

Дәрібаева Қ.К.¹, Динмухамедова А.С.², Молдагулова Н.Б.³

¹биология мамандығының магистрі, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қазақстан, Астана қ., e-mail: kundyz95.kz@mail.ru

²биология ғылымдарының кандидаты, профессор м.а., Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университетінің Қазақстан, Астана қ., e-mail: a.s.d.14@yandex.ru

³ветеринария ғылымдарының кандидаты, Ұлттық биотехнология орталығының жетекші ғылыми қызметкері, Қазақстан, Астана қ., m_nazira1967@mail.ru

**МҰНАЙМЕН ЛАСТАНУДАН ТОПЫРАҚТЫ ТАЗАЛАУ ҮШІН
ПСИХРОТРОФТЫ МҰНАЙ ТОТЫҚТАНДЫРАТЫН
МИКРОАҒЗАЛАР НЕГІЗІНДЕ БИОПРЕПАРАТ ДАЙЫНДАУ**

Бұл жұмыста мұнаймен ластанудан топырақты тазалау үшін психротрофты мұнай тотықтандыратын микроорганизмдер негізінде биопрепарат дайындау зерттелген. Мұнай тотықтырушы психротрофты микроорганизмдер негізіндегі биопрепараттарды заманауи биотехнологиялық әдістермен біріктіре отырып қолдану биоремедиациялық жұмыстарды жыл бойы жүргізуге мүмкіншілік береді. Жұмыста микробиологиялық және химиялық әдістер пайдаланылған. Микроағзалардың идентификациясы Берджи анықтағышы бойынша анықталды. Бөлініп алынған изоляттардың 16S rRNA консервативті локусы бойынша нуклеотидті тізбегінің генетикалық идентификациясы жүргізілді. Нуклеотидті тізбектің гомологиясы 98-99% құрады. Көмірсуды тотықтандыратын микроағзалардың туыстық және түрлік тиістілігі анықталды.

Мұнайды тотықтандыратын микроағзалардың 3, 4 және 6 штаммдардан тұратын биосәйкес штаммдардан консорциумдардың 4 нұсқасы жасалды. Бөлініп алынған және жинақтық штаммдары арасында микроорганизмдердің 19 дақылдарының +10°C және +4°C кезінде өсу мүмкіндігі анықталды. K-15, P2, M3, K-14 және P3 психротрофты дақылдары мұнайды +10°C және +4°C температураларда 14 тәулік бойы 80%-дан жоғары белсенді деструкциялады. Мұнайдың деструкциясының ең жақсы нәтижелерін 5%-дық ластану кезінде консорциум №1 көрсетті, деструкция деңгейі 61%-ды құрады. 1 консорциум құрамына 3 штамм кіреді: *Serratia marcescens* P3, *Rhodococcus erythropolis* P2, *Bacillus amylofaciens* K-15.

Түйін сөздер: биопрепараттар, психротрофтық микроорганизмдер, биоремедиация.

Daribaeva K.K.¹, Dinmukhamedova A.S.², Moldagulova N.B.³

¹master of specialty in biology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan, kundyz95.kz@mail.ru

²candidate of biological sciences, associate professor, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan, a.s.d.14@yandex.ru

³candidate of veterinary sciences, Leading Researcher of the National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan, m_nazira1967@mail.ru

**Design a biopreparation based on psychotropic
oil-oxidizing microorganisms for cleaning soil from oil pollution**

In this research we studied the conducted to develop a biological product based on psychotropic oil-oxidizing microorganisms for cleaning soil pollution. The use of oil-oxidizing microorganisms on the basis of biopreparation by modern biotechnological methods allows conducting bioremediation works during the year. The work uses microbiological and chemical methods. The identification of microorganisms was on the Bergey's determinant. Genetic identification of the nucleotide sequence of isolates based on the conservative 16S rRNA locus was carried out. The homology of the nucleotide sequence was 98-99%. Four consortia of biocompatible strains consisting of 3, 4 and 6 strains of oil-oxidizing microorganisms have been developed. It was revealed that among the isolated and collection strains

19 cultures of microorganisms had the ability to grow at + 10 ° C and + 4 ° C; Psychotropic cultures K-15, P2, M3, K-14 and P3 actively destroys oil for 14 days at temperatures of + 10 ° C and + 4 ° C in excess of 80%. The best results of oil destruction were shown by Consortium №1 with 5% contamination, which was 61%. The composition of 1 consortium includes 3 strains: *Serratia marcescens* P3, *Rhodococcus erythropolis* P2, *Bacillus amylofaciens* K-15.

Key words: biopreparation, psychotropic microorganisms, bioremediation.

¹Дәрібаева Қ.К., ²Динмухамедова А.С., ³Молдагулова Н.Б.

¹магистрант специальности биология, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Казахстан, г. Астана, e-mail: kundyz95.kz@mail.ru

²кандидат биологических наук, и.о. профессора, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Казахстан, г. Астана, e-mail: a.s.d.14@yandex.ru

³кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник Национального центра биотехнологий, Казахстан, г. Астана, e-mail: m_nazira1967@mail.ru

Разработка биопрепарата на основе психотропных нефтеоокисляющих микроорганизмов для очистки почв от загрязнения нефтью

В данной работе было проведено исследование на разработку биопрепарата на основе психотропных нефтеоокисляющих микроорганизмов для очистки почвы, загрязненной нефтью. Использование нефтеоокисляющих микроорганизмов на основе приготовления биопрепарата современными биотехнологическими методами позволяет проводить биоремедиационные работы в течение года. В работе использованы микробиологические и химические методы. Идентификация микроорганизмов осуществлялась на основе определителя Берджи. Проведена генетическая идентификация нуклеотидной последовательности выделенных изолятов на основе консервативного локуса 16S рРНК. Гомология нуклеотидной последовательности составила 98-99%. Выявлены родственные и видовые связи между углеводокисляющими микроорганизмами.

