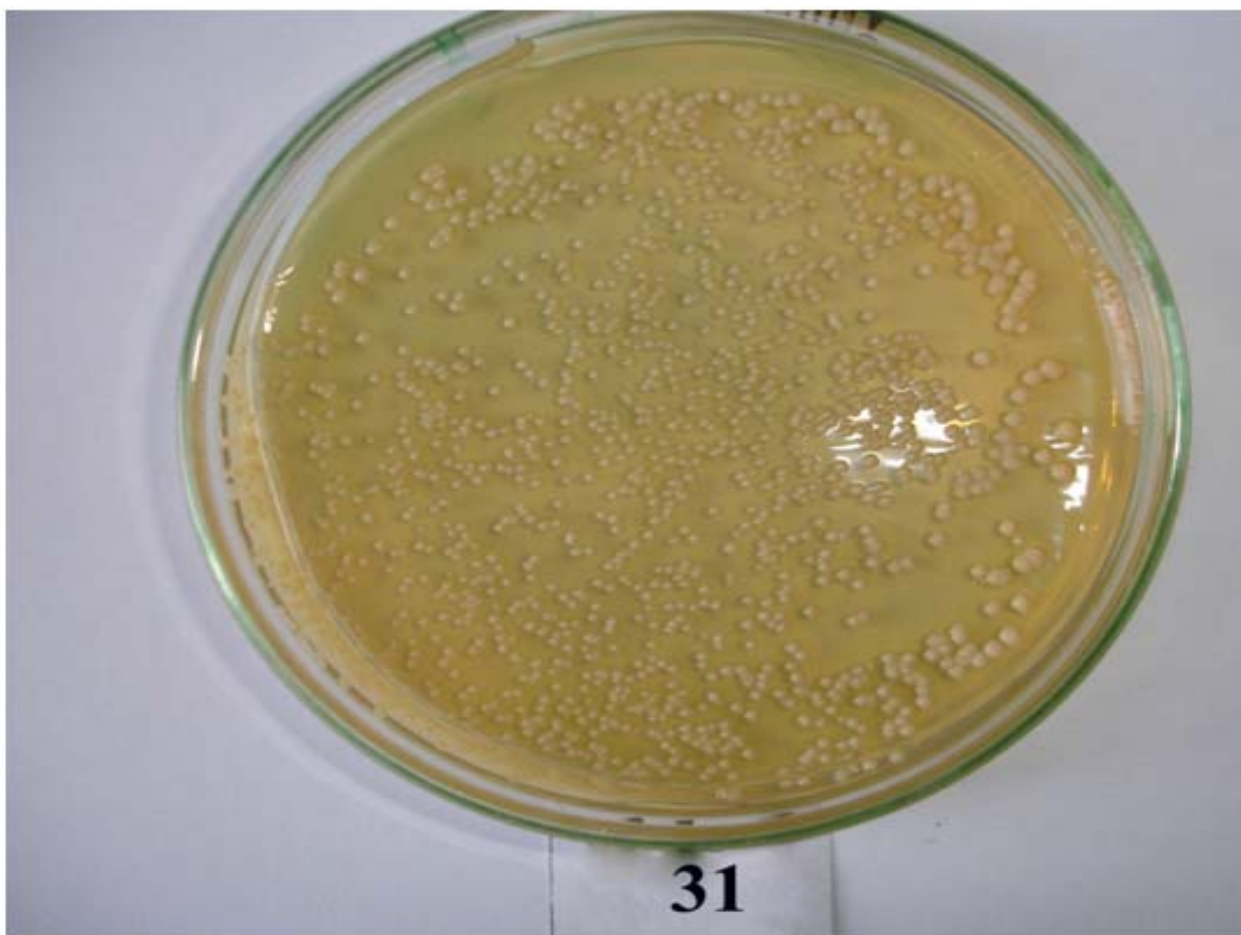
Штам 7 – қысқаша таяқшалар. Қозғалмайтын. Спора түзбейді, грам оң жасуша, ең қолайлы рН –7 ретінде көрсетілген. Оксидаза теріс, каталлаза теріс, 4-7°С өседі. Қышқылға төзімсіз, көміртектің және энергияның жалғыз қайнар

