

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И. Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Биотехнология» кафедрасы

Қалимолда Элина Жақытқызы

Мұнай өнімдерімен ластанған топырақты тазарту биотехнологиясы

**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



**КОРҒАУҒА ЖІБЕРІЛДІ**  
БТ кафедра менгерушісі  
PhD д-ры профессор  
З.К.Туйебахова  
«06» 05 2019 ж.

### ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

Тақырыбы: «Мұнай өнімдерімен ластанған топырақты тазарту биотехнологиясы»

5B070100 - «Биотехнология» мамандығы бойынша

Орындаған

Қалимолда Э.Ж.

Ғылыми жетекші

б.ғ.д, профессор

 Анапияев Б.Б.

«06» 05 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



**Дипломдық жұмыс орындауға  
ТАПСЫРМА**

Білім алушы Қалимолда Элина Жақытқызы

Тақырыбы: Мұнай өнімдерімен ластанған топырақты тазарту биотехнологиясы

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

Аяқталған жұмысты тапсыру мерзімі 02.05.2019 жылы

Дипломдық жұмыстың бастапқы берілістері Диплом алды өнеркәсіптік практикадан алынған материалдар.

Дипломдық жұмыста қарастырылатын мәселелер тізімі

А) Мұнай өнімдерімен ластанған топырақты тазалауда биотехнологиялық әдістері анықтау;

Ә) Ластанған топырақ құрамынан мұнай тотықтырушы микроорганизмдер культурасын анықтау;



Б) Іріктелген культуралардың мұнай өнімдерін ыдырату қасиетін бағалау.

Ұсынылған негізгі әдебиет: атау №26

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
Әдебиетке шолу	б.ғ.д., ассоц.профессор Анапияев Б.Б.	06.05.2019	
Материалдар мен әдістер			
Зерттеу нәтижелері			
Норма бақылау	Ғылым магистрі, Тұрғымбаева Қ.Қ.	06.05.19	

Ғылыми жетекші  Анапияев Б.Б.

Тапсырманы орындауға алған білім алушы  Қалимолда Э.Ж.

Күні «06» 05 2019 ж.

## АНДАТПА

«Мұнай өнімдерімен ластанған топырақты тазарту биотехнологиясы» атты дипломдық жұмыстың көлемі қағаз түрінде 32 беттен тұрады. Диплом кіріспе, үш бөлімнен, қорытынды және 26 атаудан тұратын ғылыми мақалалар мен оқу әдебиеттерінің тізімінен, 3 кестеден және 5 суреттен тұрады.

Мақсаты. Мұнай өнімдерімен ластанған топырақты биотехнологиялық әдістермен тазарту.

Дипломдық жұмыста мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған топырақтарды биоремедиациялық әдістермен тазалау үрдістеріне қысқаша шолуын ұсынады. Топырақ сынамасынан бактерияларды бөліп алу және олардың қасиетін анықтау үшін мынадай әдістер қолданылады, олар: микробиологиялық, таза дақылдарды бөліп алу, морфологиялық – культуралдық, физиологиялық әдістер.

Дипломдық жұмыстың нәтижесі бойынша мұнаймен ластанған топырақтан 2 таза дақыл бөлініп алынды. Гетеротрофты бактериялардың *Bacillus* туысының – өкілдері екендігі және бактериялардың мұнайдың 10 % қатысындағы өсу жылдамдығы анықталды.

Түйінді сөздер: биоремедиация, биодеградация, биопрепарат, рекультивация.

## АННОТАЦИЯ

Объем дипломной работы "Биотехнология очистки почв, загрязненных нефтепродуктами" на бумажном носителе составляет 32 страниц. Диплом состоит из введения, трех разделов, заключения и списка научных статей и учебной литературы, состоящей из 26 наименований, 3 таблиц и 5 рисунка.

Цель. Биотехнологическими методами очистки почв, загрязненных нефтепродуктами.

В дипломной работе представлен краткий обзор процессов очистки почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами биоремедиционными методами. Для выделения бактерий из пробы почвы и определения их свойств используются следующие методы: микробиологические, выделение чистых культур, морфолого – культуральные, физиологические методы.

По результатам дипломной работы из нефтезагрязненного грунта выделены 2 чистых культур. Установлено, что гетеротрофные бактерии являются родственниками – представителями *Bacillus* и скорость роста бактерий в отношении 10% нефти.

Ключевые слова: биоремедиация, биodeградация, биопрепарат, рекультивация.

## ANNOTATION

The volume of the diploma work "Biotechnology of soil purification contaminated with petroleum products" on paper is 32 pages. The diploma consists of an introduction, three sections, conclusion and a list of scientific articles and educational literature, consisting of 26 titles, 3 tables and 5 figures.

Purpose. Biotechnological methods of cleaning soils contaminated with petroleum products.

The diploma work presents a brief overview of the processes of soil purification contaminated with oil and petroleum bioremediation methods. To isolate bacteria from the soil sample and determine their properties, the following methods are used: microbiological, isolation of pure cultures, morphological and cultural, physiological methods.

According to the results of the thesis of oil-contaminated soil allocated 2 pure culture. It is established that heterotrophic bacteria are relatives – representatives of *Bacillus* and growth rate of bacteria in relation to 10% of oil.

Key words: bioremediation, biodegradation, biopreparation, recultivation.

## МАЗМҰНЫ

	Кіріспе	9
1	Әдебиеттерге шолу	10
1.1	Мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған топырақты тазарту шаралары	10
1.1.1	Биоремедиациялық шаралар	10
1.2	Қазақстан мен Ресейдің биотехнологиялық нарығымен танысу	12
1.2.1	Биопрепараттар мен бактериялар қауымдастығы	13
2	Материалдар мен әдістер	20
2.1	Қолданылған материалдары	20
2.2	Қолданылған қоректік орталар	20
2.3	Қолданылған әдістер мен құралдар	21
2.3.1	Қажетті құрал-жабдықтар	21
2.3.2	Топырақ сынамаcынан таза культураны алу	22
2.3.3	Алынған бактериялардың морфологиялық қасиеттерін анықтау	23
2.3.4	Алынған бактериялардың культуралдық қасиетін анықтау	25
2.3.5	Алынған бактериялардың деструкторлық қасиеттерін анықтау	25
3	Зерттеу нәтижелері	27
3.1	Алынған таза дақылдардың морфологиялық қасиеттерін сипаттау	27
32	Алынған таза дақылдардың культуралдық қасиеттерін сипаттау	28
33	Іріктелген культуралардың мұнай деградациялау қасиетін бағалау	29
	Қорытынды	30
	Пайдаланған әдебиеттер тізімі	31



## КІРІСПЕ

Жұмыстың өзектілігі. Қазіргі таңда жанармай мен басқа да майлаушы материалдарға, түрлі пластикалық массаларға және басқа да мұнай химиясы өнімдеріне сұраныс өсуіне байланысты үздіксіз мұнай барлау және оны өндіру тоқтатылмайды. Нәтижесінде тасымалдау көлемі артып, қоршаған ортаның ластануы артылуда. Бұндай мәселе елімізде, Батыс Қазақстан облысында да кездеседі.

Мұнаймен ластанған топырақты қалпына келтіруде тек қана техникалық жабдықтарды қолданып қана қоймай, биологиялық әдістерінде қолдану керек. Табиғатта кездесетін микроорганизмдер қауымдастығының мұнайды тотықтырушы потенциалын пайдалау қажет.

Жұмыстың мақсаты: Мұнай өнімдерімен ластанған топырақты биотехнологиялық әдістермен тазарту.

Жұмыстың міндеттері:

1 Мұнай өнімдерімен ластанған топырақты тазалауда биотехнологиялық әдістерді анықтау;

2 Ластанған топырақ құрамынан мұнай тотықтырушы микроорганизмдер культурасын анықтау;

3 Іріктелген культуралардың мұнай өнімдерін ыдырату қасиетін бағалау.

## **1 Әдебиетке шолу**

### **1.1 Мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған топырақты тазарту шаралары**

Мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған топырақты тазарту өзекті мәселелердің бірі болып табылады. Мұнайды жер қойнауынан шығару, тазалау және оны тасымалдау техникалық жағынан қиын әрі қауіпті үрдістерге жатады. Себебі, кең орындарын өндеу кезінде табиғи ортасы сақталынбайды. Мұнайды шығарудың әр сатысында мұнайдың белгілі мөлшерінің төгілуімен жүреді. Ол өз кезегінде орны толмас ахуал тудырады. Мұнайдың үздіксіз төгінділері адам өміріне және қоршаған ортаға жағымсыз әсер етеді [1].

Мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған топырақты тазарту үшін түрлі әдістер қолданылады: физикалық, механикалық, термиялық, химиялық және т.б. бұл әдістердің қажеттісін таңдау келесі факторлар бойынша қарастырылады: ластану дәрежесіне, ластану ұзақтылығына, ластаушы мұнай құрамына, топырақтың құрамына, қасиетіне және ландшафтық және климаттық жағдайларға байланысты таңдалады. Экологиялық тұрғыдан қарағанда, биотехнологиялық әдістерді қолдана отырып тазалау тиімді болып табылады [2].

