

DOI 10.54596/2309-6977-2022-3-30-43

ӘОЖ 579.6

ҒТАМА 69.25.03

**МҰНАЙМЕН ЛАСТАНҒАН ТОПЫРАҚТАН АБОРИГЕНДІ ШТАМДАРДЫ
БӨЛІП АЛУ ЖӘНЕ ИДЕНТИФИКАЦИЯЛАУ****Махатаева Б.Б.¹, Уалиева П.С.², Абдиева Г.Ж.³, Онгарбаев Е.К.^{4*}, Мәлік А.М.⁵**^{1,2,3,5}*Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан*^{4*}*Жану проблемалары институты, Алматы, Қазақстан***E-mail: bmakhatayeva@mail.ru, ualievala_perizat@mail.ru, abdievagzh@mail.ru,
azhar.malickyzy@gmail.com***Аңдатпа:**

Мұнай өндіру және мұнай өңдеу салаларының үлкен жетістіктері мұнай поллютанттарының топыраққа, су қоймаларына және басқа да қоршаған орта объектілеріне тұрақты түсуімен қатар жүреді. Олардың уытты әсеріне байланысты ауыл шаруашылығына үлкен зиян келтіріледі, егістік жерлер пайдаланудан шығарылады, су экожүйелерінің жұмыс істеуі және тұтастай алғанда планетадағы өмір бұзылады. Мұнайотықтырушы микроорганизмдер мұнаймен ластанған экожүйелерді тазартуда жетекші рөл атқарады. Қазіргі уақытта неғұрлым перспективалы болып органикалық ластағыштарды көміртек көзі ретінде пайдалануға қабілетті микроорганизмдер негізіндегі биопрепараттар көмегімен сыртқы орта объектілерін биоремедиациялау әдістері ұсынылады. Бұл мақалада мұнаймен ластанған топырақтан аборигенді штамдарды бөліп алу және оларды идентификациялау жүргізілген.

Түйін сөздер: аборигенді штамдар, мұнай, микроорганизмдер, идентификация, деструктор-штамдар, мұнаймен ластанған топырақ.

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕСТНЫХ ШТАММОВ
ИЗ ЗАГРЯЗНЕННОЙ НЕФТЬЮ ПОЧВЫ****Махатаева Б.Б.¹, Уалиева П.С.², Абдиева Г.Ж.³, Онгарбаев Е.К.^{4*}, Мәлік А.М.⁵**^{1,2,3,5}*Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан*^{4*}*Институт проблем горения, Алматы, Казахстан***E-mail: bmakhatayeva@mail.ru, ualievala_perizat@mail.ru, abdievagzh@mail.ru,
azhar.malickyzy@gmail.com)***Аннотация:**

Большие достижения нефтедобывающей и нефтеперерабатывающей отраслей сопровождаются постоянным поступлением нефтяных поллютантов в почву, водоемы и другие объекты окружающей среды. Из-за их токсического воздействия наносится большой ущерб сельскому хозяйству, выводятся из эксплуатации пахотные земли, нарушается функционирование водных экосистем и жизнь на планете в целом. Нефтедержущие микроорганизмы играют ведущую роль в очистке нефтезагрязненных экосистем. В настоящее время предложены наиболее перспективные методы биоремедиации объектов внешней среды с помощью биопрепаратов на основе микроорганизмов, способных использовать органические загрязнители в качестве источников углерода. В этой статье было проведено выделение аборигенных штаммов из нефтезагрязненных почв и их идентификация.