көзі ретінде әртүрлі көмірсутектерді: глюкоза, манноза субстраттарын пайдаланады, ал лактозаны қолданбайды. Ортаға пигмент бөлмейді. РПА қоректік ортасына екенде, қызыл түсті, мөлдір емес, томпиған, тегіс, 2-3 мм болатын, паста тәріздес колония түзеді. Желатинді және крахмалды гидролиздемейді. Денитрификация процессін жүргізбейді. Индол сақинасы мен күкіртсутекті түзбейді. Анықталған биохимиялық белгілеріне қарай – *Rhodococcus sp.* (6-сурет).



6 Сурет – *Rhodococcus sp.*

Штам 31 – 1,2x1,75 мкм таяқша, көбінесе екеуден және қысқаша тізбектерден тұрады . Қозғалмайтын. Спора түзбейді, грам теріс жасуша, ең қолайлы рН –7 ретінде көрсетілген. Оксидаза теріс, каталаза оң, 4-7°C өседі. Қышқылға төзімсіз, көміртектің және энергияның жалғыз қайнар көзі ретінде әртүрлі көмірсутектерді: глюкоза, манноза субстраттарын пайдаланады, ал лактозаны қолданбайды . Ортаға пигмент бөлмейді. РПА қоректік ортасына екенде, тегіс, мөлдір емес, томпиған, тегіс, 2-3 мм болатын, паста тәріздес колония түзеді. Желатинді және крахмалды гидролиздемейді. Денитрификация процессін жүргізбейді. Индол сақинасы мен күкірт сутекті түзбейді. Анықталған биохимиялық белгілеріне қарай – *Acinetobacter sp.* (7-сурет).



7 Сурет – *Acinetobacter sp.*

3.3 Концентрациясы әр түрлі минералды қоректік ортада өсетін белсенді мұнай тотықтырғыш микроағзалардың өсу нәтижелері

Топырақтың әртүрлі дәрежеде тұзды болуына байланысты, белсенді мұнай тотықтырғыш микроорганизмдерді минералды Ворошилова - Дианова қоректік ортасына әртүрлі NaCl құрамымен өсірудің, мұнайды қаншалықты ыдыратуға қабілеттілігін анықтау болды. Мұнай тотықтырғыш микроорганизмдерді Ворошилова-Дианова қоректік ортасына 1 %, 2 %, 3 % NaCl және тұзсыз, көміртің көзі ретінде мұнайдың қоспасын енгізді, жеңіл және тұтқырлы фракциялардан құрылған қоспа. Тәжірибенің нәтижелері 3-кестеде көрсетілген.

3 Кесте - Белсенді культуралардың NaCl әртүрлі концентрациясын мұнай қоспасында пайдалануы

Штамдар	Мұнайдың утилизациялану дәрежесі, %			
	тұзсыз	1 % NaCl	2 % NaCl	3 % NaCl
<i>Pseudomonas sp. 6</i>	41.20	66.98	53.29	48.35
<i>Rhodococcus sp. 7</i>	42.94	56.09	62.99	59.00
<i>Acinetobacter sp. 31</i>	66.76	74.07	61.42	34.19
Контроль	5.01	4.95	5.43	5.72

Тәжірибиенің нәтижелері бойынша, көптеген зерттелініп отырған штаммдар NaCl 1 және 2 % концентрациясында мұнайды жақсы ыдыратқандығы көрсетілген, ал құрамында 3 % тұзы бар қоректік ортада бұл белсенділік төмен екендігі байқалған. Тек бір ғана штамм *Acinetobacter sp. 31* мұнайды тұзбен және тұзсыз (60 % аса) ыдырататындығы анықталған, бірақ 3 % тұздың құрамы болған кезде, культураның өсуіне тежегендігі байқалған.