#### **1.1.1 Биоремедиациялық шаралар**

Мұнай төгінділерінен топырақ пен суды тазалау – биоремедиациялық шараларға жатады. Биоремедиация – өсімдіктер, микроорганизмдер, саңырауқұлақтар, құрттар және т.б. биологиялық нысандардың метаболиттік потенциалын пайдалана отырып, топырақ, су және ауа кеңістігін ластаушы заттардан тазалау кешенің айтады [3].

Ластаушы заттарды ыдыратуда микроорганизмдер жиі қолданылады. Себебі, олардың деструкторлық қасиеті жоғары. Ал, өсімдіктер, өз кезегінде оларға биоқабат ретінде әсер етеді: оттегі келуін қамтамасыз етіп, топырақты қопсытуға үлесін қосады [4].

Мұнай өнімдерін ыдыратуға қабілетті микроорганизмдер кез келген топырақ құрамынан табылады. Осыдан келе, тотықтырушы мамандалған арнайы микроорганизмдер болмайтыны белгілі. Мұнай ыдыратушы микроорганизмдердің белсенділігі нәтижесінде мұнай өнімдерінің минерализациясына, органикалық ерітінділерде ери алатын мұнай метаболит өнімдерін түзеді. Мұнай қалдықтарын ыдыратып болған кезде микроорганизмдердің топырақтағы саны артады және қарапайым көпшілік ароматты көмірсулардың ыдырауы жалғаса береді [5-7].

Топырақта ластаушылардың концентрациясы белгілі түрде жоғары (жабайы микрофлора ластаушылардың мөлшерімен күресуге күші жетпейді) немесе төмен (жабайы микрофлора ластаушылардың сапасымен күресуге күші жеткіліксіз) [8].

Ғалымдар мұнай қалдықтарымен ластанған топырақтар биоремедиациясын стимуляциялау үшін бактериялы концориумның бағаларын анықтады, жабайы КТМ саны жоғары болған жоқ (топырақта 103–104 кл/г). Қоректік қоспалармен концориуммен участкілерді залалсыздандыру нәтежиесі жылына көмірсутектердің 89.7–92.0% жойылуына алып келді. Мұнай қалдықтарынан тазалау әр түрлі әдістерін қолдану тиімділігін салыстыру нәтежиесінде авторлар 45–53% мұнай көмірсутегінің жалпы мөлшеріне бактериялы препарат негізінде биоаугментация әдісен мүмкіндік береді. Ғалымдырадың қызығушылығы мұнай және мұнай өнімдерінің эмульдейтін биосурфактант заттар продуцирлейтін мүмкіншілігі бар көмірсутегі микроорганизм деструкторларға көп көңіл бөлінуде. Ластанған топырақта осындай штамдар интродукциясы биоремедиация тиімділігін жоғарлата түседі.

Ластанған жерлердің физико-химиялық сипаттамасы табиғи микрофлораның функцияланудың өсуін мүмкін емес етеді. Мысал ретінде рН экстремальді мағынасын келтіруге болады, табиғи немесе жабайы факторлар әсерінен болған жоғары қышқылдыққа ие көптеген ластанған топырақтар бар. Осындай ластанған участкілер темір шығаратын және көмір өнеркәсіптерінде пайда болады. Осындай жерлерде ацидофильді микроорганизмдер мақсатты түрде бөліп алады, яғни олар мұнай көмірсутегінің деструкциясынына мүмкіншілігі бар биоаугментацияда қолданылады немес температуралық жағдайлар. Қазіргі уақытта мұнайдың психрофильді штамдарының аз емес түрлері белгілі, яғни олар родококкалар[10]. 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. *Pseudomonas* бактериялардың белсенділігі микобактериялар мен артробактериялар алифат көмірсутегілерге қарағанда нашар болады. *Pseudomonas* бактериялар туысының түрлері мұнай көмірсутегілердің ыдырауында маңызы зор болады. Сонымен қатар осы бактериялар аромат көмірсутегілерді ыдырауында үлкен маңызға ие. Осы қосылыстардың активті транспорты жүреді деген тұжырым пайда болады[10].

Көмірсутегін тотықтыратын белсенді микроорганизмдер тек көмірсутегілерді пассивті диффузия жолымен сіңіреді, олар ортада тек сол затпен қанығу жүргенде ғана субстратты ыдырата алады. Бұл деген 0,1% көмірсутегілер бар болған жағдайда артробактериялар, микобактериялар мен оларға туыс бактериялар дами алады. Көмірсутегілердің аз концентрациялар кезінде осы микроорганизмдердің дамуы төмен болады, себебі қажет субстрат аз мөлшерде болады. Осы жағдайларда қозғалмалы бактериялар және хемотаксисі бар микроорганизмдер, олар кометаболизм жағдайында көмірсутегілерді тотықтырады, активті транспортқа ие болады. Мұнай өнімдерін тотығуындағы ең үлкен маңызға экожүйеде *Pseudomonas* бактериялардың туыстары ие [13].

Топыраққа түскен мұнай мен мұнай өнімдері сыртқы ортаның агенттерінің қарқынды әсеріне ұшырайды, осы агенттер мұнай өнімдерін түрлі трансформацияға ұшыратады. Мұнай заттарының биологиялық және химиялық айналымдарды анықтайтын ең белсенді агенттер - күн радиациясы, температура режимдері мен ылғалдылық, топырақтың тұздық құрамы болады. Бірақ, ең маңыздысы болып биологиялық процестердің белсенділігі, әсіресе микробиологиялық болып табылады.

Топыраққа түскен мұнай заттарының әсерінен органикалық заттар құрамының өзгерісі жүреді. Органикалық көміртегінің құрамы 3-4 есе артық болады.

Көміртегінің жалғыз қорегі ретінде көмірсутегілерді пайдаланылуы көптеген микроорганизмдердің негізгі маңызды экологиялық қасиеті болып табылады. Осы қасиет бойынша микроорганизмдер басқа органикалық дүниенің түрлерінен ерекше айрықшалаынады. Мұнайды айналым процесіндегі микроорганизмдердің алатын орны ерекше [7-13].

Мұнай көмірсутегісімен қоректену алатын микроорганизмдер табиғатта кең таралған. Олар көптеген таксономиялық топтарға жатады да, кәдімгі микробты ценоздардың түрлері болып табылады.

## 1.2 Қазақстан мен Ресейдің биотехнологиялық нарығымен танысу

Қазіргі кезде биопрепараттардың кең таңдауы мен оларды қолдану технологиялары белгілі. Препараттардың әсер етуі микробтық культуралардың мұнай және мұнай өнімдеріне қатысты жоғары тотықтыру қасиетіне негізделген [2].

Отандық және шетелдік тәжірибе нәтижесінде тазалауға және ластанған жерлерді рекультивациялауға арналған биопрепараттар шығарылған. ТМД елдерінде белгілі биопрепараттар: Путидойл, Биоприн, Нафтокс, Деворойл, Биосэт, Экойл, Микромицет және т.б.

Дегенмен, олар жайлы егжей-тегжейлі ақпарат жасырын, жарнама деңгейінде өтеді. Сондықтан, препараттардың бір-бірімен және өндіру технологияларын салыстыруды қиындатады. Әдебиеттердегі берілген ақпараттарға сүйене отырып, төменде биопрепараттардың жалпы сипаттамасы көрсетілген.

1 Кесте – Мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған топырақты тазартуда қолданылатын биопрепараттардың жалпы сипаттамасы

№	Сипаттамалар	Сипаттамалардың өзгеру
1	Көмірсутотықтырушы микроорганизмдер	Монокультурадан қауымдастыққа дейін
2	Микроорганизмдер титрі, кл/мл (кл/г)	$2,8 \cdot 10^8$

3	Биопрепараттың формасы	Сұйық, сұйық гель, паста, суспензия, эмульсия, ұнтақ
4	Ластану табиғаты	Мұнай және мұнай өнімдері, керосин, мазут, мұнайдың ауыр фракциялары
5	Ластану дәрежесі	Ластанған қабаттың қалыңдығы < 3 см;
6	Тазалау ұзақтығы	72 сағаттан 4 айға дейін, орташа 2-3 ай
7	pH көрсеткіші	1,5 – 10
8	Температура	3 – 50 <sup>0</sup> С

Көрсетілген салыстырмалы көрсеткіштер бойынша нәтижелер:

- 1) Биопрепараттардың сипаттамалары кең мәнге ие;
- 2) Барлық биопрепараттар тәжірибеде қолданылмайды;
- 3) Биопрепараттардың көбісі полигондық және зертханалық сынаулардан өтуі кезеңінде;
- 4) Биопрепараттардың жарнамасы олар туралы егжей – тегжейлі ақпарат бермейді. Нәтижесінде, оларды таңдау және қолдану қиындығы туындайды.