Ключевые слова: аборигенные штаммы, нефть, микроорганизмы, идентификация, деструктор-штаммы, нефтезагрязненная почва.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ABORIGINAL STRAINS
FROM OIL-CONTAMINATED SOIL

Makhatayeva B.B.¹, Ualieva P.S.², Abdieva G.Zh.³, Ongarbayev E.K.^{4*}, Malik A.M.⁵

^{1,2,3,5}*Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan*

^{4*}*The institute of combustion problems, Almaty, Kazakhstan*

*E-mail: bmakhatayeva@mail.ru, ualieva_perizat@mail.ru, abdievagzh@mail.ru,
azhar.malickyzy@gmail.com*

Annotation:

The great achievements of the oil production and refining industries are accompanied by a constant influx of oil polluting substances into the soil, reservoirs and other environmental objects. Due to their toxic effects, great damage is caused to agriculture, arable land is decommissioned, and the functioning of aquatic ecosystems and life on the planet as a whole are disrupted. Oil-producing microorganisms play a leading role in cleaning oil-contaminated ecosystems. Currently, the most promising methods of bioremediation of objects of the external environment with the help of biologics based on microorganisms capable of using organic pollutants as carbon sources are proposed. In this article, the separation of Aboriginal strains from oil-contaminated soil and their identification were carried out.

Keywords: aboriginal strains, oil, microorganisms, identification, destructive strains, oil-contaminated soil.

Кіріспе

Қазақстан Республикасында мұнай кен орындарын қарқынды игеру едәуір шаруашылық маңызы бар жерлерді алып жатқан мұнай өндіру қалдықтарын жинақтайтын полигондардың ұлғаюына, технологиялық объектілерге іргелес аумақтардың, ауаның, судың санитарлық жай-күйінің нашарлауына алып келді, бұл сөзсіз өңірдегі өткір экологиялық проблемаларға алып келеді.

Топырақтың мұнайдан өзін-өзі тазарту процесін жеделдету үшін экожүйенің барлық табиғи қорлары, соның ішінде биологиялық резервтер қолданылады. Топырақты тазартудың микробиологиялық әдістері әртүрлі технологияларды толықтыра алады, ал белгілі бір жағдайларда олардың аналогтары жоқ, сондықтан физика-химиялық әдістер ластанудың үлкен пайызын тазалайды, бірақ топырақтағы мұнай өнімдерінің көлемі 20%-дан төмен концентрациясында тиімді емес.

Органикалық экотоксиканттарды биологиялық залалсыздандыру технологиялары аборигендік микрофлораны белсендіруге немесе микроорганизмдердің белгілі бір дақылдарын топыраққа енгізуге, микроорганизмдердің дамуы үшін оңтайлы орта құруға негізделген.

Ферменттермен катализденетін реакциялар сериясы арқылы органикалық сипаттағы поллютанттар микробтық клеткалардың негізгі метаболизміне енеді. Осы қосылыстардың молекулаларындағы көміртек атомдары биогендік қосылыстардың синтезіне өтеді немесе микроорганизмдерге қажетті энергия беріп, көмірқышқыл газына тотығады.

Зерттеулер көрсеткендей, тазалаудың тиімділігін арттыру үшін әртүрлі ксенобиотиктерді жоюға қабілетті ластанған биообъектілерден арнайы бөлінген деструктор штамдарын қолдану қажет [2; 3; 4].

Мұндай штамдарды қолдану ықшам, экономикалық тиімді жергілікті тазарту қондырғыларын құруға мүмкіндік береді, онда белгілі бір жағдайларда негізгі ластанушы заттардың толық жойылуын қамтамасыз ететін және осылайша мұнайдың үлкен

аумақтарға таралуын болдырмайтын арнайы микроорганизмдердің көмегімен күрделі органикалық қосылыстардың жойылу процестері жүреді.

Соңғы онжылдықтардағы жұмыстар тазарту қондырғыларының тиімділігін арттыруға әртүрлі тасымалдаушыларда иммобилизацияланған микроорганизмдер-деструкторлардың клеткаларын қолдану арқылы қол жеткізуге болатындығын көрсетті [5; 6; 7; 8]. Бұл клеткалардың қатты беттерге бекітілуі микробтық клеткалардың әсер ету аймағында жоғары концентрациясын қамтамасыз етеді, олардың сілтіленуіне жол бермейді, мұнайдың улы компоненттерінің жоғары концентрациясының әсерінен қорғайды және микрофлораның нақты деструктивті белсенділігін арттыруға мүмкіндік береді. Иммобилизацияланған биодеструкторлардың препараттарын алу үшін әртүрлі әдістер мен тасымалдаушылар қолданылады. Осылайша, су бетін ароматты қосылыстардан тазарту үшін қарапайым және салыстырмалы түрде арзан әдіс— әртүрлі тасымалдаушылардағы микробтық жасушаларды адсорбциялау - кеңінен қолданылады - химиялық және биологиялық инертті, суда ерімейтін [9; 10].