Разработаны четыре консорциума биосовместимых штаммов, состоящих из 3, 4 и 6 штаммов нефтеоокисляющих микроорганизмов. Выявлено, что из числа выделенных и коллекционных штаммов 19 культур микроорганизмов обладали способностью к росту при +10 °С и +4 °С. Психотропные культуры К-15, P2, M3, K-14 и P3 активно разрушали нефть в течение 14 суток при температурах +10 °С и +4 °С свыше 80%. Наилучшие результаты разрушения нефти показал консорциум №1 при 5% загрязнении, что составило 61%. В состав 1 консорциума входят 3 штамма: *Serratia marcescens* P3, *Rhodococcus erythropolis* P2, *Bacillus amylofaciens* K-15.

Ключевые слова: биопрепарат, психотрофные микроорганизмы, биоремедиация.

Кіріспе

Қоршаған ортаның мұнаймен ластануы қазіргі уақытта алдыңғы орынға тиесілі. Экожүйені ластаушы әсері бойынша радиоактивті ластанудан кейін екінші орынға ие. Соңғы уақыттары актуалды ластану түрі бұл – топырақтың және су қоймаларының мұнаймен және мұнай өнімдерімен ластану түрі. Мұнай және мұнай-газ өндіретін, мұнай өңдейтін, мұнай және мұнай-газ өнімдерін тасымалдайтын кәсіпорындарының регламентті жұмысы нәтижесінде қоршаған ортаға аса елеулі зиян алып келеді және бұл аталғандар – мұнаймен ластанудың көзі болып табылады (*Fan 1995: 493; Aislabie 2000: 183; Margesin 2001: 650; Trindade 2005: 515; Wang 2011:1082; Yergeau 2012; Naseri 2014: 1250*).

Қоршаған ортаны мұнай және мұнай өнімдерінен қорғау, сонымен қатар оларды қалпына келтіру үлкен өткір шектеулі мүмкіндіктерге ие, кей кезде осы мақсатта механикалық, физикалық

және химиялық мұнайдан тазалау тәсілдерін қолдану да қауіпті болып келеді (*Ward 1978:353; Whyte 1997: 3719; Walworth 2001: 85; Dua 2002: 143; Brakstad 2004: 337; Pyrenchenkova 2006: 298*)

Биологиялық әдістер, оның ішінде микробиологиялық әдістер қоршаған ортаны мұнай және мұнай өнімдерінен қорғау мақсатындағы заманауи биотехнологияның қажетті компоненті болып табылады (*Гашев 1990: 77; Вельков 1995: 20; Седых 2001: 349; Петухова 2001:171; Диаров 2003: 336; Егибаева 2004: 73*).

Осыған орай мұнай мен ластанған өнімдерден топырақты тазалау мақсатында микроорганизмдерді пайдалану кеңінен таралған, себебі микроорганизмдер өте жоғарғы дәрежедегі мұнай бар қоректік ортада өмір сүруі және белсенділік танытуы, мұнай құрамын ыдыратушылық қабілетіне ие (*Gao 2015: 373; Stasik 2015:173; Leite 2016: 262; Scoma 2016*). Мұнаймен ластанған топырақтағы мұнай тотықтырушы микроорганизмдердің саны мен белсенділігі биологиялық ремидиацияда басты

рөл ойнайды. Мұнай тотықтырушы психротрофты микроорганизмдер негізіндегі биопрепараттарды заманауи биотехнологиялық әдістермен біріктіре отырып қолдану биоремедиациялық жұмыстарды жыл бойы жүргізуге мүмкіншілік береді (Похиленко 2009: 99; Логинова 2011: 170; Брянская 2014: 999).

Зерттеу мақсаты. Батыс Қазақстан облысының мұнаймен ластанған топырағынан психротрофты ыдыратушы микроорганизмдердің қасиетін зерттеп, биопрепарат дайындау.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Психротрофты мұнайды тотықтандырғыш микроағзаларды бөлу Атырау және Маңғыстау облыстарының ластанған топырақтарында, сондай-ақ Астана қаласының ағынды суларды тазарту құрылыстарында (КТҚ) жүргізілді.

Жұмыста микробиологиялық әдістер (Чугунов 2000: 661; Айтекенов 2001: 182) химиялық әдістер (Понаморева 1998: 79) пайдаланылған. Микроағзалардың идентификациясы Берджи анықтағышы бойынша (Хоулт 1997: 368) және 16S rDNA ПТР талдау әдісі арқылы анықталды [10].

Зерттеу нәтижелері және оларды талдау

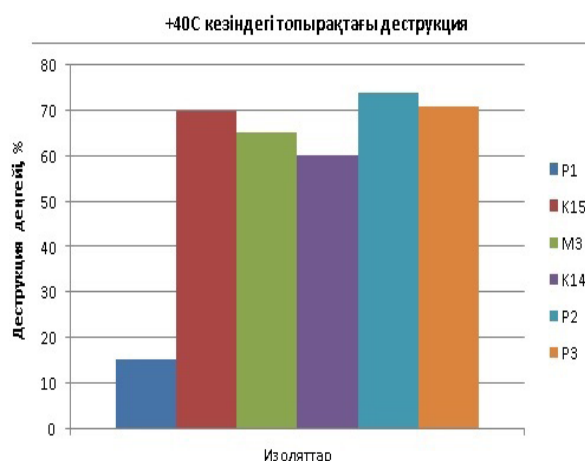
Бөлініп алынған микроағзалардың мұнайды тотықтандыру шамасын топырақта Жанаталап кен орнының шикі мұнайын қолдану арқылы зерттелді. Әрі қарай мұнайдың көмірсутектерін тотықтандыру қабілеті бойынша көмірсутекті тотықтандырғыш микроағзалардың ерекше белсенді психротрофты дақылдары таңдап алынды.

Осы мақсатпен бөлініп алынған Жанаталаптық шикі мұнайдың концентрациясы 1% (мұнайдың тығыздығы 0,74 г/см³ тең) болатын изоляттарды топыраққа (P2, K15, K14, M3, P3, P1) 10 000 000 кл/ 100 г концентрациясында енгізілді. Дақылдардың инкубациясын +10°C және +4°C температураларда жүргіздік. Көмірсутектердің шығыны микроорганизмдерді енгізбей бақылауды шегеріп тастау арқылы анықталды.