#### 1.2.1 Биопрепараттар мен бактериялар қауымдастығы

«Нафтокс» биопрепаратының ластанудың жоғары дәрежесінде мұнай ыдырату мүмкіншілігін көрсетті. Ресейлік ғалымдармен осы препараттың жаңа екі түрі шығарылған: Нафтокс 12-Р және Нафтокс 48-У. Нафтокс 12-Р биопрепаратында тотықтырушы бактерия ретінде *Pseudomonas aeruginosa* қолданылды. Ал, Нафтокс 48-У препаратының құрамындағы белсенді бактерия ретінде *Pseudomonas citronelolis* бактерия тандалған. Ластаушылар тұрақты қосылыстар, оларға тиімді жағдай жасалсада микрофлорасы нашар ыдырайды. Мысалы, иммунотоксикалық және канцерогенді әсеріне ие компоненттер мұнай қалдықтары [9]. Мұнай қалдықтарында популяция тығыздығы және микроорганизмдердің көміртегі тотықтырғышының метаболиттік белсенділігі өте төмен, сондықтан осы жерде биоаугментация қажет. Авторлар «Нафтокс» бактериальді препаратын қолдана отырып, әр түрлі қоймалардың рекультивациясын сипаттады.

Мұнаймен қатты ластанған аймақтарда осы микроорганизмдер көп кездеседі. Ашық мұхит суының құрамындағы мұнай өнімдерінің, осы микроорганизмдер мен көмірсутегі концентрациясы арасында корреляция байқалмайды. Бірақ, Командор аралында көмірсутегін тотықтыратын микроорганизмдер саны көп анықталған, осы сулардың құрамында мұнай өнімдері мүлдем жоқ, бірақ олар жануар мен өсімдік табиғатты органикамен байытылған. Осылайша, мұнаймен ластанудың нағыз көрсеткіші болып көмірсутегін тотықтыратын бактериялар болып табылады, бірақ осы

микроорганизмдер санының көп болуы ластанудың көрсеткіші болып табылмайды [11].

Сонымен қатар, аса мұнаймен ластанған аудандарда көмірсутегін тотықтыратын бактериялар саны, таза аудандарға қарағанда төмен болуы мүмкін. Көмірсутегін тотықтыратын бактериялар санының артық болуы көмірсутегілермен ластану көрсеткіші болмайды, ол тек табиғи экожүйенің сапалы деңгейде өзін-өзі қарқынды тазарту процесін көрсетеді [11].

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 [12].

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<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) *Pseudomonas*, *Rhodococcus* туыстарына жататын бактериялар мен кейбір ашытқылармен сіңіре алады [12].

*Aspergillus amstebodami* және *Rhodococcus* туысының түрлері: *R.erytropolis*, *R.luteus*, *R.maris* мұнайдың вазелин майында және C<sub>10</sub>-C<sub>16</sub> н-алкандарда өсіп, көміртегі мен энергияның жалғыз көзі ретінде пайдаланады.

Аромат сақинасының құрамында түрлі хлорлы заттарды дехлорлау қабілеті бар топырақ микрофлорасы бар. Микробты әсер етуге тұрақтылық дәрежесі, хлорлану дәрежесінің артуымен өседі. Хлораромат қосылыстардың толық және тез деграциясы жақсы аэрацияланатын топырақ аймақтарында жүреді. Ал анаэробты жағдайларда деграция процестері жүру мүмкін, бірақ оның жылдамдығы әлдеқайда төмен болады. Анаэробты дехлорлау үшін топырақта жеңіл ыдырата алатын органикалық заттар болу қажет [12].

Алифат көмірсутегілер мен мұнай өнімдерін тотықтыру қабілетіне негізінен *Mycobacterium* және *Arthrobacter* туысының түрлері ие [14].

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 [14].

Микробактериялар мен псевдомонадалар табиғатта және мұнаймен ластанған аймақтарда кең таралған, осы аймақтарда олар көмірсутегілердің активті ыдыратушылары болып табылады [15].

*Mycobacterium mucosum* және *Pseudomonas aeruginosa* микроорганизмдері үшін ең қолайлы болып тізбегінің ұзындығы 14-18 көміртегі атомдарынан тұратын n-алкандар жатады. Осы бактериялардың саны таза дақылда 1,5 есе артық болады. N-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 липофильді қабырғасы жоқ псевдомонадалар үшін бұл жағдай өте маңызды себебі, ол гидрофильді субстратпен әрекеттесу бетін жеңілдетеді [15].

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 [16].

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 [16].

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 n-алкандар. Қарапайым полициклды аромат көмірсутегілердің бөлшектік дергадациясы жүреді.

Мұнайдың биоыдырауынан кейін көміртегін тотықтыратын бактериялар саны одан сайын артады, ол біріншідегі санынан әлдеқайда артық болады. Осы кезде қарапайым полициклды аромат көмірсулардың ыдырауы жалғаса береді,

осының нәтижесінде n-алкандардың саны қайтадан артады. Тотықтыратын жағдайлар пайда болады, ол ауыр полициклды аромат көмірсутегілердің ыдыратуы үшін қолайлы жағдайларды қалыптастырады [19].

Бактериялар ең жақсы n-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 көмірсутегін өзіне сіңіру қабілеті азаяды. Октан және гексан 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 көмірсутегі бар орталарда ғана жүзеге асады.

Осылайша, көмірсутегілер бар микроорганизмдер клеткаларында олардың клетка қабыршағы үлкен маңызға ие болады, ол көмірсутегілермен тікелей қатынас орнатылады [16]. 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 [20].

*Pseudomonas* бактериялардың белсенділігі микобактериялар мен артробактериялар алифат көмірсутегілерге қарағанда нашар болады. *Pseudomonas* бактериялар туысының түрлері мұнай көмірсутегілердің ыдырауында маңызы зор болады. Сонымен қатар осы бактериялар аромат көмірсутегілерді ыдырауында үлкен маңызға ие. Осы қосылыстардың активті транспорты жүреді деген тұжырым пайда болады.

Мұнай тотықтырушы микроорганизмдердің максималды белсенділігі судың 15 - 35 С температурасында байқалады. Температура азайғанда тотығу қарқындылығы бірден төмендеп кетеді.

Мұнай тотықтырушы микроорганизмдердің сорбент иесі ретінде тазарту құрылғыларының кептірілген балшық негізіндегі бейорганикалық тыңайтқыш-Бамил зерттелген [20].

Микробиологиялық анализдің көрсетуі бойынша мұнай тотықтырушы микроорганизмдердің біршама бөлігі ластанған топырақтың 3 - 7x10<sup>7</sup> кл/г жоғарғы қабатындағы (20 см) стимуляциясы зерттелініп отырған топырақта мұнай өнімінің деградация процесін жылдамдата алады.

Өнеркәсіптік қалалардан төмен бөлікте мұнай-тотықтырушы микроорганизмдер саны 1-ге және тіпті 2-ден 3-ке дейін көбейіп, 1 мл-ге 10<sup>2</sup>-ден 10<sup>3</sup>-ке дейін жетеді деп анықталды.

Ол үшін топырақ жағдайында мұнай-тотықтырушы микроорганизмдердің табиғи штамдарын белсендіруді қамтамасыз ететін жағдайлар жасалуы керек.

Топырақ микроорганизмінің өмірлік белсенділігін белсендіру және қолдану арқылы, сондай-ақ мұнай тотықтырушы микроорганизмдерден тұратын



арнайы биологиялық өнімдерді енгізу арқылы биологиялық қалпына келтіру ең перспективалы және экологиялық қауіпсіз болып табылады. Оның агрохимиялық және агротехникалық шаралармен үйлесімде қолданылуы олардың жалпы тиімділігін күрт арттырады.

Қалпына келтіру жұмыстары тәжірибесінде топырақ микроорганизмдерінің өмірлік белсенділігі және құрамында мұнай тотықтырушы микроорганизмдері бар арнайы биопрепараттар есебінен жүретін биологиялық қалпына келтірудің әдістері жеткілікті емес және эффективті түрде енеді. Бұл әдістер агрохимиялық және агротехникалық шаралармен үйлесімде жақсы нәтиже береді, бірақ, өкінішке орай, әрқашан қолданылмайды. Солтүстіктегі жағдайда биологиялық қалпына келтіруді қолданудағы сәтсіздіктер осы әдістердің төменгі ендікке қолданылмайды дегенді білдірмейді.

Техникалық кезеңде мұнайдың ағып кетуі, жарық фракцияларының булануы және ішінара бұзылуы, топырақ бетіндегі мұнай компоненттерінің фотооксидациясы, микробиологиялық қауымдастықты қалпына келуі, мұнай-тотықтырушы микроорганизмдерді дамыту, топырақ жануарларының қауымдастығын ішінара қалпына келуі жүреді.

Компоненттердің бір бөлігі топырақтың су-ауа режимін жақсартатын қатты өнімдерге айналады.

Техникалық кезеңде газ конденсатының төгілуі, булану және оның жеңіл фракцияларының ішінара бұзылуы, топырақ бетіндегі мұнай компоненттерінің фотосинтезі, микробиологиялық қауымдастықты қалпына келуі, мұнай-тотықтырушы микроорганизмдерді дамыту, топырақ жануарлары қауымдастығының біртіндеп қалпына келуі жүреді.