Жоғарыда аталғандардың барлығы табиғи ортадан абorigендік штамдарды бөлуге негізделген қоршаған орта объектілерін мұнаймен ластануды биоремедиациялаудың жаңа технологияларын жасау үшін көмірсутек тотықтырушы микроорганизмдердің жаңа штамдарын іздестіру жөніндегі зерттеулердің өзектілігін айқындайды - жоғары биодеструктивті белсенділіктің көрінісі үшін оңтайлы жағдайларды таңдау, сондай-ақ биологиялық өнімдердің технологиялық қасиеттерін арттыру, мысалы, оларды алу мен пайдаланудың қарапайымдылығы, тиімділігі мен жұмыс істеу ұзақтығы және т.б. белсенді микробтық клеткаларды қатты тасымалдаушыларға бекіту арқылы.

2. Материалдар мен әдістер

Микроорганизмдердің әртүрлі топтарының санын анықтау

Топырақ микроорганизмдерінің әртүрлі топтарының санын ластаушы заттарға төзімді физиологиялық топтарды анықтау және қоймаларға жақын жерлерде топырақ пен су микрофлорасының микробиологиялық құрамын салыстыру үшін топырақ суспензиясын тығыз қоректік ортада біртіндеп сұйылту арқылы жүргізілді. Клеткалар санын анықтау Кох әдісімен жүргізілді. Әдістің мәні – микроорганизмдердің зерттелетін суспензиясының белгілі бір көлемін Петри табақшасына тығыз ортаға себу және инкубациядан кейін өскен колонияларды санау. Егу Петри табақшаларында агарлы ортада жүзеге асырылады. Жалпы микробтық санды анықтау үшін ет-пептонды агар (ЕПА), топырақтағы саңырауқұлақтар құрамын анықтау үшін – сусло-агар (СА), микроорганизмдердің әртүрлі физиологиялық топтарының санын анықтау үшін сәйкес қоректік орталар пайдаланылады. Зеңдер Чапек–Докстың агарлы ортасында саналды, аммонификациялайтын бактериялар ГРМ-агарда, азотты бекітетін бактериялар Эшби ортасында, аэробты целлюлозолитикалық бактериялар Хетчинсон мен Клейтонның тығыз қоректік ортасында саналды.

Дақылдарды өсіру гетеротрофты бактериялар бөлінген кезде 2 күн ішінде 28°C температурада термостатта, актиномицеттер, азотты бекітетін және қалыптар бөлінген кезде 5-7 күн және целлюлозолитикалық бактериялар бөлінген кезде 7-9 күн ішінде жүргізілді. Дақылдарды инкубациялағаннан кейін өсірілген колониялардың сандық есебі жүргізілді және 1 г топырақтағы колония түзуші бірліктердің (КТБ) саны анықталды.

Топырақ үлгілерінен таза дақылдарды бөлу әдістері

Таза дақылдарды алу тығыз ілмекті жағу әдісі арқылы яғни, қоректік ортаның бетіне механикалық бөліну арқылы жасалды [11]. Жеке колониялар тазалығы микроскопия арқылы тексеріп, өсіру үшін қиғаш қоректік агарға егілді.