Бағалау мен деструктивті белсенділікті мұнай көмірсутектерінің қалдық мөлшері бойынша визуальді және гравиметрия әдісі арқылы анықталды. Тәжірибелердің нәтижелері 1-суретте көрсетілген.

1-суреттегі мәліметтері бойынша барлық бөлініп алынған психротрофты изоляттар 4°C кезінде жасанды ластанған топырақта мұнайды

белсенді түрде бұзғаны көрініп тұр, соның ішінде ең белсенді бұзған изоляттар K15, M3, K14 және P3 (61-77%), A1 дақылдарын қолдану кезінде төменірек нәтижелер алынды, бұл кезде мұнайдың бұзылуы шамамен 24-36% болды, бұл дақылдар бақылаумен салыстырғанда су мен топырақта мұнайды деструкциялау бойынша төмен нәтижелер көрсеткендіктен, әрі қарай тәжірибелерде олар қолданылған жоқ. Дақылдарды теңіз суында +4°C температурада 3% концентрацияда шикі мұнайды қосу арқылы 7 тәулік бойы культивирлеу процесін визуальді бағалау кезінде 8 дақылда мұнай қабықшасы құрылымының өзгергені байқалды. Мұнай қабықшасының күшті және орташа бұзылуы байқалды, бұзылу кішідисперсті эмульсия, үлпектер жүзгіні және ұсақ гранулалар түрінде болды, сонымен қатар қолба қабырғаларында майланудың болмағандығы да байқалды.

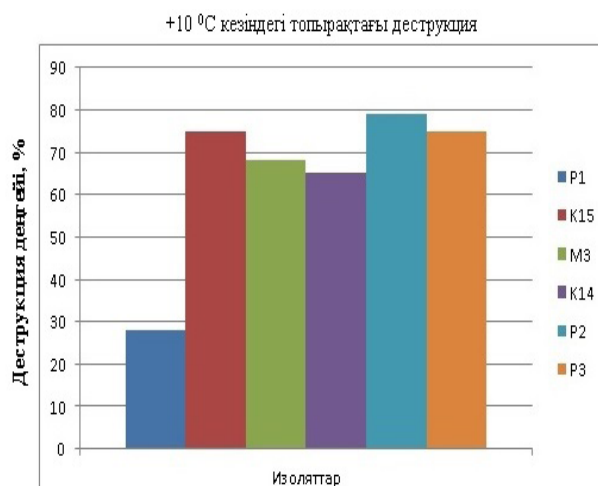


1-сурет – +4°C кезіндегі мұнайдың топырақтағы деструкциясы

Әрі қарай +10°C температура кезінде топырақтағы деструкция деңгейі анықталды. Мұнайдың бұзылу деңгейінің диаграммасы 2-суретте көрсетілген.

+10°C температурада топырақтағы деструкция деңгейін анықтау кезінде белсенді дақылдар K15, P2, M3, K14, P3 изоляттары болды. Бұлармен мұнай көмірсутектерінің бұзылуы 60% жоғары болды. Деструкция максимальді деңгейін P2 дақылы көрсетті (86%). Деструкциясының төменгі көрсеткіштері 10°C кезінде 9/3, A-1 дақылдарын қолданғанда байқалды. Мұндай мұнай өнімдерінің биодеградациясы көрсеткіштерінің үлестірілуі бұл изоляттардың көмірсутектерді тотықтандыру процестері үшін

оптимальді төмен температуралар болып табылатын психробелсенді және психрофильді микрофлораға жататындығымен түсіндіруге болады.



2-сурет – +10 °C кезіндегі топырақтағы мұнайдың деструкциясы

Мұнаймен ластанған аймақтардан бөлініп алынған изоляттардың морфологиялық және физиологиялық-биохимиялық белгілердің жиынтығы бойынша идентификация жүргізілді: P2 изоляты *Rhodococcus erythropolis* ретінде идентификацияланды, M3- *Ochrobactrum sp.*, P3-*Serratia marcescens*, K14 және K15- *Bacillus* ретінде танылды.

Бөлініп алынған 6 дақылдың анық таксономиялық статусын дәлелдеу үшін консервативті locus 16S rRNA бойынша нуклеотидтік тізбегінің генетикалық идентификациясы жүргізілді, әрі қарай нуклеотидтік дәлдікті GeneBank халықаралық мәліметтер базасында депонирленген тізбектермен анықтады. Бактерия жасушасынан РНҚ-ны бөліп алуды К. Вильсон әдісімен жүргізілді.

Микроағзалардың консорциумын жасау кезінде микроағзалар арасындағы қарым-қатынас типін ескеру өте маңызды, себебі микроағзалар нақты экологиялық жағдайларда өзара белгілі бір қарым-қатынас орнатады, бұл қарым-қатынастардың сипаты бірдей дамиды микроағзалар дақылдарының физиологиялық ерекшеліктері мен қажеттіліктеріне тәуелді [18]. Сонымен қатар бірге культивирлеу кезінде бір түрдің микроағзалары басқа микроағзалардың өміршеңдігіне қысым көрсетуі мүмкін.

Көмірсутекті тотықтандыратын микроағзалардың психротрофты штаммдары қоғамдас-тығының деструктивті потенциалын зерттеу үшін таңдалып алынған микроағзалардың мұнайды тотықтандырғыш штаммдардан консорциумдар жасалынды. Консорциумдарды бір-біріне өзара толеранттық принципі бойынша жасалды. Консорциум жасау үшін 6 белсенді коллекциялық, өзара үйлесімді мұнайды тотық-тандыратын микроағзалар штаммдары таңдалып алынды: *Ochrobactrum sp.* M3, *Serratia marcescens* P3, *Rhodococcus erythropolis* P2, *Bacillus amylofaciens* K15, *Achromobacter sp.* P1, *Bacillus fusiformis* K14 бұл штаммдар жағымды төмен температуралық режимдер кезінде өсуі мүмкін. Зерттеулер нәтижесінде консорциумдар үшін таңдап алынған дақылдардың бір-біріне қатысты антагонистік қасиеттер көрсетпейтіні дәлелденеді.