Компоненттердің бір бөлігі топырақтың су-ауа режимін жақсартатын қатты өнімдерге айналады. Топырақтың аэрациясы мен ылғалдануы осы процестерді күшейтуге, газ конденсатын және метанол концентрациясын төмендетуге және осы концентрацияның неғұрлым біркелкі үдерісіне айтарлықтай үлес қосады.

Жоғарыда айтылғандардан микроорганизмдердің иммобилизациясы үшін оңтайлы адсорбенттерді таңдау оларды қолданудың тиімділігін айтарлықтай арттыра алады. Бұл әртүрлі тасымалдаушыларда иммобилизацияланған мұнай-тотықтырушы микроорганизмдермен мұнай мен мұнай өнімдерінен суды биологиялық тазалауды күшейту әдістерін дайындау кезінде ескерілуі тиіс [20].

Мұнай тотықтыратын микроорганизмдерді иммобилизациялау үшін тасымалдаушылар ретінде он бес адсорбент зерттелген. «Деворил» препараты әртүрлі кластардың көмірсутектерінде және олардың туындыларында өсетін, жоғары тұздылыққа (150 г / л NaCl-ге дейін) төзімді, температураның күрт ауытқуына - 5-тен + 40 ° C-ға дейін, кең көлемде рН (4,5-тен 9,5-ке дейін) белсенділігі, 5% -дан астам мұнаймен ластану қарқындылығында өсуге бейім ашытқы микроорганизмдер мен бактериялардың *Rhodococcus sp.*, *Rhodococcus maris*, *Rhodococcus eritropolis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Candida sp.* негізінде алынған.

Препарат өндірушілердің айтуынша, «Деворойл» препаратын қолданудың жоғары тиімділігі дәрілік заттардың құрамында лиофильді және гидрофильді микроорганизмдер: бактериялар, С49-С430 көміртек тізбегінің ұзындығы бар май алкандарын тотықтыру және ароматты қосылыстар, атап айтқанда фенол, крацол және пирокоатин; майдың тотығу белсенділігімен ерекшеленетін және аминқышқылдары, витаминдері және беттік белсенді заттарын босатуға қабілетті ашытқылардың болуында. Топырақтың биоценозының басқа өкілдері, бактериялардың өмірлік белсенділігінің өнімдері және өлетін бактериялардың жасушалары биоценоздың сапрофитті микрофлорасы арқылы оңай ассимилирленеді. Ғалымдар мұнай мен оның компоненттерін бөлшектеуге қабілетті тиімді мұнай-тотықтырушы микроорганизмдерді бөлу бойынша үнемі жұмыс жасайды. Қазіргі уақытта мұнаймен ластанған ортаны тазарту үшін бактериялардың штамдары жеткілікті, мысалы, *Flavebacteril tirenicum* VKPM B-3369 бактерияларының штаммы [21].

Биосурфактанттар (биоББЗ) – беткейлік белсенді заттар, микроорганизмдерді продуцирлейтін заттар болып табылады. Химиялық құрылымы бойынша биосурфактанттар әр түрлі полярлы беткейлік байланысы бар, гидрофобты және гидрофильді бөліктерден тұратын жоғары және аралық созылуды төмендететін амфифильді молекуланы көрсетеді [36]. Соңғы жылдары бойынша биосурфактанттарға зерттеу жұмысын жүргізу микробиологтар, биохимиктер және биотехнологтарға өте үлкен қызығушылық тудырып отыр, өйткені БиоББЗ өзінің беткейлі белсенді қасиеті жағынан синтетикалық аналогтарынан орын бермейді, осыған байланысты олар биодеградациялық қасиетімен сипатталады, экстремальді жағдайларда тұрақты белсенділігі, токсикалылығы (температура, рН, тұздардың болуы) [22].

Биосурфактанттар биотехнологияда жаңа өнім екендігіне қарамай, оларды әр түрлі өнеркәсіптік аймақтарда қолданудың жолын тапты (химиялық, фармацевтика, тағамдық), экологияда мұнаймен ластанған жерлерді тазарту үшін қолданылады.

Молекулярлық массасы бойынша биосурфактанттарды екі топқа бөледі. Бірінші топқа төмен молекулалы биосурфактанттар жатады (гликолипидтер, май қышқыл, фосфолипидтер, липопептидтер), олар тұрақты эмульсияның пайда болуына мүмкіншілігі бар, жоғары беткейлік заттар және аралық фаза белсенділікке ие. Екінші топқа жоғары молекулярлық полимерлі сурфактанттардан тұрады (полисахаридтер, протеиндер, липопротеиндер, липосахаридтер), олар төмен концентрацияда әр түрлі беткейліктерде тиімді адсорбциялана алады. Прамнолипидтер, софоролипидтер, маннозилэритритоллипидтер, трегалолипидтерге жататын гликолидті биосурфактанттар БиоББЗ көп таралған титерін зерттеу үлкен қызығушылық тудырады. Трегалоллипидтар продуценттеріне *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Norcadia*, *Gordonia*, *Anthrobacte* туыстары жатады [22-23].

Трегалоллипидтер созылмалы ортаның беткейлік бөлігін тиімді төмендетеді және жоғары эмульгациялайтын белсенділікке ие. Олар мұнай өндіру және қоршаған ортаны қорғау биотехнологиясында өзінің қолданылуын тапты.

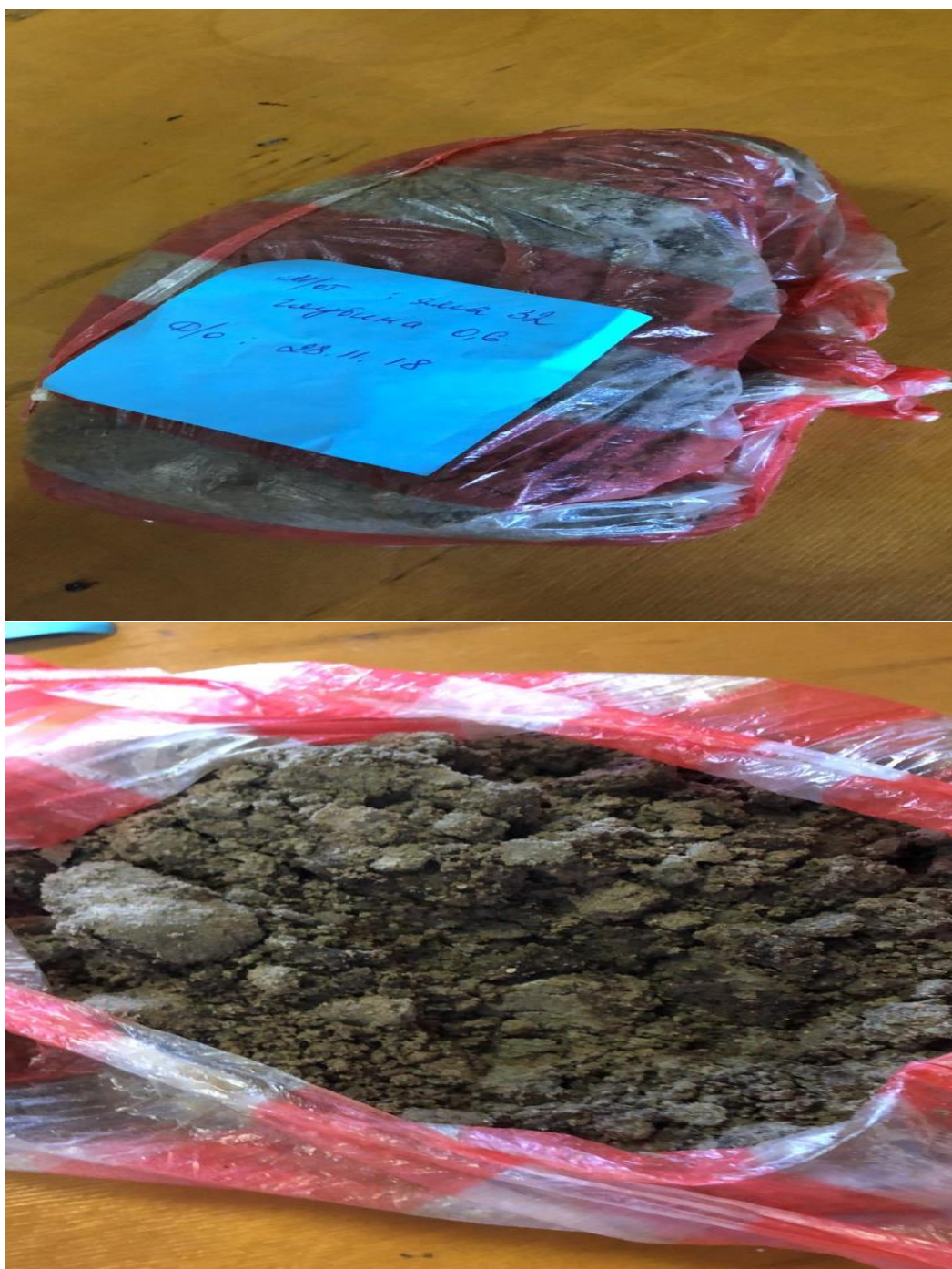
Трегалоллипидтер фосфолипидті мембранамен әсерлесу кезінде биологиялық белсенділікті көрсетеді және белоктық әсерлесу кезінде гемолитикалық қасиетке ие, адамның ісік клеткаларының дифференциациясына әсерін тигізеді, яғни медицинада өзінің мағыналы потенциалына ие. Мысал ретінде суды тазалауда микроорганизмдердің таза культураларын толық ғылыми құрастырылумен микробиологиялық барлық М.М. Ротмистрова жұмыстарынан, гексаметилендиамин ыдыратушы бактериялар бойынша С.С. Ставской жұмыстарынан байқауға болады [24].