Бөлінген микроорганизмдердің морфолого-культуралық, физиолого-биохимиялық қасиеттерін зерттеу әдістері

Бактериялардың морфологиялық, физиологиялық және биохимиялық белгілерін зерттеу жалпы қабылданған әдістерге сәйкес жүргізілді. Микроорганизмдердің бөлінген таза дақылдарының морфологиялық және культуралды қасиеттері келесі белгілер бойынша зерттелді: клеткалардың пішіні мен орналасуы, клетка мөлшері, қозғалғыштығы, эндоспоралардың болуы, Грам бойынша боялуы, қатты қоректік ортадағы колонияның сипаттамасы, сұйық қоректік ортадағы өсу сипаты, қиғаш агардағы өсу сипаты. Бактериялар мен ашытқылардың физиологиялық және биохимиялық қасиеттері келесі белгілермен анықталды: бактериялардың 42°C-та өсуі, желатин, крахмал, казеин гидролизі, каталазаның болуы және молекулалық азоттың қолданылуы, әртүрлі көмірсулар мен спирттердің ашытуы [12].

Бөлінген микроорганизм штамдарын молекулярлық-генетикалық идентификациялау

Геномдық ДНҚ өндірушінің хаттамасына (Invitrogen, Carlsbad, USA) сай PureLink Genomic DNA Kit ДНҚ бөліп алуға арналған жинақтың көмегімен бактериялардың тәуліктік дақылынан бөлініп алынды. Үлгілердегі ДНҚ концентрациясы Qubit® 2.0 флуориметрінде Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, Oregon, USA) жиынтығын қолданумен анықталды. Генетикалық маркер ретінде рРНҚ-ның 16S генінің бөлімі қолданылды. 16S учаскесін амплификациялау үшін РНҚ 25 мкл реакция қоспасы дайындалды: 12,5 µl Q5® hot Start High-Fidelity 2x Master Mix (New England Biolabs Ins., USA); универсалдыпраймерлер жұбы: 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGCTCAG-3') және 806r (5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3') 10 мкм концентрациясында 1,2 мкл; ДНҚ матрицасы және су 25 мкл дейін. Амплификация режимі келесі циклдерден тұрды: 5 минутта 95°C, содан кейін: 95°C – 30 секунд, 55°C – 40 секунд, 72°C – 50 сек - 30 цикл; 10 минут ішінде 72°C кезінде элонгация [13].

ПТР-өнімді тазарту CleanSweep™ PCR Purification (Life Technologies, Carlsbad, CA) реагенті арқылы жүргізілді. Бактериялардың 16S rRNA генінің фрагменттерін ретке келтіру өндірушінің хаттамасына сәйкес BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, АҚШ) жиынтығын қолдана отырып жүргізілді (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol Applied Biosystems, АҚШ), содан кейін фрагменттерді 3500 DNA генетикалық автоматты генетикалық анализаторында бөлді (Applied Biosystems, Hitachi, Tokyo Japan).

Секвенирлеу нәтижелері SeqA (Applied Biosystems) бағдарламасында өңделді. 16S rRNA гендерінің гомологиялық нуклеотидтік тізбегін іздеу АҚШ Ұлттық биотехнологиялық ақпарат орталығының Gene Bank халықаралық деректер базасында (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) бағдарламасының көмегімен жүзеге асырылды [14]. Филогенетикалық анализ MEGA 6 бағдарламалық жасақтамасын қолданумен жасалды [15]. Нуклеотидтер тізбегін тұралау ClustalW алгоритмін қолданып жүргізілді. Филогенетикалық көршілерді анықтау үшін BLASTN Neighbor-Joining (NJ) әдісі қолданылды [16].

