

УДК 62.01

## **МҰНАЙМЕН ЛАСТАНҒАН ЭКОЖҮЙЕЛЕРДІ ТАЗАРТУДЫҢ БИОТЕХНОЛОГИЯЛЫҚ ӘДІСТЕРІ**

**Оразбай Айгерім Берікқызы**

**[aygerim0610@mail.ru](mailto:aygerim0610@mail.ru)**

Л.Н.Гумилев атындағы ЕҰУ жаратылыстану ғылымдары факультетінің магистранты, Нұр-сұлтан, Қазақстан

Ғылыми жетекшісі – А. Мухтаров

Қоршаған ортаны тазарту мәселесі қай кезеңде де өзінің өткірлігін жоғалтпайды. Қазіргі уақытта антропогендік іс –әрекеттер нәтижесінде қоршаған орта улы заттармен ластануда. Осыған байланысты техногендік ластанған аумақтарды тазартудың арзан, экологиялық қауіпсіз және тиімді тәсілдерін іздеу үлкен практикалық қызығушылық тудырады. Осындай балама әдістердің бірі-биологиялық тазарту немесе биоремедиация, оның мәні-ластаушы заттарды жою үшін микроорганизмдерді немесе басқа биологиялық жүйелерді пайдалану .

Қоршаған ортаны ластайтын негізгі заттардың қатарына мұнай мен мұнай өнімдері жатады. Өндіру, тасымалдау және сақтау, сондай-ақ жабдықты дұрыс пайдаланбау кезіндегі төтенше жағдайлардың нәтижесінде мұнайдың төгілуі орын алады, бұл бүкіл топырақ экожүйесіне айтарлықтай зиян келтіреді. Бұл қалпына келтіру әдістерін жасау қажеттілігі туралы мәселені көтереді. Мұнайдың апаттық және созылмалы төгілуі жер өнімділігінің тез жоғалуына немесе ландшафттардың толық тозуына әкеледі.

Топырақ бетіндегі мұнай компоненттері ішінара химиялық тотығуға немесе фотоксидизацияға ұшырайды. Көмірсутектердің одан әрі жойылуы олардың биохимиялық тотығу процестерімен байланысты. Мұнайдың топырақ микроорганизмдерінің кешеніне әсері екі түрлі. Бір жағынан, ол белгілі бір түрлердің өсуін ынталандырады, екінші жағынан – тежейді. Әр түрлі биоклиматтық аймақтарда жүргізілген зерттеулердің көпшілігі мұнаймен ластанған кезде көмірсутекті қышқылдандыратын микроорганизмдердің саны мен

белсенділігі артатынын көрсетті. Олардың мұнаймен ластанған топыраққа ерекше әсер ететіні дәлелденді.

Көптеген зерттеулер микробтардың құрамында зиянды химикаттардың ыдырауына жауап беретін деградациялық ферменттердің алуан түрлілігі бар екенін көрсетті. Табиғи микроорганизмдердің өсуі мен белсенділігін ынталандыруға (биостимуляция) немесе топыраққа селекциялық микроорганизмдер-деструкторларды (Биоаугментация) енгізуге негізделген мұнаймен ластанудан тазартудың микробиологиялық әдістері экологиялық тұрғыдан перспективалы болып табылады.

Топырақтың мұнай өнімдерімен қарқынды ластануы оның негізгі қасиеттерін өзгертеді, тірі организмдердің улануын және өлімін тудырады, ластанған аймаққа іргелес аймақтағы экологиялық жағдайдың өзгеруіне әкеледі. Экологиялық тепе-теңдікті қалпына келтіру, сонымен қатар қоршаған ортаға қойылатын санитарлық және гигиеналық талаптар топырақты ластаушы заттардан тазартуды қажет етеді [1]. Ерекше табиғи-климаттық жағдайлары бар Батыс Қазақстанның осал экожүйелері үшін (күрт континентальды климат, жазғы және қысқы кезең температурасының үлкен ауытқуы, флора мен фаунаның тапшылығы және т.б.) мұнаймен ластанған топырақтың өзін-өзі тазартуы баяу жүреді. Табиғи ресурстарды қарқынды игеру және баяу қалпына келетін табиғи экожүйелер нәтижесінде техногендік әсер ету кезінде оңай жойылатын экологиялық проблемаларды шешудің ерекше тәсілін әзірлеуді талап етеді. Батыс Қазақстан үшін басым шешімдердің бірі деструктор-микроағзаларды қолдана отырып, мұнаймен ластанудан тазартудың биологиялық әдістерін пайдалану болып саналады [2]. Осыған байланысты олардың саны жоғары болуы маңызды (әсіресе экожүйені қалпына келтірудің бастапқы кезеңінде).