Иммобилизацияланған *Escherichiacoli*, *Pseudomonasputida*, *Staphylococcus aureus* Са-альгинатта фенол тиімділігін белгілі түрде төмендетеді [25].

## 2 Материалдар мен әдістер

### 2.1 Қолданылған материалдар

Бұл жұмыста Атырау облысы, Атырау қаласында орналасқан «Матен Petroleum» АҚ зертханасында ұсынылған мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған топырақ сынамалары қолданылды (1 Сурет).



1 Сурет – Мұнаймен ластанған топырақ сынамасы

## 2.2 Қолданылған қоректік орталар

Мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған топырақ сынамаларынан бактерияларды бөліп алу үшін қарапайым эмбебап ЕПА және Ворошилова – Дианова (ВД) сұйық қоректік ортасы қолданылды. Сонымен қоса, синтетикалық Е8 қоректік ортасы қарастырылды. Кәсіпорын жетекшілері ЕПА мен ВД қоректік ортасын қолдануға тоқталды.

ЕПА қоректік ортасын дайындау өте оңай болды. Себебі, дайын ет-пептонды агардың ұнтағы қолданылды. Ол ұнтақ құрамында қажетті микротүздар мен макроэлементтер бар. Ет-пептонды агар ұнтағының қаптамасында 1 л қоректік орта дайындау үшін 33 г ұнтақ қолдануы тиіс екені жазылған.

ЕПА қоректік ортасын дайындау үшін магниттік араластырғыш ыдысқа 1 л дистилденген су құямыз. Үздіксіз араласып тұрған суға 33 г ет-пептонды агардың ұнтағын қосамыз. Алынған массаны қайнау жағдайына дейін жеткіземіз. Ол үшін жылытушы плита қолданылды. рН көрсеткіші 7,5-ке келтірілді. Дайын ортасы бар колбаның аузын тығындап, автоклавта 20 минутқа стерилдеу үшін саламыз.

Екінші дайындалған орта – ВД қоректік ортасы. Бұл орта агарсыз сұйық орта болып дайындалды. 1 л мөлшерде алу үшін келесі компоненттер қолданылды (г/л): NaCl – 10,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,0; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> – 1,0; MgSO<sub>4</sub> – 0,2; CaCl<sub>2</sub> – 0,02. рН көрсеткіші 7,0-7,2-ге келтірілді. Дайын ВД ортасын автоклавта 20 минут бойы стерилденді.

## 2.3 Қолданылған әдістер мен құралдар

### 2.3.1 Қажетті құрал- жабдықтар

Жұмыс барасында қолданылған құрал - жабдықтар мен реагенттер «Maten Petroleum» АҚ зертханасымен ұсынылды.

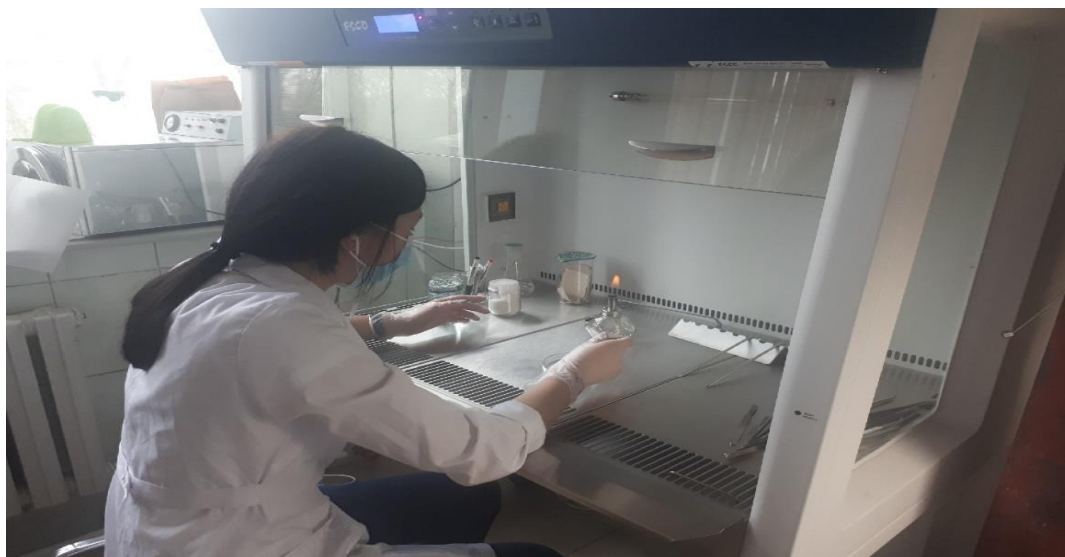
Бірінші қажетті ыдыстарға Петри табақшалары, термотұрақты колбалар және пробиркалар, өлшеуші цилиндрлер жатқызылды. Оларды қолданар алдында жудық және стерилизацияладық. Стерилдеу үшін қолданылды:

- 1) Жуып болған соң, құрғақ кептіргіш шкаф;
- 2) Қолданар алдында, ыдыстарды автоклавта 121<sup>0</sup>С стерилдеу.

Культураны өсіру үшін термостат және тербелмелі сөрелер қолданылды. Жасалынған қоректік орталардың рН көрсеткішін өлшеу үшін рН-метрлер қолданылды. Микроскоптау жұмыстары үшін Micros Austria 700 жарық микроскобы қолданылды. Бұл микроскоптың компьютерге қосылу өткізгіштері бар, нәтижесінде микроскоптан көрген бейнелер суретке түсірілді.

Негізгі жұмыстар ламинарлы бокста жүргізіледі (2 сурет). Жұмыс алдында ламинарлы боксты қосып қоямыз. Ультракүлгін сәуле лампасын қосамыз. Бұл ламинарда ультракүлгін сәулесі автоматты түрде 20 минут өткен кезде

өшіріледі. Содан соң сақтандырғыш әйнекті көтереміз. Жұмыс алаңын 70 пайыздық этил спиртімен сүртіп залалсыздандырамыз. Қажетті инструменттерді сол спиртке шайып, сосын арнайы стерилизаторда қыздырамыз.



2 Сурет – Бактериялық ламинарлы бокс

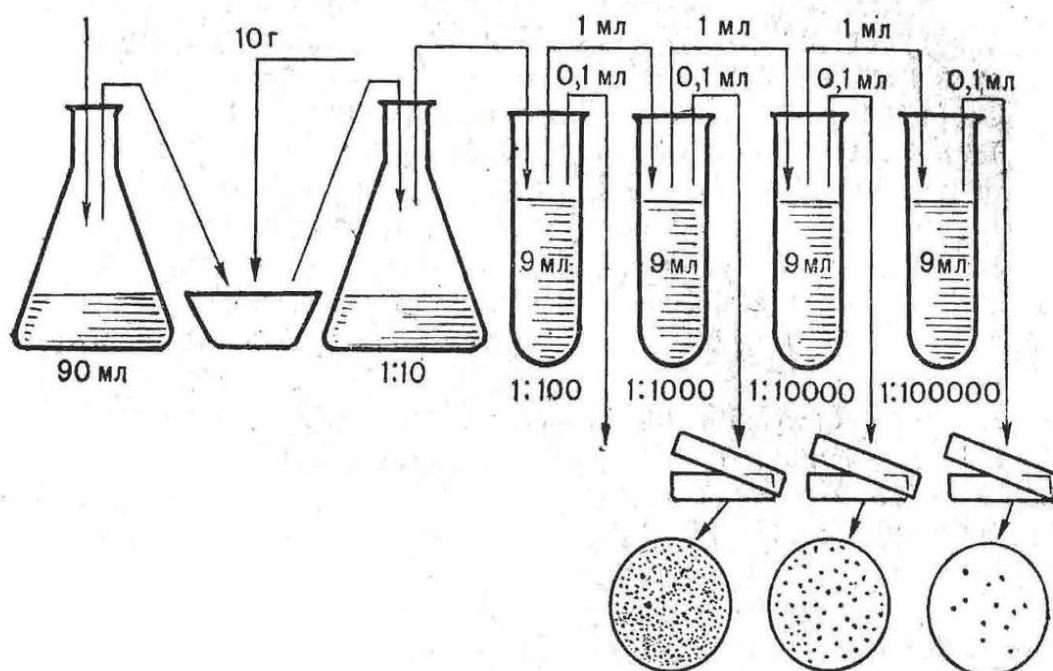
### 2.3.2 Топырақ сынамасынан таза дақылды алу

Мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған топырақ құрамында деструкторлық қасиеті бар бактерияларды анықтау үшін оларды жалпы микрофлора құрамынан бөліп алу керек. Таза дақыл алынған соң, олардың физиологиялық және биохимиялық қасиеттерін бағалауға болады. Таза дақылды бөліп алу: жиынтық дақылды алу, таза дақылды алу және дақылдың тазалағын тексеру кезеңдерінен тұрады.