3 Нәтижелер және оларды талқылау

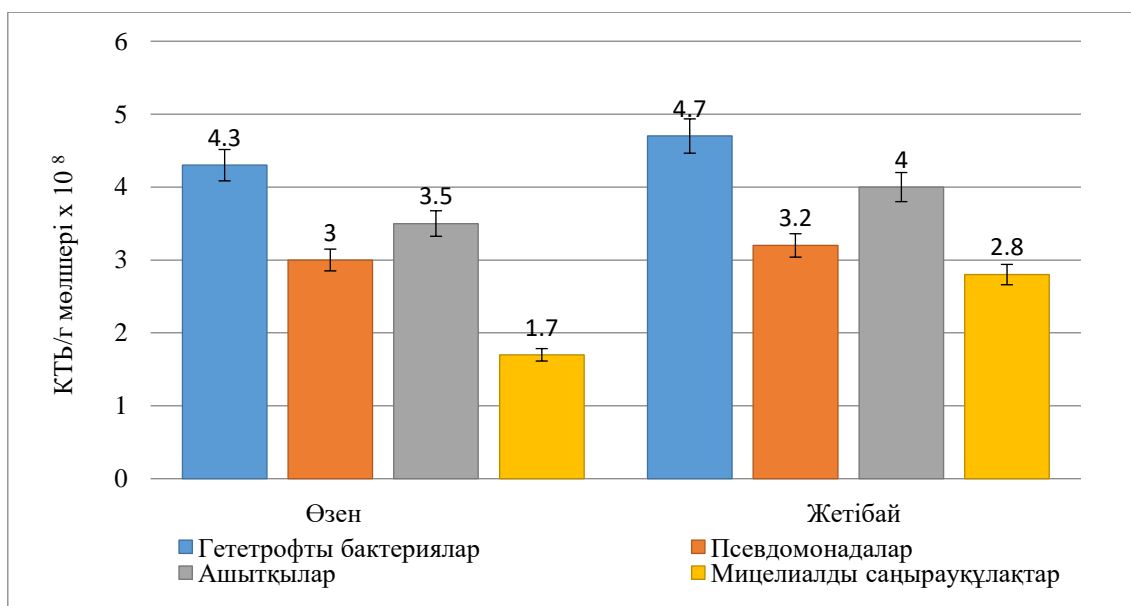
3.1. Өзен және Жетібай кен орындарында мұнаймен ластанған топырақтың микробтық әртүрлілігін зерттеу.

Топырақтың сапалық көрсеткіштерінің бірі – оның микробтық белсенділігі. Топырақтың микробиоценозы оның потенциалды құнарлылығын, микроорганизмдердің

өмірлік белсенділігіне байланысты биохимиялық процестердің жалпы нәтижесін сипаттайды. Топырақ микроорганизмдері кешендерінің сапалық және сандық құрамы топырақ жағдайының маңызды диагностикалық көрсеткіші болып табылады, бұл микробтық қауымдастықтардың жекелеген өкілдерінің экологиялық жағдайлардың өзгеруіне жоғары сезімталдығымен байланысты [17]. Топырақтың денсаулығы органикалық заттардың синтезі мен деградациясының, азотты бекітудің, гумификацияның, биогендік элементтердің циклінің және т. б. маңызды функцияларын жүзеге асыратын микроорганизмдердің белгілі бір физиологиялық топтарының болуына байланысты [18].

Ластанған табиғи объектілерден оқшауланған, жоғары тиімді мұнай тотықтырушы микроорганизмдер штамдарын қолдануға негізделген қазіргі заманғы микробиологиялық әдіс, рекультивациялау рекультивациялық іс-шараларда кеңінен қолданылады [19]. Көмірсутек тотықтырушы микроорганизмдер (бактериялар, ашытқы саңырауқұлақтары, актиномицеттер) топырақ биоценоздарының тұрақты компоненттері болып табылады.