Мақсатты бағытталған сұрыптау жолымен бізбен мұнайды тотықтандыратын микроағзалардың 3, 4 және 6 штаммдардан тұратын консорциумдардың 4 нұсқасы жасалды.

1 консорциум құрамына 3 штамм кіреді: *Serratia marcescens* P3, *Rhodococcus erythropolis* P2, *Bacillus amylofaciens* K15 (консорциум №1).

Консорциум 2 құрамына 4 штамм кіреді: *Serratia marcescens* P3, *Rhodococcus erythropolis* P2, *Bacillus amylofaciens* K15, *Achromobacter sp.* P1 (консорциум №2).

Мұнайды тотықтандыратын бактериялардың 6 штаммы консорциум 3 құрамына кірді: *Ochrobactrum sp.* M3, *Serratia marcescens* P3, *Rhodococcus erythropolis* P2, *Bacillus amylofaciens* K15, *Achromobacter sp.* P1, *Bacillus fusiformis* K14 (консорциум №3).

Консорциум 4 құрамына 5 штамм кіреді: *Ochrobactrum sp.* M3, *Serratia marcescens* P3, *Rhodococcus erythropolis* P2, *Bacillus amylofaciens* K-15, *Achromobacter sp.* P1 (консорциум №4).

Жасалған консорциумдардың деструктивті белсенділігін жасанды ластанған топырақта және Ворошилова-Дианова минералды ортасында зерттеді. Тәжірибе нәтижелері 1-кестеде көрсетілген.

1-кестенің мәліметтері мұнайдың топырақтағы ең жоғары биодеструкциясына консорциум № 1 қолдану кезінде қол жеткізілгеніне, мұнайдың тотықтану деңгейі 63% құрағандығына куә болады. Консорциум № 2 қолдану кезінде деструкция деңгейі – 60% болып, нашар емес нәтижелер бақыланды.

В-Д минералды ортасында мұнайдың деструкциясының деңгейін зерттеу процесі

кезінде мұнайдың максималді деструкциясы консорциум №1-де байқалады және 72% құрайды, консорциум №2 мұнайды 67%-ға дейін тотықтандырып, ол да максималді деструкция көрсетеді, ал консорциум № 4 мұнайды 63%-ға дейін утильдейді. Ең аз деструкция деңгейін 56%-ға дейін консорциум №3 көрсетті.

Әрі қарай тәжірибелерде +10°C температурада В-Д минералды ортасында 1, 3 және 5% концентрацияларда таңдап алынған консорциумдармен №1 және №2 мұнайдың биодеструкциясының деңгейі анықталды. Мұнайдың утильдену деңгейін визуальді түрде майлылықтың болмауы және үлгідегі мұнайдың қалдық құрамы бойынша анықтады.

Визуальді бағалау кезінде 1% мұнайы бар консорциумдарда 1 тәуліктің өзінде дақылдық сұйықтықтың түсінің түссізден қоңыр немесе кара-қоңыр түске дейін өзгергені және колбаның қабырғаларында майлылықтың болмағандығы байқалды. 3 және 5% мұнайды қолданған жағдайда да осындай көрініс байқалды, алайда майлылықтың болмауы культивирлеудің 3-4 тәулігінде байқалды.

Үлгідегі мұнайдың қалдық құрамын консорциум №1 және №2 енгізгеннен кейін гравиметриялық әдіспен анықталды.

Тәжірибелік үлгідегі мұнайдың қалдық құрамын сандық анықтау 2-кестеде көрсетілген.

1-кесте – Мұнайды тотықтандыратын консорциумдармен мұнайдың деструкциялану деңгейі

№ п/п	Консорциум	Деструкция деңгейі,%	
		Топырақта	Ворошилова-Дианова (В-Д) минералды ортасында
1	Консорциум №1	63%	72%
2	Консорциум №2	60%	67%
3	Консорциум №3	51%	56%
4	Консорциум №4	57%	63%

2-кесте – Мұнайдың әр түрлі концентрацияларын консорциумдармен деструкциялау деңгейі

№ п/п	Консорциум	Деструкция деңгейі,%		
		1%	3%	5%
1	Консорциум №1	72%	64,74	61%
2	Консорциум №2	71%	64,55	54%

Бөлініп алынған консорциумдардың мұнайды тотықтандыратын потенциалын мұнаймен жасанды ластанған Ворошилова-Дианова минералды ортасында 1%, 3% және 5% концентрацияларда зерттеу кезінде 1% және 3%-дық мұнаймен ластанған кезде микроағзалар штаммдарының консорциумдарының 64%-72% шамасындағы бірдей нәтижелерді көрсеткені дәлелденді. Минералды орта 5% мұнаймен ластанған кезде өзгеше нәтижелер алынды. Бұл жағдайда консорциум №1 жоғары мұнай деструкциясының белсенділігін көрсетті, белсенділік 61%-ды құрады, ал консорциум №2 тек 54%-ды ғана утильдейді.

Алынған нәтижелер мұнай қалдықтарын утильдеуге арналған биологиялық препаратты

жасап шығару үшін потенциалды кандидаттарды таңдап алуға мүмкіндік береді. Жасалған консорциумдардың биотрансформациялайтын белсенділік ескере отырып, әрі қарай зерттеулер үшін консорциум №1 таңдап алынды.

Бастапқы кезеңінде *Rhodococcus erythropolis* P2, *Bacillus amyloliquefaciens* K-15 және *Serratia marcescens* P3 штаммдарын СПБ эмбебап ортасында культивирлеу жүргізілді. Әрбір дақылды 3 колбада 5,0 дм³ мөлшерде өсірді. Ортаға микроағзалар дақылдарымен ортаның 1,0 дм³ көлеміне 10⁹кл/см³ концентрацияда инокуляция жүргізді. Инкубацияны шейкер-инкубаторда 150 айн/мин 30°C температурада 48 сағ бойы жүргізді. Бактерия жасушаларының өсуін ортаның бірыңғай лайлануы бойынша бағалады.