Таза дақыл алуда Кох ұсынған сұйылту әдісі қолданылады. Ол үшін ластанған топырақ сынамасын дистилденген суда ерітеміз. Қосымша стерилденген 9 пробирка дайындаймыз. Әр пробиркаға 9 мл дистилденген судан құйып шығамыз. Бастапқы топырақ сынамасы ерітілген субстраттан пипеткамен мөлшері 1 мл зерттеу затын бірінші пробиркаға құяды. Бірінші сұйылтудан тағы 1 мл пипеткамен алып, екінші пробиркаға құямыз. Осылай ретімен қайталанады (3 Сурет).

Ары қарай ЕПА ортасы бар Петри табақшаларына 0,05 мл сұйытылған суспензияны пипеткамен тамызады. Оны Дригальский шпательмен қоректік орта бетіне жаяды. Ол үшін шпательді спиртшам жалынында қыздырып, стерильдеп алады. Қатты ыстық шпательді суыту үшін, Петри табақшасының қақпағының ішкі жағынан жүргізуге болады. Ескеретін жағдай, ЕПА бар Петри табақшаларына отырғызу жұмыстарын спиртшам жалының қасында немесе ламинарлы бокста жүргізу қажет. Яғни, бұл жасалынған жұмыс қатты қоректік орталарға беттік егу әдісі болып табылады.





3 Сурет – Кох бойынша оң еселік сұйылту әдісі

Егінді материал егіліп болған соң, ауа конденсаттарының қоректік ортаны бұзбас үшін, Петри табақшаларын төңкерілген күйі  $33^{\circ}\text{C}$  термостатқа 24 сағатқа саламыз.

Тәулік өткен соң Петри табақшасында өсіп шыққан микробтық колонияларды көреміз. Арасынан бір колонияны таңдаймыз. Оны спиртшам жалыныңда стерилденген тұзақпен ойып аламыз да, жаңа қоректік ортаға штрихтап отырғызамыз. Петри табақшаларын жауып, төңкерілген күйінде  $33^{\circ}\text{C}$  термостатқа 24 сағатқа саламыз.

### 2.3.3 Алынған бактериялардың морфологиялық қасиеттерін анықтау

Бөлініп алынған микробтық колонияның морфологиялық қасиеттеріне:

- 1) Бактерия жасушасының пішіні;
- 2) Жасушаның мөлшері;
- 3) Жасушаның орналасуы;
- 4) Капсуланың болуы;
- 5) Спора түзуі;
- 6) Қозғалғыштығы;
- 7) Грам әдісімен боялуы жатады.

*Жасушалардың көлемін және орналасуын зерттеу тәсілдері.* Бактериялар – бір жасушалы ағзалар, көлемі бойынша үш топқа бөлінеді: дөңгелек, таяқша және иілген таяқшалар. Таяқша секілді микробтардың жасушаларының көлемі

олардың орналасуы және спора түзу қабілеттері арқылы ажыратылады. Олар әр түрлі жасушалар және тізбек ретінде орналасуы мүмкін. Жасушалардың пішінін «Жаншылған тамшы» препараты арқылы, ал майда бактерия жасушаларының пішіндерін боялған препаратпен зерттейді.

Жасуша көлемін микроскоп көмегімен анықтайды. Өлшеу үшін тірі жасушаларды қолданған жөн, себебі бекіту және бояу әдістері олардың көлемін өзгерте алады. Бұл жұмысты объективті микрометр арқылы жасайды. Объективті микрометр ортасында тесігі бар және ол жерде әйнек орнатылған металды пластина. Әйнекке ұзындығы бір метр сызғыш сызылған, ол тура 100 бөлшекке бөлінген. Сол себепті бір бөлімі 0,01 мм немесе 10 мкм сәйкес болады.

*Микроорганизмдердің жасушаларының қозғалысын анықтау.* Жасушалардың қозғалысын арнайы оймақшасы бар заттық шыныда «ілінген тамшы» немесе қарапайым заттық шынымен «жаншылған тамшы» препараттары арқылы байқауға болады. Жаншылған тамшы препаратымен қозғалғыштығы анықталады. Жаншылған тамшы препаратын дайындау үшін заттық шыны бетіне тамшы су тамызамыз. Тұзақпен Петри табақшасынан микроб бөлігін аламыз. Тамшы суда айналдыра жағамыз. Бетіне жабынды шыны жабамыз.

*Бактериялардың спора түзу қабілетін анықтау (Ожешко тәсілі).*

Бактериялардың споралары вегетативті жасушаларға қарағанда табиғаттың зиянды және жағымсыз факторларына жақсы төзімділік қасиет көрсетеді. Бұлар дөңгелек, сопақ және эллипске ұқсас түзінділер. Бактерия спора түзу қабілетін анықтау кезінде Ожешко тәсілі пайдаланылады. Бұл кезде майсыздандырылған заттық шыныға бактериялды дақылдың тамшысын енгізіп фиксирлейді және ауа арқылы кептіреді. Кепкен препараттың үстіңгі бөлігіне 0,5 % тұз қышқылын тамызып, екі минут бу пайда болғанша от жалынында қатты қыздырады. Тұз қышқылын сумен шаяды және препаратты жуады, фильтр қағазымен жауып үстіне Циль фуксин тамызып жеті минут бойы от жалынында бу пайда болған уақытқа дейін ұстайды. Препарат кеуіп кетпеуі үшін үстіңгі бетке бояу тамызу қажет. Бояудың сіңуі фильтр қағазының кеуіп кетпеуіне өз ықпалын тигізеді. 7 минут өткен соң препаратты суытып және фильтр қағазын алып, сумен жуып тастайды. Осындай өңдеудің қорытындысында жауша спорасы нақты боялады. Бұдан өте жасуша цитоплазмасын түссіздендіру жұмыстарын жүргізу қажет. Бұл кезде 1 % тұз қышқылы не күкірт қышқылымен 15-30 секунд аралығында өңдеу керек. Өңделген препаратты сумен жуып, қосымша метилен арқылы екі минут бояйды. Препарат барлық ережеге сай істелген жағдайда спора қанық қызыл, цитоплазма көк түске боялады [26].

Петри табақшасында өсіп шыққан колонияларды идентификациялау үшін оны Грамм тәсілі бойынша бояймыз. Бұл бастапқы идентификациялау болып табылады. Грамм бойынша бояу әдісі микробтардың формаларын көруге мүмкіндік береді. Ол микробтық жасуша қабырғасының ультрақұрылымына байланысты әсер етеді. Грамм тәсілімен бактерияларды бояуды дат микробиологы Грамм (1884 ж.) ұсынды. Бұл әдіс бойынша барлық бактериялар екі топқа бөлінеді: грамм оң және грамм теріс. Грамм оң бактериялар препаратты спиртпен өндегенде көгілдір бояудың люголь ерітіндісімен қосындысын ұстап қалып, көгілдір түске



боялады. Фуксинмен бояған кезде қызыл түсті қабылдамайды. Грам теріс бактериялар бұндай қабілетке ие емес: спиртпен өндегенде түссізденеді. Фуксинмен бояғанда ашық қызыл түстерге боялады [26].

Грамм тәсілі бойынша бояуды жүргізу үшін бекітілген, кептірілген препарат жасаймыз. Ол үшін табақшадан спиртшам жалынында стерилденген тұзақпен микробтық колонияны ақырындап аламыз. Алдын ала стерилденген заттық шыныға бір тамшы су тамызып, сол тамшыға тұзақтағы микроб колониясын эллипс формасында жағамыз. Жұғындыны бекіту үшін спиртшам жалынында кептіреміз. Содан соң жұғындыны келесі тәртіп бойынша бояймыз [26]:

- Жұғынды үстіне кристаллды көгілдір бояуын тамызамыз. 2 минут күтеміз. Бояуды төгіп тастаймыз;

- Көгілдір бояуы бар жұғынды үстіне Люголь ерітіндісін тамызамыз. 2 минут күтеміз;

- Препаратқа этил спиртің тамызып, 30 секунд өндейміз. Нәтижесінде түссізденеді;

- Препаратты бояулар кеткенше сумен шаямыз;

- Цильдің фуксин бояуын тамызамыз. 2 минут күтеміз;

- Сумен шайып тастаймыз;

- Препаратты спиртшам жалынында кептіріп, микроскоппен қараймыз.

#### 2.3.4 Алынған бактериялардың культуралдық қасиетін анықтау

Микроағзалардың культуралдық қасиеттерін зерттеу кезінде пайдаланған сұйық орталарда өсу ерекшелігі сипатталады. Сонымен қатар қатты қоректік орталарда өскен колониялардың мөлшері мен құрылымы сипатталынады.