Pseudomonas sp. 6 штаммы 1% тұздың қатысымен мұнайды өте жақсы ыдыратқандығы анықталды.

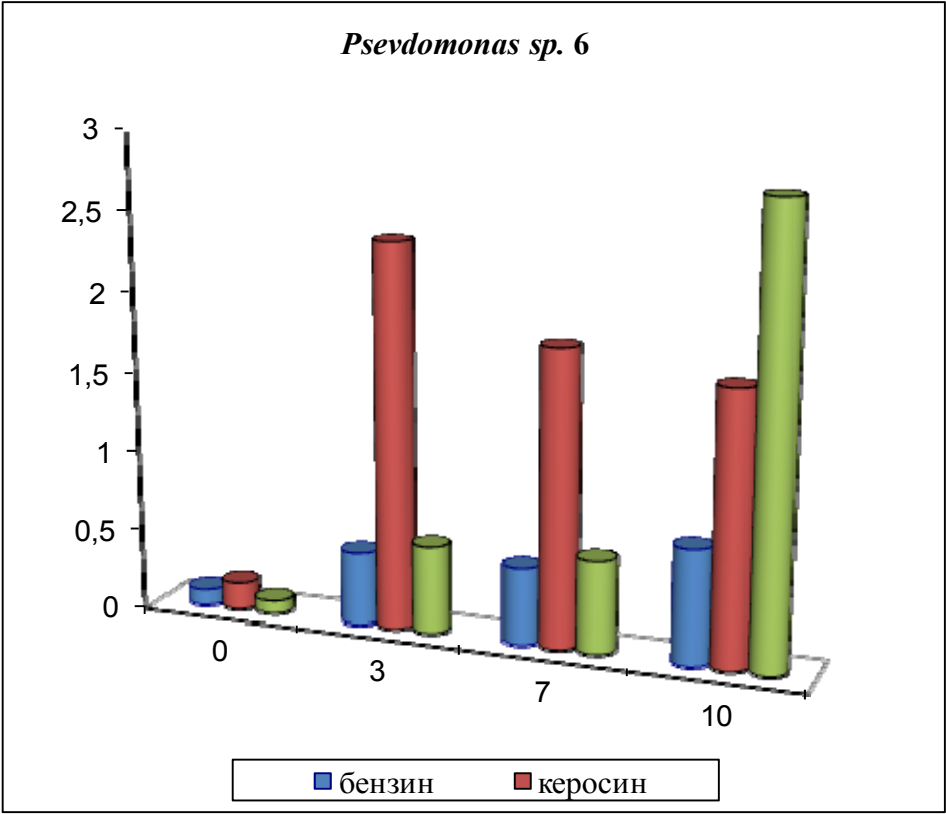
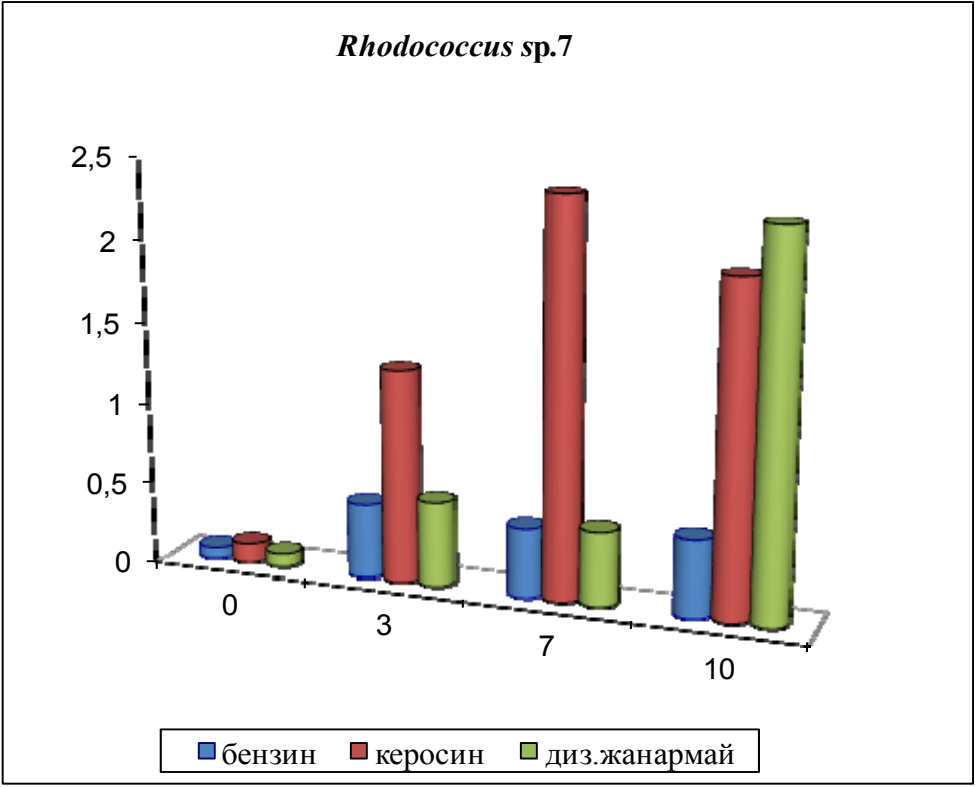
Rhodococcus sp. 7 штамм мұнайды тұзсыз және NaCl әртүрлі концентрациясының қатысымен ыдыратуға қабілетті және мұнайды ең көп ыдыратқан 2 % NaCl екендігі байқалған.