Биомассаның жиналу деңгейін ҚКА қоректік агарында өсірілген, он есе мөлшердегі араластырып титрлеу әдісімен анықтады. Әрбір араластыру кезінде агар ортасында бірыңғай себу жүргізілді.

Айтылып өтілген культивирлеудің параметрлерін ұстану кезінде биомассаның максималды жинақталуы байқалды. Бұл кезде *Rhodococcus erythropolis* P2 штаммының титрі $9,0 \pm 0,16 \text{ lg КТБ /см}^3$ болды, *Bacillus amyloliquefaciens* И-15-те – $9,18 \pm 0,21 \text{ lg КТБ /см}^3$ және *Serratia marcescens* P3 штамында $9,25 \pm 0,23 \text{ lg КТБ/см}^3$ деңгейінде байқалды.

Осылайша, бізбен *Rhodococcus erythropolis* P2, *Bacillus amyloliquefaciens* К-15 және

Serratia marcescens P3 штамдарының $5,0 \text{ дм}^3$ көлем бойынша биомассасы жиналды. Барлық штамдардың биологиялық титрі шамамен $9,0 \pm 0,16 \text{ lg КТБ/см}^3$ – $9,25 \pm 0,23 \text{ lg КТБ/см}^3$ болды.

Әрі қарай зерттеу жұмыстары центрифугалау әдісі арқылы жасушаларды концентрлеуге бағытталды. Бірінші кезеңде центрифугалаудың оптималды режимдері өңделді. Бұл мақсатпен алынған дақылдық сұйықтықтарын 4000, 10000 және 13000 айн/мин кезінде центрифугалау әдісі арқылы тұндырды. Жасушаларды тұндыруды 30 минут бойы жүргізді (3-кесте). Жасушаларды толық тұндыруды тұнба бетіндегі сұйықтықта Кох бойынша титрлеу әдісі арқылы бакылады.

3-кесте – Бактерия жасушаларын центрифугалау әдісімен концентрлеу

Центрифугалау режимі/ жасушалар титрі		<i>Rhodococcus erythropolis</i> P2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> К-15	<i>Serratia marsencens</i> P3
Жасушалардың бастапқы титрі	КТБ/см ³	$9,3 \pm 0,02 \times 10^9$	$8,5 \pm 0,14 \times 10^9$	$10,2 \pm 0,13 \times 10^9$
	lg КТБ/см ³	9,96	9,92	9,00
4000 айн/мин	КТБ/см ³	$9,8 \pm 0,11 \times 10^{11}$	$9,2 \pm 0,19 \times 10^{10}$	$9,5 \pm 0,25 \times 10^{12}$
	lg КТБ/см ³	11,99	10,96	12,97
10000 айн/мин	КТБ/см ³	$8,2 \pm 0,14 \times 10^{11}$	$7,2 \pm 0,08 \times 10^{10}$	$8,1 \pm 0,07 \times 10^{12}$
	lg КТБ/см ³	11,91	10,85	12,9
13000 айн/мин	КТБ/см ³	$7,5 \pm 0,07 \times 10^{10}$	$6,5 \pm 0,13 \times 10^{10}$	$7,6 \pm 0,17 \times 10^{11}$
	lg КТБ/см ³	10,87	10,81	11,88

Штамдардың дақылдық сұйықтығын центрифугалау нәтижелері *Rhodococcus erythropolis* P2 және *Serratia marcescens* P3 жасушаларының максималды тұндыру 30 минут бойы 4000 айн/мин және 10000 айн/мин кезінде 13000 айн/мин салыстырғанда жақсырақ жүретіні көрсетілді. 4000 айн/мин-да центрифугалау кезінде *Rhodococcus erythropolis* P2 штаммы жасушасының биологиялық титрі $11,99 \text{ lg КТБ/см}^3$ құрады, *Serratia marcescens* P3 – $12,97 \text{ lg КТБ/см}^3$ және *Bacillus amyloliquefaciens* К-15 штаммы – $10,96 \text{ lg КТБ/см}^3$.

Осылайша, биомассаны концентрлеу үшін центрифугалаудың оптималды режимдері таңдап алынды. Микроағзаларды концентрлеуден кейін биомассаның максималды шығымы 30 минут бойы 4000 айн/мин режимі кезінде қол жеткізілді, сондықтан штамдарды концентрлеуді көрсетілген режимдерде жүргізу ұсынылады. Өткізілген тәжірибелер жасушалардың ең жоғары шығымын алу мақсатымен центрифугалау

параметрлерін ұстану мүмкіндігіне куә бола алады. Әрі қарай концентрленген биологиялық препараттың препараттық формасын алу үшін бактерия жасушаларының алынған тұнбаларды біріктіреді (1:1:1) және зертханалық жағдайларда жасап шығарылған қорғаныс ерітіндіні №1 1:3 қатынасында қосады.

Биопрепараттың концентрленген формасының 1 см^3 көлемінде жасушалардың титрі $11,00 \text{ lg КТБ/см}^3$ құрады. Алынған биологиялық препараттың концентрленген формасы сұйық біркелкі суспензия түрінде, ақшыл сары түсті және иіссіз, мұнай ластануларын утилеу үшін арналған. Жасап шығарылған биологиялық препараттың тиімділігін мұнай қосылған В-Д минералды ортасында анықталды. Препаратты 1% мұнаймен ластанған ортаға 10^8 кл/см^3 концентрацияда енгізілді. Препаратты қосудан кейін мұнайы бар ластанған минералды ортаға 10°C температурада «Innova43^R» тербелмеде 150 айн/мин режимінде инкубация жүргізілді. Мұнайды

тотықтандыру деңгейін мұнай көмірсуларының қалдық құрамы бойынша гравиметрия әдісімен анықтады. Нәтижесінде жасап шығарылған биопрепарат 14 тәулік бойы мұнайдың 91%-ын бұзды. Осылайша, 91% мұнайды бұзу алатын консорциум №1 негізінде биологиялық препараттың концентрленген сұйық формасын жасау технологиясы жасап шығарылды.