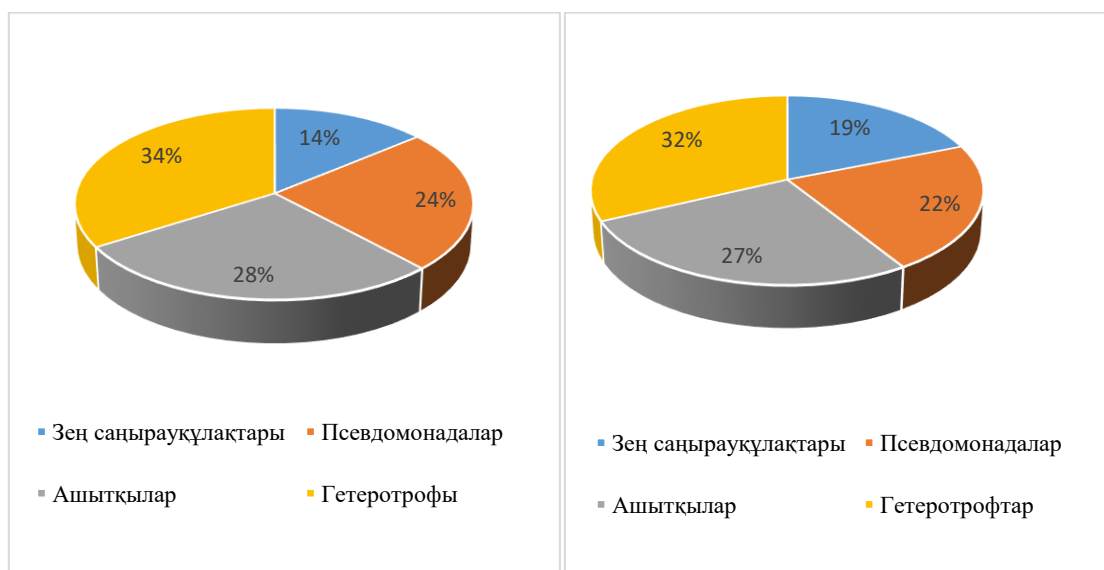
Жұмыста Өзен және Жетібай кен орындарында мұнаймен ластанған топырақтың микробтық әртүрлілігі зерттелді. Нәтижелер 1-суретте көрсетілген.



Сурет 1. Өзен және Жетібай кен орындарының мұнаймен ластанған топырақтардың микробтық әртүрлілігі

Өзен кен орнының мұнаймен ластанған топырағының микробтық әртүрлілігін талдау деректері бойынша гетеротрофты бактериялардың саны – $4,3 \times 10^8$ КТБ/г, псевдомонадалардың саны – $3,0 \times 10^8$ КТБ/г, ашытқылардың саны – $3,5 \times 10^8$ КТБ/г құрады, ал мицелиалды саңырауқұлақтардың саны гетеротрофты бактерияларға карағанда біршама төмен болды. Жетібай кен орнының топырақ үлгілерінде гетеротрофты бактериялар саны – $4,7 \times 10^8$ КТБ/г, псевдомонадалар саны – $3,2 \times 10^8$ КТБ/г, ашытқы және мицелиалды саңырауқұлақтар саны – сәйкесінше $2,8 \times 10^8$ және $4,0 \times 10^8$ КТБ/г құрады.

Жұмыстың келесі кезеңдерінде Өзен және Жетібай кен орындарындағы топырақ үлгілеріндегі микрофлораның сапалық және сандық құрамы зерттелді (2-сурет).



Сурет 2. Өзен және Жетібай кен орындарындағы топырақ үлгілеріндегі микрофлораның сапалық және сандық құрамы

Өзен кен орнының топырақ үлгілеріндегі микрофлораның сапалық және сандық құрамын зерттеу нәтижесінде микрофлорада гетеротрофты бактериялар (34%) және ашытқылар (28%) басым екендігі көрсетілді. Псевдомонадалардың саны 24%, зең саңырауқұлақтарының саны – 14%. Жетібай кен орнындағы топырақ үлгілерінде микрофлорада гетеротрофты бактериялар (32%) және ашытқылар (27%) басым. Псевдомонадалар мен зең саңырауқұлақтарының саны сәйкесінше 22% және 19% болып, төмен болды.

Мұнай көмірсутектерінің жойылуында негізгі рөлді көмірсутектерді көміртек пен энергияның жалғыз көзі ретінде пайдалануға қабілетті микроорганизмдер атқарады. Мұнайдың биодеградациясын жеделдетудің бір тәсілі мұнай көмірсутектерін пайдалануға қабілетті арнайы микроорганизм-деструкторларды қолдану, яғни табиғи ортаны тазарту биотехнологиясын құру болуы мүмкін.