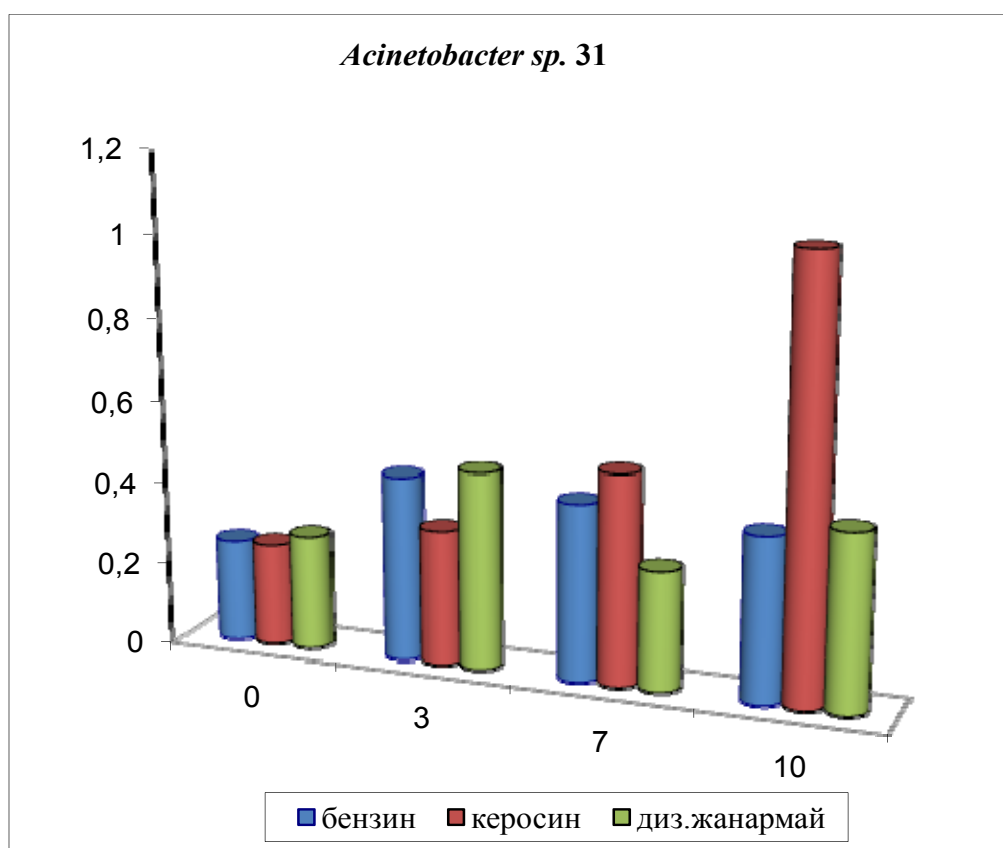
3.4 Мұнай өнімдерінде өсетін белсенді мұнай тотықтырғыш микроағзалардың көрсеткен нәтижелері (бензинде, керосинде, дизельді отында)