Жүргізілген зерттеу жұмыстары бойынша келесідей нәтижелер шығарылды:

Бөлініп алынған және жинақтық штаммдары арасында микроорганизмдердің 19 дақылдарының +10 °C және +4 °C кезінде өсу мүмкіндігі анықталды. Топырақтағы шикі мұнайдың +10 °C, +4 °C және +20 °C температура кезінде деструкциялану деңгейі анықталды. К-15, P2, M3, K-14 және P3 психротрофты дақылдары мұнайды +10°C және +4°C температураларда 14 тәулік бойы 80%-дан жоғары белсенді деструкциялады. Топырақтағы деструкция деңгейі де

80% жоғары болды, алайда, бұзылу уақыты 14 тәулік емес, 60 тәулікті құрады. Жасушалардың енгізілген дақылдарының өсу динамикасын анықтау кезінде 7 және одан да көп тәулік кезінде жасушалардың титрінің артуы дәлелденді.

Мұнаймен ластанған аймақтардан бөлініп алынған дақылдар келесідей идентификацияланды: изолят P2 – *Rhodococcus erythropolis*, M3 – *Ochrobactrum sp.*, P3 – *Serratia marcescens*, K-14 изоляты *Bacillus fusiformis* ретінде, K-15 – *Bacillus amylofaciens*.

Мұнайдың ең жақсы биодеструкциясы консорциум № 1 (63%-72%) және консорциум №2 (60%-67%) пайдалану кезінде сәйкесінше қол жеткізілді. Мұнайдың 1, 3 және 5% концентрацияларында консорциумдармен №1 және №2 деструкциялану дәрежесі зерттелді. Мұнайдың деструкциясының ең жақсы нәтижелерін 5%-дық ластану кезінде консорциум №1 көрсетті, деструкция деңгейі 61%-ды құрады.

Әдебиеттер

- 1 Fan C.Y., Krishnamurthy S. Enzymes for enhancing bioremediation of petroleum-contaminated soils: a brief review. J Air Waste Manag Assoc. 1995 Jun;45(6):453-60.
- 2 Aislabie J., Foght J., Saul D. Aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from soil near Scott Base, Antarctica // Polar. Biol. – 2000. – Vol. 23. – P. 183-188.
- 3 Margesin R., Schinner F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. Appl Microbiol Biotechnol. 2001 Sep; 56(5-6):650-63.
- 4 Trindade P.V., Sobral L.G., Rizzo A.C., Leite S.G., Soriano A.U. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. Chemosphere. 2005 Jan;58(4):515-22.
- 5 Wang S.J., Wang X., Lu G.L., Wang Q.H., Li F.S., Guo G.L. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils by cold-adapted microorganisms: research advance. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao. 2011 Apr;22(4):1082-8.
- 6 Yergeau E., Sanschagrin S., Beaumier D., Greer C.W. Metagenomic analysis of the bioremediation of diesel-contaminated Canadian high arctic soils. PLoS One. 2012;7(1):e30058. doi: 10.1371/journal.pone.0030058. Epub 2012 Jan 11.
- 7 Naseri M., Barabadi A., Barabady J. Bioremediation treatment of hydrocarbon-contaminated Arctic soils: influencing parameters. Environ Sci Pollut Res Int. 2014 Oct; 21(19):11250-65. doi: 10.1007/s11356-014-3122-2.
- 8 Ward M., Brock T.D. Hydrocarbon degradation in hypersaline environments // Appl. Environ. Microbiol. – 1978. – Vol. 35. – P. 353-359.
- 9 Whyte L., Bourbonniere L., Greer Ch. Biodégradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic Pseudomonas strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways // Appl. and Environ. Microbiol. – 1997. – Vol. 63, №9. – P. 3719-3723.
- 10 Walworth J., Braddock J., Woolard C. Nutrient and temperature interactions in bioremediation of crytic soils // Cold regions Sci. Technol. – 2001. – Vol. 32. – P. 85-91.
- 11 Dua M., Singh A., Sethunathan., Johri A.K. Biotechnology and bioremediation: Successes and limitations. Appl Microbiol Biotechnol. 2002 Jul;59(2-3):143-52.
- 12 Brakstad O.G., Bonaunet K., Nordtug T., Johansen O. Biotransformation and dissolution of petroleum hydrocarbons in natural flowing seawater at low temperature // Biodégradation. – 2004. – Vol. 15. – P. 337-346.
- 13 Pyrchenkova I.A., Gafarova A.B., Puntus I.F., Filonov A.E., Boronin A.M. Search for active psychrotrophic microbial oil degraders and their characterization // Prikl. Biokhim. Mikrobiol. – 2006. – Vol. 42, № 3. – P. 298-305.
- 14 Гашев С.Н., Соромотин А.В. Состояние растительности как критерий нарушенности лесных биоценозов при нефтяном загрязнении // Экология. – 1990. – № 2. – С. 77-78.
- 15 Вельков В.В. Биоремедиация: принципы, проблемы, подходы // Биотехнология. – 1995. – № 3. – С. 20-27.
- 16 Седых В.Н. Реакция культур кедра и пихты на воздействие отходов бурения нефтяных скважин. I. Ближнее последствие // Сибирский экологический журнал. – 2001. – Т. 8, № 3. – С. 349–360.
- 17 Петухова Г.А. Токсирезистентность высших водных растений при действии грунта, загрязненного нефтью // 8 съезд Гидробиологического общества РАН: тез. докл. съезда. – Калининград, 2001. – Т. 2. – С. 161-162.