3.2 Мұнаймен ластанған топырақтардан аборигендік мұнай тотықтырушы штамдарды бөлу

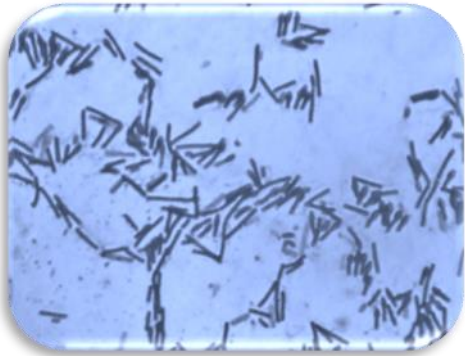
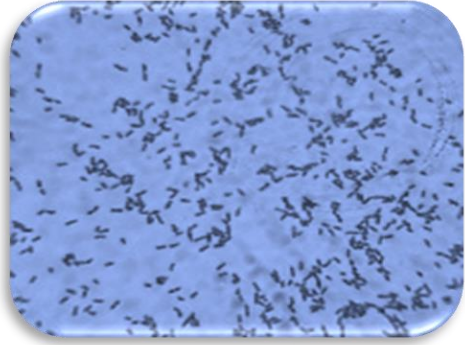
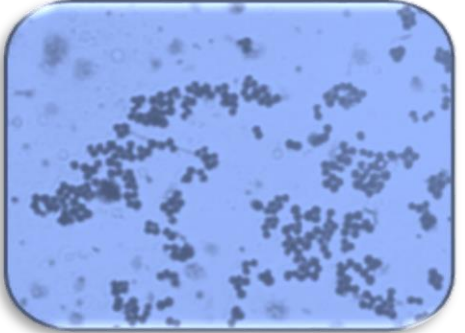
Мұнай өндіру, өңдеу және тасымалдау жүргізілетін аумақтардың топырақтары мен суларындағы мұнай ластануының өсіп келе жатқан шоғырлануы табиғи тазарту процестерінің жүруіне кедергі келтіреді және адамның араласуын талап етеді. Қазіргі уақытта топырақ пен судың жағдайын қалпына келтіру үшін қолданылатын ең тиімді технология – бұл биоремедиация, оны жүргізу микробтық клеткаларға негізделген жоғары белсенді биодеструкторлардың болуын талап етеді.

Жергілікті микрофлораның өкілдері осы аймаққа тән ластаушы заттарға өте бейімделгендіктен, мұнай құрылымдық препаратын жасау ластанған топырақтардан белсенді көмірсутек тотықтырушы микроорганизмдерді бөліп алуды және олардың қасиеттерін зерттеуді қажет етеді.

Қоршаған ортадағы айналымдағы мұнай мен мұнай өнімдерінің деградациясында үлкен рөл топырақ микроорганизмдеріне тиесілі. Сондықтан ксенобиотиктердің микробиологиялық жойылуын зерттеудің қазіргі кезеңі деструктор-штамдардың физиологиялық, биохимиялық және генетикалық ерекшеліктерін зерттеуге деген қызығушылығымен сипатталады [20]. Осыған байланысты жұмыста Өзен және Жетібай

кен орындарынан бөлінген аборигенді микроорганизмдер штамдарының морфолого-культуралдық және физиолого-биохимиялық қасиеттері зерттелді. 1-кестеде микроорганизмдердің аборигенді штамдарының морфолого-культуралық қасиеттері көрсетілген.