Топырақты мұнай өнімдерінен тазартудың үш негізгі әдісі бар: мұнаймен ластанған топырақты жинау және мұнай өнімдерін тазарту, орташа және жоғары жиілікті көмірсутектермен сублимация және алкандардың микробиологиялық ыдырауы. Алғашқы екі әдістің кемшілігі-олардың қымбаттығы, ауаның жану өнімдерімен ластануы немесе мұнайдың сублимациясы және құнарлы топырақтың жойылуы. Осыған байланысты мұнай көмірсутектерін құрудың микробиологиялық әдісі анағұрлым қолайлы, өйткені мұнай фракцияларын микроорганизмдер субстрат ретінде пайдаланады және қалпына келтіру шараларын толық көлемде жүргізгеннен кейін топырақ негізгі қасиеттерін толығымен қалпына келтіреді, ауылшаруашылық айналымына қатысуға жарамды болады [3]. Микроорганизмдерді топырақты мұнай мен мұнай өнімдерінен тазарту үшін пайдалану кезінде екі негізгі бағыт бөлінеді: көмірсутектерді ассимиляциялау және микроорганизмдер қауымдастығын қолдану қабілеті бар микроорганизмдердің бір түрінің таза мәдениетін оқшаулау және таңдау.

Табиғи ортадағы көмірсутектерді биodeградациялаудың екі негізгі тәсілі бар: 1) көмірсутекті қышқылдандыратын (УВО) микрофлораны оның дамуына оңтайлы жағдай жасау арқылы ынталандыру (азот-фосфор тыңайтқыштарын енгізу, аэрация және т. б.); 2) ластанған экожүйеге азот, фосфор, әк және т.б. тұздарын қосумен қатар белсенді УВО-микроорганизмдерді енгізу [4]. Тазартудың неғұрлым перспективалы тәсілі, әсіресе ластанған топырақтың шағын аудандары болған кезде, ластанған топырақты тасымалдаудың қажеттілігі жоқ *in situ* биоөңдеу болып табылады. Процестің тиімділігі бірқатар факторларға, соның ішінде деструктор микроорганизмін дұрыс таңдауға байланысты [5].

Бұл жұмыстың мақсаты мұнаймен ластанған топырақтардан Мұнай көмірсутектерінің деградациясына қабілетті бактериялардың штамдарын оқшаулау болды.

Зерттеу нысаны ретінде Қазақстан Республикасының бұрғылау алаңдарының мұнаймен ластанған топырақтарынан және Ақтөбе қаласының шегінде орналасқан мұнай базасының топырақтарынан микробтық культура әдісімен бөлінген бактериялардың штамдары қызмет етті. Жинақтаушы микробтық дақылдары көміртегі мен энергияның жалғыз көзі ретінде шикі стерильді мұнайды қосумен көмірсутек тотықтырғыш (КТ) микроорганизмдері үшін сұйық ортада өсірілді [6]. Өсіру 14 күн ішінде 28 °C температурада мерзімді жағдайда жүргізілді. Микробтық өсу байқалған жинақталған дақылдардан КТ-

микроорганизмдер, Миллс, Маккланг, Чапек және ет-пептонды агар (МПА) үшін агаризацияланған ортаға себу арқылы жеке колониялардан микроорганизмдердің таза дақылдары бөлінді. Микроағзалар культураларының тазалығы жалпы қабылданған әдістермен анықталды: микроскопиялық бақылау және агаризацияланған қоректік ортаға себу.

Бактериялардың бөлінген штаммдарын культивациялау және КТ-белсенділігін анықтау сұйық қоректік ортада жүргізілді: Чапек, парафин қышқылдандыратын (БҚ) және КТ микроорганизмдер үшін. Көміртегі көзі ретінде 2% стерильді мұнай ортаға енгізілді. Өсіру 14 күн ішінде 190 айн/мин кезінде, +28 °С температурада жүргізілді. Мерзімді түрде визуалды бақылау жүргізіліп, шөгінділер, қабыршақтар, бұлдырлық және мұнай пленкасының өзгеруі байқалды.

Бактериялардың таза культураларының культуралық сұйықтығының эмульгаторлық қабілеті 4 мл зерттелетін сұйықтыққа 4 мл керосин қосып, кейіннен 10 минут шайқау арқылы анықталды [7]. Бөлінген штаммдардың инокуляты МПА бар пробиркаларда 5 тәулік бойы 25°С температурада өсірілді. Содан кейін суспензияның бір бөлігі (4 мл) таңдалды және 15 минут ішінде 6000 айн/мин центрифугаланды.