- 18 Диаров М.Д., Гиладжов Е.Г., Муликов Р.Р. Экология и нефтегазовый комплекс. – Алматы: Ғалым, 2003. – Т.2. – С. 336-337.
- 19 Егибаева Л. Нефтегазодобыча: проблемы и перспективы//Актюбинский вестник. – 2004. – №38-39. – С. 73-76.
- 20 Gao X., Gao W., Cui Z., Han B., Yang P., Sun C., Zheng L.. Biodiversity and degradation potential of oil-degrading bacteria isolated from deep-sea sediments of South Mid-Atlantic Ridge. *Mar Pollut Bull.* 2015 Aug 15;97(1-2):373-80. doi: 10.1016
- 21 Stasik S., Wick L.Y., Wendt-Potthoff K. Anaerobic BTEX degradation in oil sands tailings ponds: Impact of labile organic carbon and sulfate-reducing bacteria. *Chemosphere.* 2015 Nov;138:133-9. doi: 10.1016.
- 22 Leite G.G., Figueirôa J.V., Almeida T.C., Valôes J.L., Marques W.F., Duarte MD1, Gorchach-Lira K1. Production of rhamnolipids and diesel oil degradation by bacteria isolated from soil contaminated by petroleum. *Biotechnol Prog.* 2016 Mar;32(2):262-70. doi: 10.1002/btpr.2208.
- 23 Scoma A., Barbato M., Hernandez-Sanabria E., Mapelli F., Daffonchio D., Borin S., Boon N.. Microbial oil-degradation under mild hydrostatic pressure (10 MPa): which pathways are impacted in piezosensitive hydrocarbonoclastic bacteria? *Sci Rep.* 2016 Mar 29;6:23526. doi: 10.1038/srep23526.
- 24 Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Известия ВУЗов. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2009. – №4. – С. 99-121.
- 25 Логинова О.О., Белоусова Е.В., Шевченко М.Ю., Грабович М.Ю. Консорциум штаммов бактерий-нефтедеструкторов рода *Acinetobacter* для биоремедиации нефтезагрязненных почв//Вестник Уральской медицинской академии. – 2011. – №4 – С. 170-171.
- 26 Брянская А.В., Уварова Ю.Е., Слынько Н.М., Демидов Е.А., Розанов А.С., Пельтек С.Е. Теоретические и практические аспекты проблемы биологического окисления углеводородов микроорганизмами // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014, ТОМ 18. – № 4/2. С.999-1001.
- 27 Чугунов В.А., Ермоленко З.М., Жиглецова С.К., и др. Создание и применение жидкого препарата на основе ассоциации нефтеокисляющих бактерий // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – № 6. – С. 661-665.
- 28 Айтекенов К.М., Алекперов Р.Т., Ахметов А.Б. Основные черты современного экологического состояния геологической среды нефтегазоносных бассейнов Казахстана и смежных территорий // Нефтегазоносность Казахстана. – 2001. – С. 182-183.
- 29 Понаморева Л.В., Крунчак В.Г., Торганова В.А. Биоремедиация нефтезагрязненной почвы с использованием биопрепарата «БИОСЭТ» и пероксида кальция // Биотехнология. – 1998. – №1. – С. 79-84.
- 30 Хоулт Дж. Определитель бактерий Берджи: В 2 т. / под ред. Дж. Хоулт, Н. Криг. – Мир. – 1997. – Т. 1. – 432 с.; Т. 2. – С. 368-369.

References

- 1 Fan C.Y., Krishnamurthy S. Enzymes for enhancing bioremediation of petroleum-contaminated soils: a brief review. *J Air Waste Manag Assoc.* 1995 Jun;45(6):453-60.
- 2 Aislabie J., Foght J., Saul D. Aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from soil near Scott Base, Antarctica // *Polar. Biol.* – 2000. – Vol. 23. – P. 183-188.
- 3 Margesin R., Schinner F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001 Sep; 56(5-6):650-63.
- 4 Trindade P.V., Sobral L.G., Rizzo A.C., Leite S.G., Soriano A.U. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. *Chemosphere.* 2005 Jan;58(4):515-22.
- 5 Wang S.J., Wang X., Lu G.L., Wang Q.H., Li F.S., Guo G.L. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils by cold-adapted microorganisms: research advance. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao.* 2011 Apr;22(4):1082-8.
- 6 Yergeau E., Sanschagrin S., Beaumier D., Greer C.W. Metagenomic analysis of the bioremediation of diesel-contaminated Canadian high arctic soils. *PLoS One.* 2012;7(1):e30058. doi: 10.1371/journal.pone.0030058. Epub 2012 Jan 11.
- 7 Naseri M., Barabadi A., Barabady J. Bioremediation treatment of hydrocarbon-contaminated Arctic soils: influencing parameters. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2014 Oct; 21(19):11250-65. doi: 10.1007/s11356-014-3122-2.
- 8 Ward M., Brock T.D. Hydrocarbon degradation in hypersaline environments // *Appl. Environ. Microbiol.* –1978. –Vol. 35. –P. 353-359.
- 9 Whyte L., Bourbonniere L., Greer Ch. Biodégradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol. 63, №9. – P. 3719-3723.
- 10 Walworth J., Braddock J., Woolard C. Nutrient and temperature interactions in bioremediation of crytic soils // *Cold regions Sci. Technol.* – 2001.– Vol. 32. –P. 85-91.
- 11 Dua M., Singh A., Sethunathan., Johri A.K. Biotechnology and bioremediation: Successes and limitations. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002 Jul;59(2-3):143-52.
- 12 Brakstad O.G., Bonaunet K., Nordtug T., Johansen O. Biotransformation and dissolution of petroleum hydrocarbons in natural flowing seawater at low temperature // *Biodégradation.* – 2004. – Vol. 15. – P. 337-346.
- 13 Pырченкова I.A., Гафаров А.В., Пунтус I.F., Филонov A.E., Боронин A.M. Search for active psychrotrophic microbial oil degraders and their characterization // *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* – 2006. – Vol. 42, № 3. – R. 298-305.