Қатты қоректік ортаның беткі жағында өскен кезде микроағзалардың бір түріне сай колониялар түзіледі. Колонияларды сипаттау кезінде мынадай белгілерге назар аударылады:

- 1) Колония пішіні (домалақ, амёбоидты, ризоидты, жіпшелі, қатпарлы және т.б.);

- 2) Колония көлемі – мм-мен өлшенеді, егер колония мөлшері 1 мм-ден аспайтын болса онда мұндай колониялар нүктелі деп аталады;

- 3) Оптикалық қасиеті (мөлдір, мөлдір емесі флуорисцентті);

- 4) Колония түсі (колония түсімен ортаға пигменттің бөлінуі);

- 5) Колония беті (тегіс, бұлдыр, қатпарлы, төмпешікті);

- 6) Колония бейнесі (жалпақ, шығыңқы және т.б.);

- 7) Колония шеті (тегіс, иректелген, тішелі, кірпікшелі, жіпшелі, бұтақталған және т.б.);

- 8) Колония құрылымы (біртекті, ұсақ дәнді, ірінді дәнді, жіпшелі);

- 9) Колония консистенциясы (майлы, қамыр тәрізді, езілмелі жарғақшалы).

Микроорганизмдер сұйық ортада өсірілгенде, қоректік орта лайланады, нәтижесінде тұнба түзіледі. Сұйық қоректік ортада өсуін сипаттаған сәтте ең бірінші оның қарқындылығын көрсетеді. Ортаның лайлануы бір қалыпты үлпек

тәрізді немесе иректелген болуы мүмкін. Алайда беткі бөлігінде жұқа қабық пайда болса оның ерекшеліктері сипатталады. Мысалы, сақина секілді немесе жайылған, жұқа немесе қалың, тығыз немесе борпылдақ, тегіс немесе қатпарлы, құрғақ немесе шырышты. Тұнбаның қасиеттеріне аз немесе көп, борпылдақ, тығыз, үлпек тәрізді, дәнді немесе шырышты. Сұйық лайлану – әлсіз, орташа немесе күшті болып бөлінеді. Қабықша ерекшелігін – жұқа, тығыз, тегіс немесе қатпарлы болып анықталады. Ал тұнба түзілу уақытында оның молдығын, тығыздығын, шырыштылығын немесе жұмсақтығын анықтайды.

### 2.3.5 Алынған бактериялардың деструкторлық қасиеттерін анықтау

Алынған бактериялардың мұнай деструкторлаушы қасиеті ВД қоректік ортасы құрамына 10% мөлшерінде «Maten Petroleum» зертханасы ұсынған мұнай қосу арқылы анықталды. Жалпы 250 мл термотұрақты Эрленмейер колбаларын 3/1 бөлігінде толтырдық. 80 мл-ден ВД қоректік ортасы бар екі колба дайындалды. 20 минут автоклавта стерилденді.

Деструкторлық қасиетін анықтау алдында алдымен қажетті бактерия биомассасы қажет. Ол үшін қайтадан ЕПА ортасы дайындалды. Автоклавта стерилдеуден өтіп, дайын Петри табақшаларына құйылды. Термостатқа 33<sup>0</sup>С бір тәулік қойылды.

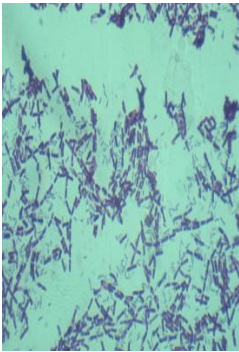
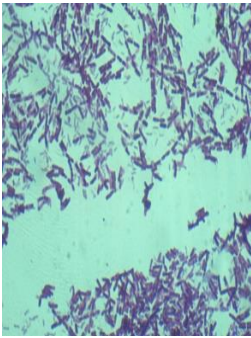
Петри табақшаларынан диаметрі 3 мм болатын тұзақпен ақырын алып, ВД агарсыз қоректік ортасы бар колбаларға енгізіледі. Әрбір колбаға 10% пайыздық мөлшерінде мұнай құйылды. Колбалар шайқағыштарға қойылды, минутына 220 айналымға қойылды.

### 3 Зерттеу нәтижелері

#### 3.1 Алынған таза дақылдардың морфологиялық қасиеттерін сипаттау

Атырау қаласы «Maten Petroleum» зертханасында ұсынылған мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған топырақ сынамасының құрамынан *Bacillus sp.* түріне жататын бактериялардың таза культураны алынды. Олар *Bacillus sp. №1* және *Bacillus sp. №2* штамдары ретінде белгіленді. Олар жоғарыда айтылып кеткен параметрлер бойынша морфологиялық қасиеттері қарастырылды (2 Кесте).

2 Кесте – Анықталған культуралардың морфологиялық қасиеттері

№	Культуралар	Формасы	Қозғалғыштығы	Спора	Капсула	Грам әдісімен боялуы
1	<i>Bacillus sp. №1</i>	Диплобациллалар	–	+	+	
2	<i>Bacillus sp. №2</i>	Тізбектелген стрептобациллалар	–	+	+	

*Bacillus sp. №1* және *Bacillus sp. №2* бактерия культураларының морфологиялық қасиеттері – бактерия жасушасының көлемі, жасуша мөлшері, жасушаның орналасуы, капсуланың болуы, спора түзу қабілеті, қозғалғыштығы, грам тәсілімен боялуы жатады.

2-кестеден байқағанымыздай *Bacillus sp. №1* штамы – спора және капсула түзуге қабілетті, қозғалмайтын, грам оң диплобациллалар болып табылады. *Bacillus sp. №2* штамы - спора және капсула түзуге қабілетті, қозғалмайтын, грам оң тізбектелген стрептобациллалар болып табылады.

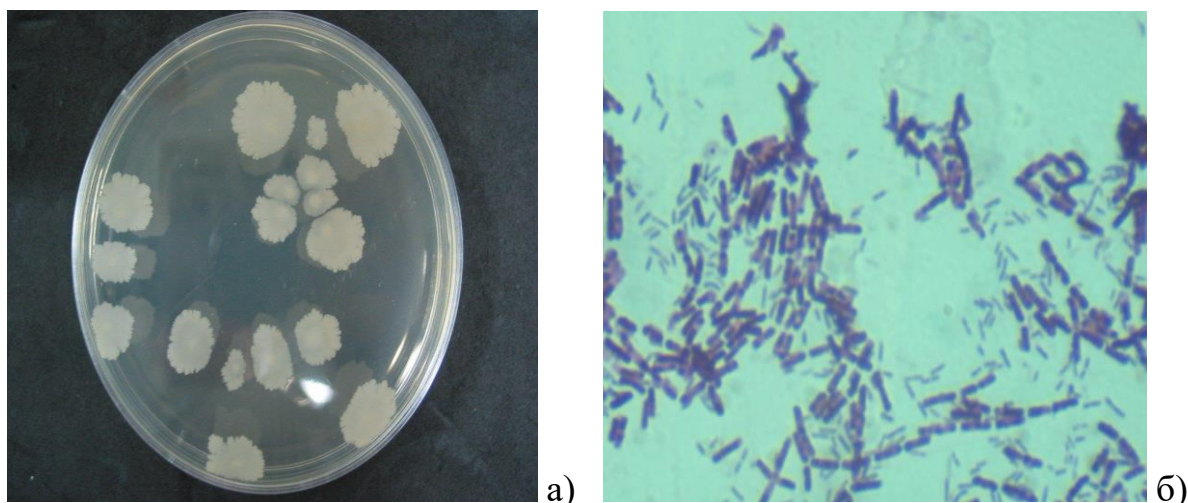
### 3.2 Алынған таза дақылдардың культуралдық қасиеттерін сипаттау

Гетеротрофты бактериялардың культуралдық қасиеттеріне жасуша пішіні, мөлшері, беті, мөлдірлігі, түсі және колония шеті бойынша сипатталады. Культуралдық қасиеттерін қатты қоректік ортаға егу арқылы анықталады (3-кесте).

3 Кесте – Алынған бактериялардың культуралдық қасиеттері

Культура	Колония пішіні	өл-шері	Беті	Мөлдірлігі	Түсі	Шеті
<i>Bacillus sp. №1</i>	Дөңгелек	мм	Тегіс	Лай түстес	Ақшыл	Толқынды
<i>Bacillus sp. №2</i>	Солпақтау дөңгелек	мм	Тегіс	Жарқыраған	Ақ	Тегіс

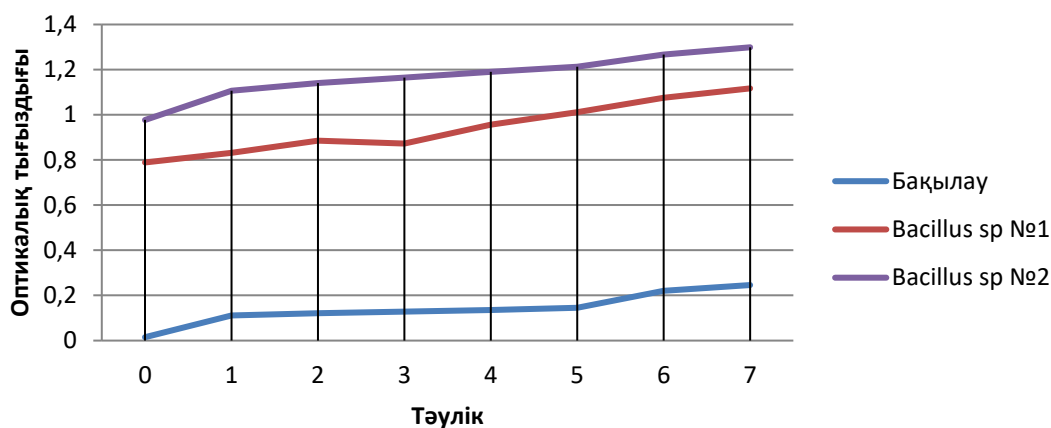
3-кестеден көрсетілгендей зертханада ұсынған ластанған топырақ сынамасынан алынған *Bacillus sp. №1* штаммының колония пішіні – дөңгелек, мөлшері – 2 мм, беті – тегіс, мөлдірлігі – лай түстес, түсі – ақшыл, шеті – толқынды. *Bacillus sp. №2* штаммының жасуша пішіні – солпақтау дөңгелек, мөлшері – 3 мм, беті – тегіс, мөлдірлігі – жарқыраған, түсі – ақ, шеті – тегіс болып келеді. Петри табақшасындағы өсіп шыққан колониялар кара фонда, ұялы телефон камерасына суретке түсірілді (4 сурет).