Нәтижелер және талқылау

Мұнаймен ластанған топырақтардан бактериялардың таза дақылдары бөлініп алынды, олардың ішінен мұнайды көміртегі мен энергияның жалғыз көзі ретінде пайдалануға қабілетті ең белсенді 3 штамм таңдалды. Бактериялардың оқшауланған штамдарының келесі белгілері болды:

- №1 штамм-граммвариабельді жұқа, ұсақ (0,8–1,5) мкм таяқшалар, споралар түзбейді; оксидаз - және каталаза оң, диффузды көк-жасыл пигмент бөледі;
- №2 штамм–спора түзуге қабілетті грам-оң түзу таяқшалар (0,2-2,4 мкм); оксидаз теріс және каталаза оң.
- №3 штамм–диаметрі 0,6-1,2 мкм грам-оң сфералық жасушалар, жалғыз; спора түзбейтін; каталаза оң және оксидаз теріс. МПА-дағы колониялар таза ақ, жылтыр, тегіс;

16s РРНҚ талдауы негізінде бактериялардың оқшауланған штамдары сәйкесінше *Staphylococcus xylosus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Bacillus cereus* ретінде анықталады.

Таңдалған дақылдардың шұңқыр әдісімен анықталған сұйық мұнай көмірсутектерін қолдану қабілеті бактериялардың барлық үш штаммымен көмірсутектерді ассимиляциялауда өте жоғары белсенділікті көрсетті (кесте1). Ең үлкен белсенділік *Pseudomonas aeruginosa*-да байқалды.

| Бактерия                      | Мұнай фракцияларын қосқандағы бактериялардың белсенділігі |       |       |         |             |            |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------|-------|---------|-------------|------------|
|                               | Бақылау                                                   | Мұнай | Мазут | Солярка | Машина майы | Мотор майы |
| <i>Staphylococcus xylosus</i> | 3                                                         | 3     | 3     | 3       | 3           | 3          |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 4                                                         | 4     | 4     | 4       | 4           | 4          |
| <i>Bacillus cereus</i>        | 3                                                         | 3     | 1     | 3       | 3           | 3          |

1 Кесте- Жинақтаушы дақылдан бөлінген бактериялар штаммдарының мұнай мен мұнай өнімдеріне қатысты белсенділігі (Егоров бойынша тест)

Биоэмульгатордың микробтық культурамен пайда болуы суда еритін субстраттарды, оның ішінде мұнай көмірсутектерін тұтыну жағдайларын жақсартуға ықпал ететіні белгілі [8]. Зерттелетін штаммдардың культуралық сұйықтықтарының эмульсиялық қасиеттерін зерттеу бактериялар культуралық сұйықтықты 1:1 қатынасында керосинмен араластыру кезінде эмульсия индексі әртүрлі екенін көрсетті (кесте. 2). Ең жоғары эмульгаторлық қабілет *Bacillus cereus* тән.

| Бактерия               | Сұйықтықтың жалпы көлемі | Эмульсия қабатының көлемі | Эмульгирлеу индексі % |
|------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|
| Bacillus cereus        | 5,2                      | 3,2                       | 60,72                 |
| Staphylococcus xylosus | 4,7                      | 1,6                       | 30,95                 |
| Pseudomonas aeruginosa | 4,9                      | 1,1                       | 23,00                 |

## 2 Кесте - Бактериялардың эмульгаторлық белсенділігі

Bacillus cereus, Staphylococcus xylosus және Pseudomonas aeruginosa бактерияларының бөлініп алынған штамдары көміртегі мен энергияның жалғыз көзі ретінде мұнай мен мұнай өнімдерінің қатысуымен өте жоғары қарқынмен өседі және мұнай көмірсутектерінің микробтық тозуын одан әрі зерттеуге итермелейді. Бұл биологиялық өнімдерді алу және мұнаймен ластанған топырақты тазарту әдістерін жасау үшін деструктор штамдарын пайдалану перспективаларын тудырады.

Көмірсутекті ластаушы белсенді микроорганизмдерді-деструкторларды таңдау кезінде келесі талаптар сақталады: патогендік емес, аэробты және факультативті-анаэробты микроорганизмдер арасында микроорганизм-деструкторды таңдау, жоғары өміршеңдік. Мұнаймен ластанған топырақтың аборигендік микрофлорасынан белсенді көмірсутекті қышқылдандыратын микроорганизмдерді бөлу, қолдану жағдайларын кеңейту үшін қауымдастықтарды құру деструктивті биологиялық өнімдерді дамытудың перспективалы бағыттарының бірі болып табылады. Химиялық құрамы бойынша анықталған ластануларды жою үшін әртүрлі топырақ-климаттық аймақтарда биопрепараттарды қолданудың тиімділігі көмірсутекті қышқылдайтын микроорганизмдердің физиологиялық-биохимиялық қасиеттерімен (термотолеранттылық, осмофильділік, рН мәні өсуі үшін оңтайлы және т.б.) шартталған.