Сонымен бірге, белсенді мұнай тотықтырғыш микроорганизмдерді культураларын мұнайдың қоспаларынан басқа мұнай өнімдерінде (бензинде, керосинде, дизельді отында) өсуі зерттелген.

Белсенді мұнай тотықтырғыш микроорганизмдерді Ворошилова-Дианова минеральды қоректік ортасында мұнай өнімінің 1 % қосып, өсіріп, зерттелінген болатын. Биомассаның өскендігін фотоколориметриялық әдіспен ФЭК-56 анықталды.

Тәжірибиенің нәтижелері 8-суретте көрсетілген. Барлық зерттелініп отырған штаммдар керосинде және дизельді отында жақсы өскен, ал бензинде нашар өскендігі байқалған. Керосинде өскен 6-шы штамм - 3 тәулікте, ал 7-ші штамм тек 7-ші тәулікте және 31-ші штамм 10-шы тәулікте өте жоғарғы белсенділігін көрсеткен.





8 Сурет – Мұнай өнімдеріндегі мұнайотықтырғыш штамдардың белсенді өсуі

Дизельді отында барлық культуралар биомассаның максимальды мөлшерінің 10 тәулікте жиналғандығы анықталды.

Pseudomonas sp. 6 штаммы керосин мен дизель отынын шамамен біркелкі пайдаланған болса, ал керосинде 3 тәулікте жақсы өскендігі көрсетілген. Бензинде тек 10 тәулікте ғана биомассаның көбейгендігі байқалған.

Rhodococcus sp. 7 штаммы керосинде 7 тәулікте ғана, ал дизель отынында 10 тәулікте қарқынды өскен болатын.

Acinetobacter sp. 31 штаммы керосинде өте жақсы өссе, ал қалған көмірсутектерде нашар өскендігі байқалған.

ҚОРЫТЫНДЫ

Мұнаймен ластанған топырақты биотехнологиялық әдістер арқылы, яғни мұнай тотықтырғыш микроағзардың көмегіне жүгіне отыра тазартылады. Зерттеу нәтижесінде 3 белсенді мұнайтотықтырғыш бактериялардың штаммы бөлініп алынған. Олар: *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Acinetobacter sp.* Бұл микроорганизмдер энергияның қайнар көзі ретінде мұнай және мұнай өнімдерін қолдануға қабілетті.

Бұл штамдардың морфологиялық-культуральдық және физиологиялық-биохимиялық белгілері зерттелген болатын. Осы белгілерге қарай бөлінініп алынған культуралар: *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Acinetobacter sp.*

Белсенді мұнайтотықтырғыш культуралардың NaCl әртүрлі концентрацияларында мұнайды тұтынуы анықталған және зерттелген штамдардың ең қарқынды пайдаланды, мұнайды ыдыратуы NaCl концентрацияларының 1 және 2% байқалған.