- 14 Gas'ev S.N., Soromoti'n A.V. Sostoi'ani'e rasti'telnosti' kak kri'teri'i' nary's'ennosti' lesnyh bi'otsenozov pri' nef'ti'anom zagri'azneni'i' // *Ekologi'i'a*. – 1990. – № 2. – S. 77-78.
- 15 Velkov V.V. Bi'oremedi'atsi'i'a: pri'ntsi'py, problemy, podhody // *Bi'otekhnologi'i'a*. – 1995. – № 3. – S. 20-27.
- 16 Sedyh V.N. Reaktsi'i'a ky'lt'y'r kedra i' pi'hty na vozdei'stvi'e othodov by'reni'i'a nef'ti'anyh skvaji'n. I. Bli'jnee posledstvi'e // *Si'bi'rski'i' ekologi'c'eski'i' jy'rnal*. – 2001. – T. 8, № 3. – S. 349–360.
- 17 Pety'hova G.A. Toksi'rezi'stentnost' vyss'i'h vodnyh rasteni'i' pri' dei'stvi'i' gry'nta, zagri'aznennogo nef'ti'y' // 8 sez'd Gi'drobi'ologi'c'eskogo obs'estva RAN: tez. dokl. sez'da. – Kali'ni'ngrad, 2001. – T. 2. – S. 161-162.
- 18 Di'arov M.D., Gi'lajov E.G., My'li'kov R.R. *Ekologi'i'a i' nef'tegazovyi' kompleks*. – Almaty: G'alym, 2003. – T.2. – S. 336-337.
- 19 Egi'baeva L. *Nef'tegazodobyč'a: problemy i' perspekti'vy*//*Akti'y'bi'nski'i' vestni'k*. – 2004. – №38-39. – S.73-76.
- 20 Gao X., Gao W., Cui Z., Han B., Yang P., Sun C., Zheng L.. Biodiversity and degradation potential of oil-degrading bacteria isolated from deep-sea sediments of South Mid-Atlantic Ridge. *Mar Pollut Bull.* 2015 Aug 15;97(1-2):373-80. doi: 10.1016
- 21 Stasik S., Wick L.Y., Wendt-Potthoff K. Anaerobic BTEX degradation in oil sands tailings ponds: Impact of labile organic carbon and sulfate-reducing bacteria. *Chemosphere.* 2015 Nov;138:133-9. doi: 10.1016.
- 22 Leite G.G., Figueirôa J.V., Almeida T.C., Valôes J.L., Marques W.F., Duarte MD1, Gorlach-Lira K1. Production of rhamnolipids and diesel oil degradation by bacteria isolated from soil contaminated by petroleum. *Biotechnol Prog.* 2016 Mar;32(2):262-70. doi: 10.1002/btpr.2208.
- 23 Scoma A., Barbato M., Hernandez-Sanabria E., Mapelli F., Daffonchio D., Borin S., Boon N.. Microbial oil-degradation under mild hydrostatic pressure (10 MPa): which pathways are impacted in piezosensitive hydrocarbonoclastic bacteria? *Sci Rep.* 2016 Mar 29;6:23526. doi: 10.1038/srep23526.
- 24 Pohl'lenko V.D., Baranov A.M., Dety's'ev K.V. *Metody dli'telnogo hraneni'i'a kolleksi'onnyh ky'lt'y'r mi'kroorgani'zmov i' tendentsi'i' razvi'ti'a* // *I'zvesti'i'a VY'Zov. Povoljski'i' regi'on. Medi'tsi'nski'e nay'ki'*. – 2009. – №4. – S.99-121.
- 25 Logi'nova O.O., Beloy'sova E.V., S'evc'enko M.I'y', Grabovi'c' M.I'y'. *Konsortsi'y'm s'tammov bakteri'i'-neftedestry'ktorov roda Acinetobacter dli'a bi'oremedi'atsi'i' nef'te-zagri'aznennyh poc'v'*//*Vestni'k Y'ralskoi' medi'tsi'nskoi' akademi'i'*. – 2011. – №4 – S. 170-171.
- 26 Bri'anskai'a A.V., Y'varova I'y'E., Slyenko N.M., Demi'dov E.A., Rozanov A.S., Peltek S.E. *Teoreti'c'eski'e i' prakti'c'eski'e aspekty problemy bi'ologi'c'eskogo oki'sleni'i'a y'glevodorodov mi'kroorgani'zmami'*. *Vavi'lovski'i' jy'rnal geneti'ki' i' selektsi'i'*, 2014, TOM 18, № 4/2. S.999-1001.
- 27 C'y'gy'nov V.A., Ermolenko Z.M., Ji'gletsova S.K., i' dr. *Sozdani'e i' pri'meneni'e j'dkogo preparata na osnove assotsi'atsi'i' nef'teoki'sli'ai'y's'i'h bakteri'i'* // *Pri'kladnai'a bi'ohi'mi'i'a i' mi'krobi'ologi'i'a*. – 2000. – № 6. – S. 661-665.
- 28 Ai'tekenov K.M., Alekperov R.T., Ahmetov A.B. *Osnovnye c'erty sovremennogo ekologi'c'eskogo sostoi'ani'i'a geologi'c'eskoi' sredy nef'tegazonosnyh bassei'nov Kazahstana i' smeinyh terri'tori'i'* // *Nef'tegazonosnost Kazahstana*. – 2001. – S. 182-183.
- 29 Ponamoreva L.V., Kry'nc'ak V.G., Torgavanova V.A.. *Bi'oremedi'atsi'i'a nef'tezagri'aznennoi' poc'vy s i'spolzovani'em bi'opreparata «BI'OSET» i' peroksi'da kaltsi'i'a* // *Bi'otekhnologi'i'a*. – 1998. – №1. – S. 79-84.
- 30 Hoy't Dj. *Opredeli'tel bakteri'i' Berdji': v 2 t. / pod red. Dj. Hoy't, N. Kri'g*. – Mi'r, – 1997, – T. 1. – 432 s.; – T. 2. – S.368-369.