### Қолданылған әдебиеттер тізімі

1. Киреева Н.А. Влияние загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами на численность и видовой состав микромицетов / Н.А. Киреева, Н.Ф. Галимзянова // Почвоведение, 1995.- №2,- С.211-216.
2. Логинов О.Н. Биотехнологические методы очистки окружающей среды от техногенных загрязнений / О.Н. Логинов, Н.Н. Силищев, Т.Ф. Бойко, Н.Ф. Галимзянова.– Уфа: Гос. изд. научно-тех. литературы «Реактив», 2000. – 100 с.
3. Сидоров Д.Г. Полевой эксперимент по очистке почв от нефтяного загрязнения с использованием углеводородокисляющих микроорганизмов / Д.Г. Сидоров, И.А. Борзенков, Р.Р. Ибатулин, Е.И. Милехина, И.Т. Храмов, С.С. Беляев, М.В. Иванов // Прикладная биохимия и микробиология.- 1997.- Т.33, №5.- С.497-502.
4. Шамраев А.В., Шорина Т.С. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды // Вестник Оренбургского государственного университета. 2009. №6. С. 642-645.
5. Кобзев Е. Н., Шкидченко А.И. Оценка углеводородокисляющей активности микроорганизмов // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Т 39. №1. С. 25-31.
6. Нгуен Тиен, Сопрунова Б.О. Поиск и выявление новых бактериальных штаммов с полифункциональными свойствами в техногенных субстратах // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. Т. 13 №5(3). С. 167-170.
7. Киреева Н.А., Григориади А.С., Хайбулина Е.Ф. Ассоциации нефтеокисляющих микроорганизмов для биоремедиации нефтезагрязненных почв // Вестник Башкирского университета. 2009. Т. 9. №2. С. 391-394.

8. Бабаев Э.Р., Мамедова П.Ш., Кулиева Д.М., Мовсумзаде М.Э. Выбор активного микроорганизма-деструктора углеводов для очистки нефтезагрязненных почв Балаханского месторождения // Башкирский химический журнал. 2009. Т. 16. №1. С. 103-106.
9. Plakunov V.K., Zhurina M.V., Beliaev S.S. Resistance of the petroleum-oxidizing microorganism *Dietzia* sp. to hyperosmotic shock in reconstituted biofilms // *Microbiologia*. 2008. №77(5). P. 581-590.
10. Патент RU 2 352 630 C1, опубликовано 20.04.2009. «Способ выделения и активации консорциума аборигенных микроорганизмов-деструкторов нефти и нефтепродуктов» (прототип)
11. Патент CN 104388312, опубликовано 12.10.2014. «Screening method for petroleum degrading bacteria, method for preparing petroleum degrading bacteria inoculant from screened bacteria, and application of inoculant».
12. Патент RU 2 426 781 C2, опубликовано 20.08.2011. «Способ выбора штаммов микроорганизмов-деструкторов нефти и нефтепродуктов».
13. Фокина А.И., Злобин С.С., Домрачева Л.И., Трефилова Л.В. Свойства некоторых видов грибов р. *Fusarium* – основа для создания биосорбента тяжёлых металлов // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2012. №2. С. 49-52.
14. Фрейберг И.А., Фэн Фуцзюань К вопросу ремедиации почв лесных питомников от пестицидной токсичности с помощью микроорганизмов // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2013. №4. С. 41-43.
15. Чеботарь В.К., Щербаков А.В., Чижевская Е.П., Петров В.Б. Влияние засоления и тяжелых металлов на ростстимулирующую и антагонистическую активность почвенных бактерий и перспективы использования микроорганизмов для биоремедиации почв // Достижения науки и техники АПК. 2011. №7. С. 28–31.
16. Кожевин П.А. Биотический компонент качества почвы и проблема устойчивости // Почвоведение. 2001. №4. С. 44–48.
17. Рогозина Е.А., Калимуллина Г.К. Балансовая сторона и динамика утилизации микроорганизмами нефтяного загрязнения почвы // Нефтегазовая геология. Теория и практика: электронный науч. журн. 2009. №4. URL: [http://www.ngtp.ru/7/19\\_2009.pdf](http://www.ngtp.ru/7/19_2009.pdf).
18. Бабаев Э.Р. Анализ активности штаммов-деструкторов в отношении нефтезагрязнений почв Апшеронского полуострова // Башкирский химический журнал. 2010. Том 17. № 2. С. 17–20.
19. Кудрина Е.А., Максимов А.Ю. Биodeградация дибензотиофена и алканов нефти бактериями рода *Rhodococcus* // Актуальные аспекты современной микробиологии: тез. III Междунар. молодежной школы-конференции. М., 2007. С. 57–58.
20. Дегтярева И.А., Хидиятуллина А.Я. Оценка влияния природных ассоциаций углеводородокисляющих микроорганизмов на состояние нефтезагрязненной почвы // Ученые записки Казанского ун-та. 2011. Том 153. кн. 3. С. 137–143.