Белсенді мұнай тотықтырғыш микроағзалардың культураларын әртүрлі мұнайдың өнімдерінде өсу қабілеттілігі анықталған болатын. Барлық зерттелініп отырған штамдар, әсіресе керосин мен дизельді отынында өте жақсы өскен болса, ал бензинде әлсіз белсенділік көрсеткен.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

- 1 Диаров М.А., Гиладжов Е.Г., Димеева Л.А и др. Экология и нефтегазовый комплекс. Монография в 5 томах.-Алматы. Гылым, 2003. Т.2-340
- 2 Магда И.Н., Соловьев А.Ю., Файзулина Э.Р. Опробование препарата углеводородокисляющих бактерий для очистки почвы от нефти и нефтешлама. //Материалы междунар. Науч.-практич конф. «Актуальные проблемы экологии и природопользования в Казахтане и сопредельных территориях». – Павлодар, - 2006, -с. 21-22.
- 3 Оборин А.А., Калачникова Т.А., Масливец Е.Н. Самоочищение и рекультивация нефтезагрязненных почв Предуралья и Западной Сибири //Восстановление и загрязнение почвенных экосистем. Сб. науч. тр. – М.: Наука, 1988. – С. 140-159.
- 4 Гиладжов Е.Г., Диаров М.А., Муликов Р.Р. Экология и нефтегазовый комплекс. – Алматы: Гылым, 2003. Т.4 – 832 с.
- 5 Булатов А.И., Макаренко П.П., Шеметов В.Ю. Охрана окружающей сареды в нефтегазовой промышленности.- М.: Недра, 1997. – 470 с.
- 6 Пырченкова И.А., Гафаров А.Б., Пунтус И.Ф., Филонов А.Е., Боронин А.М. Выбор и характеристика активных психрофильных микроорганизмов – деструкторов нефти //Прикл. биохимия и микробиология, 2006, том 42, № 3, с. 289-305
- 7 Колесников И.М., Базенкова У.И., Благиных А.В., Плещеева О.В. Методы рекультивации нефтезагрязненных почв //Микробтогогические методы защиты окружающей среды (5-7 апреля, 1988, Пушино).: Тезисы докл. Пушино, 1988. –с. 143-148
- 8 Suzuki I. Microbial leaching of metals from sulfide minerals// Biotechnology Advances. - 2001. - №19. - P. 119-132.
- 9 Плешакова Е.В., Дубровская Е.В., Турковская О.В. Приемы стимуляции аборигенной нефтеокисляющей микрофлоры //Биотехнология. – 2005. №1. с. 42-50
- 10 Willscher S., Bosecker K. Studies on the leaching behaviour of heterotrophic microorganisms isolated from an alkaline slag dump// Hydrometallurgy. - 2003. - v.71. - P.257-264.
- 11 Аханов Ж.У., Фаизов К.Ш., Асанбаев И.К., Современное состояние экологии почв Казахстана. //Доклады Академии Наук Республики Казахстан – Алматы, 1992.-№ 4. 52-56 с.
- 12 Свирскене А. Микробиологические и биохимические показатели при оценке антропогенного воздействия на почвы. //Почвоведение.- 2003. № 2. с. 202-210
- 13 Асанбаев И.К. Антропогенные изменения почв и их экологические последствия. – Алматы: Гылым МН-АН РК. 1998. -249 с.