4 Сурет – Алынған бактериялардың морфологиялық қасиеті:  
(а) бактериялардың колония түзуі; (б) бактерия клеткаларының грам бойынша боялуы

### 3.3 Іріктелген культуралардың мұнай деградациялау қасиетін бағалау

Алынған таза культуралардың мұнай деградациялау қасиетін анықтау үшін оларды құрамында мұнай пайыздық үлесі бар орталарда өсірдік. Ол үшін әр штамға 80 мл болатын стерилденген ВД агарсыз қоректік ортасын, таза 250 мл Эрленмейер колбаларына құйдық. Жалпы ішінде биомассасы бар 2 колба болды. Колбаларға мұнайды 10% пайыздық мөлшерде құйдық (5 Сурет).



5 Сурет – Алынған культуралардың құрамында 10% мұнайы бар ВД ортасында өсу жылдамдығы

Алынған культуралардың құрамында 10% мұнайы бар ВД ортасында өсу жылдамдығын 7 күннен соң анықтады. Өсу жылдамдығы мынадай болды: *Bacillus sp №2* культурасы – 41%, ал *Bacillus sp №1* культурасы – 32% болды. Бұл көрсеткіштерді өлшеу үшін суспензияны Спектроскан Макс-G спектрометрі қолданылды.

## ҚОРЫТЫНДЫ

1. Бұл жұмыста мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған топырақты тазартуда биотехнологиялық шараларды қолдану тиімділігі сипатталды. Биотехнологиялық әдістерге микроорганизмдердің көмірсуларды тотықтыру қасиетіне негізделген процестер таныстырылды.

2. Атырау облысы, Атырау қаласында орналасқан АҚ «Maten Petroleum» зертханасында негізгі зерттеу жұмыстары жүргізілді. Зертханада ұсынылған мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған топырақ құрамынан *Bacillus sp.* туысының екі штаммы бөлініп алынды. *Bacillus* туысының штамдары – спора және капсула түзуге қабілетті, қозғалмайтын, грам оң диплобациллалар, тізбектелген стрептобациллалар екендігі анықталды.

3. Алынған бактериялардың мұнай тотықтырушы қасиеті оларды 10% мұнайы бар ВД ортасында өсіру кезінде бақыланды. Мұнайы бар ортада штамдар келесідей өсу динамикасын көрсетті: *Bacillus sp №1* культурасы – 41%, ал *Bacillus sp №2* культурасы – 32%.

## ПАЙДАЛАНЫЛГАН ӘДЕБИТЕТЕР ТІЗІМІ

- 1 Сопрунова О.Б., А.Ш. Акжигитов, А.А. Казиєв, Способы очистки почв от загрязнения нефтью и нефтепродуктами, применяя микробные биотехнологии, 2015
- 1 Рогозина Е.А., О.А. Андреева, С.И. Жаркова, Д.А. Мартынова, Сравнительная характеристика отечественных биопрепаратов, предлагаемых для очистки почв и грунтов от загрязнения нефтью и нефтепродуктами, 2010
- 3 Идентификация нового вида опасности химических веществ: ингибирование процессов экологической ремедиации, 2002
- 4 Obed Schacht, Kenneth Ajibo. Soil Bioremediation: In-Situ vs. Ex-situ. (Costs, Benefits, and Effects), 2002
- 5 Сазыкин И.С., Чистяков В.А., Сазыкина М.А. Ферментативные и неферментативные механизмы деградации углеводородов нефти микроорганизмами, 2009
- 6 Dragana R. Stamenov, Simonida S. Duric, Timea I.H. Jafari. Bioremediation potential of five strains of *Pseudomonas* sp., 2015
- 7 C.Vinothini, S.Sudhakar, R.Ravikumar. Biodegradation of petroleum and crude oil by *Pseudomonas putida* and *Bacillus cereus*, 2015
- 8 A. Sharma, P. Kumar, M.B. Rehman. Biodegradation of diesel hydrocarbon in soil by bioaugmentation of *P.seruginosa*: a laboratory scale study, 2014
- 9 Ahmed A.Burghal, Nadia A. Al-Mudaffar, Kuthier H. Mahdi. Ex situ bioremediation of soil contaminated with crude oil by use of actinomyces consortia for process bioaugmentation, 2015
- 10 D. Ambrazaitiene, A. Zukauskaite, V. Jakubauskaite, R. Reikaite, M. Zubrickaite, D. Karcauskiene. Biodegradation activity in the soil contaminated with oil products, 2013
- 11 F. Mohamad Ghazali, R. Noor Zaliha Abdul Rahman, Abu Bakar S., M. Basri. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium, 2004
- 12 M. Abubakar Clarkson, S. Isa Abubakar. Bioremediation and biodegradation of hydrocarbon contaminated soil: a review, 2015
- 13 Röling W. F. M., Milner M. G., Jones D. M., Fratepietro F., Swannell R. P. J., Daniel F., Head I. M. Bacterial community dynamics and hydrocarbon degradation during a field-scale evaluation of bioremediation on a mudflat beach contaminated with buried oil, 2004
- 14 Aldrett S., Bonner J. S., McDonald T. J., Mills M. A., Autenrieth R. L. Degradation of crude oil enhanced by commercial microbial cultures, 1997
- 15 Qingguo Chen, Jingjing Li, Mei Liu, Huiling Sun, Mutai Bao. Study on the biodegradation of crude oil by free and immobilized bacterial consortium in marine environment, 2017
- 16 Wilkinson S., Nicklin S., Faul J. L. Biodegradation of fuel oils and lubricants: soil and water bioremediation options. Biontransformations: Bioremediation technology for health and environmental protection, 2002

- 17 Vinas M., Grifoll M., Sabate J., Solanas A.M. Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities, 2002
- 18 Leahy J. G., Colwell R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, 1990
- 19 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, 1999
- 20 А.У. Туякбаев, Е.Ж. Шорабаев, С.М. Ерденов, А.К. Саданов. Изучение влияния органоминеральных удобрений на нефтезагрязненную почву месторождения «Кенлык» Кызылординской области в лабораторных условиях, 2012
- 21 Sabate J., Grifoll M., Vinas M., Solanas A. M. Isolation and characterization of a 2-methylphenantrene utilizing bacterium: identification of ring cleavage metabolites, 2000
- 22 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
- 23 Ягафарова Г. Г., Скворцова И. Н. Новый нефтеокисляющий штамм бактерий *Rhodococcus erythropolis* // *Прикл. биохим. и микробиол.* 1996. Т. 32, № 2. С. 224–227.
- 24 И.Е. Кочергин, В.И. Ознобихин, А.В. Савельев, В.О. Кереев. Опыт работы биоремедиации нефтезагрязненной почвы в рамках полевого эксперимента в условиях северного Сахалина, 2005
- 25 T. Solevic, M. Novakovic, M. Ilic, M. Antic, M. Miroslav Vrvic, B. Jovancicevic. Investigation of the bioremediation potential of aerobic zymogenous microorganisms in the soil for crude oil biodegradation, 2011
- 26 Сыдықбекова Р.Қ. «Микроорганизмдерді бөліп алу және өсіру» арнайы практикумының зертханалық сабақтарына арналған әдістемелік нұсқаулар, Алматы, 2016



## Краткий отчет



---

Университет:	Satbayev University
Название:	Мұнай өнімдерімен ластанған топырақты тазарту биотехнологиясы
Автор:	Қалимолда Элина Жақытқызы
Координатор:	Бакытжан Анапияев
Дата отчета:	2019-04-22 06:44:41
Коэффициент подобия № 1: ?	<b>22,9%</b>
Коэффициент подобия № 2: ?	<b>17,3%</b>
Длина фразы для коэффициента подобия № 2: ?	<b>25</b>
Количество слов:	6 347
Число знаков:	52 442
Адреса пропущенные при проверке:	
Количество завершенных проверок: ?	6

---



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