- 14 Суржко Л.Ф., Финкельштейн З.И., Баскунов Б.П., Головлева Л.А. Утилизация нефти в почве и воде микробными клетками //Микробиология. – 1995. - №3. – С. 393-398.
- 15 Пиковский Ю.И., Геннадиев А.М., Чернявский С.С., Сахаров Г.Н. Проблемы диагностики и нормирования загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами //Почвоведение – 2003. -№ 9. – с.1132-1140
- 16 Ворошилова А.А., Дианова Е.В. Окисляющие нефть бактерии – показатель интенсивности биологического окисления нефти в природных условиях //Микробиология. - 1952. - Т.21, - №4. - С. 408-415.
- 17 Фаизов К.Ш., Асанбеков И.К., Кокжаев А.Б., Ахметов К.К. Экологические функции почв и современное состояние почвенного покрова Казахстана //Известия НАН РК. Серия биол. – 2002. - №3.- с. 10-15
- 18 Ананько Г.Г, Пугачев В.Г., Тотменина О.Д., Репин В.Е. Устойчивость нефтеокисляющих микроорганизмов к низким температурам //Биотехнология. 2005 №3 с. 63-69
- 19 Хомякова Д.В., Ботвинко И. В., Нетрусов А.И. Выделение психрофильных углеводородокисляющих бактерий из нефтезагрязненных почв //Прикл. Биохимия и микробиология. -2003. Т. 39, №2. с.661-664
- 20 Капотина Л.Н., Морщакова Г. Н. Биологическая деструкция нефти и нефтепродуктов загрязняющих почву и воду //Биотехнология. – 1998. – 1. с. 85-92
- 21 Суржко Л.Ф., Финкельштейн З.И., Баскунов Б.П., Янкевич М.И., Яковлев В.И., Головлева Л.А. Утилизация нефти в почве и в воде микробными клетками //Микробиология. – 1995. – 64,3. с.393-398
- 22 Колесников И.М., Базенкова Е.И., Благиных А.В., Плещеева О.В. Методы рекультивации нефтезагрязненных почв //Микробиологические методы защиты окружающей среды (5-7 апреля, 1988, Пущено).: Тезисы докл. Пущено,1988. – с. 143-148
- 23 Мукашева Т.Д., Шигаева М.Х., Атемова Г.Т, Биостимуляция как один из методов биоремедиации нефтезагрязненных почв //известия МОН и НАН РК. Серия биологическая и медицинская. 2001. с. 20-27
- 24 Исмаилов Н.М., Пиковский Ю.И. Современное состояние методов рекультивации нефтезагрязненных земель //Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М.: Наука,1988. с. 222-230
- 25 Практикум по микробиологии. Под ред. Н.С. Егорова. Учебное пособие. М., изд-во Моск. Ун-та, 1976. 307 с. с или предм. указ.
- 26 Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. Высш. Учеб. Заведений-/- А.И. Нетрусов, М.А. Егорова и др. – М.: Издательский центр – «Академия», 2005. -608 с.
- 27 Киреева Н.А. Водопьянов В.В. Мифтахова А.М. Биологическая активность нефтезагрязненных почв. Уфа: Гилем, 2001. 376с.

28 Алиева Р.М., Шилова Н.К., Файзуллина Э.Р. микробиологическое окисление дизельного топлива, бензина, керосина //Известия НАН РК. Серия биологическая. 1994. №1. с.51-55

29 Исмаилов Н.М., Гаджиева В.И., Гасанова М.Г. Коэффициент минерализации углеводов как показатель самоочищающей способности нефтезагрязненных почв и эффективности применяемых методов, их рекультивации //Известия АН АзССРсер. Биол.- 1984. № 6. – с.76-85

30 Справочник месторождения нефти и газа Казахстана. – А. 2005г – 55 б.

31 Орлов Д. С., Амосова Я .М. Методы оценки нефтезагрязненных почв// Биотехнологические методы охраны окружающей среды. Тезисы докладов. – Самарканд, 1988 ж. 57 б.

32 Халимов Э. М., Левин С. В., Гузев В.С.// Экологические и микробиологические аспекты повреждающего действия нефти на свойства почвы//Вестник Московского ун-та, серия: Почвоведение, 1996.-№2.-59 б.

Отчет подобия



Университет:	Satbayev University
Название:	Мұнаймен ластанған топырақты биотехнологиялық жолмен тазарту
Автор:	Мамбетова Сымбат Калмуханбетовна
Координатор:	Бакытжан Анапияев
Дата отчета:	2019-05-03 11:25:27
Коэффициент подобия № 1: ?	16,0%
Коэффициент подобия № 2: ?	9,0%
Длина фразы для коэффициента подобия № 2: ?	25
Количество слов:	6 277
Число знаков:	50 506
Адреса пропущенные при проверке:	
Количество завершенных проверок: ?	31



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 соответственно.
Количество выделенных слов 23

>>

Самые длинные фрагменты, определенные, как подобные

>>

Документы, в которых найдено подобные фрагменты: из RefBooks