Кесте 1. Аборигенді микроорганизм штамдарының морфолого-культуралдық қасиеттері

Клеткалар морфологиясы	Морфолого-культуралдық қасиеттердің белгілері
1	2
 <p style="text-align: center;"><i>B1</i></p>	<p>Грам-оң, таяқша тәрізді бактериялар түзу таяқшалар түрінде және өлшемі 0,5-1,0 x 1,5 – 3,0 мкм болатын екі полярлы флагелла түрінде болады. Тығыз қоректік ортада жұқа жылтыр жабын, тегіс емес шеті бар дөңес колониялар пайда болады.</p>
 <p style="text-align: center;"><i>B2</i></p>	<p>Грам-теріс, тік таяқшалар, дөңгелек ұштары бар, өлшемі 0,2-0,5 x 1,2-1,5 мкм, жеке орналасқан. Перитрихияльды флагелла есебінен жылжымалы.</p>
 <p style="text-align: center;"><i>B3</i></p>	<p>Мөлшері 0,5 x 1,2 мкм болатын Грам-оң, кокка тәрізді бактериялар, қозғалмайды. Олар ұсақ, тегіс, дөңес, ақ колонияларды құрайды.</p>



1 кестеден көріп отырғанымыздай, морфолого-культуралдық белгілері бойынша *B1* штаммы – Грам-оң, үлкен таяқшалар, *B2* штаммы – Грам-теріс, тұзу таяқшалар, *B3* штаммы – Грам-оң, кокка тәрізді бактериялар, *B4* штаммы-сопақша, клеткалар үлкен.

2 кестеде негізгі диагностикалық белгілері бойынша бөлінген штамдардың сипаттамасы берілген.

Кесте 2. Таңдалған штамдардың негізгі диагностикалық белгілері

№ п/п	Культура	Клеткалар пішіні	Грам бойынша боялуы	Қозғалғыштығы	Споралар	Желатиннің гидролизі	Крахмал гидролизі	Казеин гидролизі	Каталазаның болуы	Молекулалық азотты қолдануы	42°С-та өсуі	Молекулалық оттегіге қатынасы
1	<i>B1</i>	т	+	-	+	+++	++	++	+	+	+++	аэробтар
2	<i>B2</i>	т	-	+	-	++	++	+	+	+	++	аэробтар
3	<i>B3</i>	к	+	-	-	++	+++	+++	+	-	++	аэробтар
4	<i>B4</i>	с	-	-	-	+	+	++	+	-	-	анаэробтар

Ескертпе - т- таяқша тәрізді клеткалар; к-кокка тәрізді клеткалар, с-сопақша клеткалар; + - осы белгі бойынша оң; - - осы белгі бойынша теріс

Кестеде көрсетілген мәліметтер негізінде мұнаймен ластанған топырақ үлгілерінен бөлініп алынған микроорганизмдер Грам-оң таяқшалар мен коккалар, Грам-теріс таяқша тәрізді бактериялар мен сопақша клеткаларға жататындығы анықталды. Зерттелген дақылдардың ішінде *B1* штаммы спора түзеді, *B2*, *B3*, *B4* штамдары спора түзбеді. *B2* штамдарынан басқа барлық бөлінген штамдар қозғалмайды. Көптеген дақылдар 42°С температурада жақсы өсті, *B4* штаммы 28-30°С температурада жақсы өсуді көрсетті. молекулалық оттегінің қатысуымен дақылдардың өсуін зерттеу кезінде *B1*, *B2*, *B3* штамдары аэробты, ал *B4* штаммы анаэробты болды. Барлық штамдар каталаза-оң, крахмал мен казеинді гидролиздейді, желатинді сұйылтады.

Морфолого-культуралдық және физиолого-биохимиялық қасиеттерін зерттеу нәтижесінде таңдалған культуралар *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Candida* туыстарына жатқызылды.

Әдебиеттерге сәйкес, *Pseudomonas* және *Bacillus* тектес бактериялар белсенді мұнай-деструктор штамдар, көмірсутек тотықтырғыштар, жоғары ферментативті белсенділікпен және топырақтың мұнай және мұнай өнімдерімен, көмірсутектермен жүйелі ластануы сияқты қолайсыз экологиялық факторларға төзімділігімен сипатталады.

Жоғарыда баяндалғанды ескере отырып, одан әрі зерттеулерде осы культуралардың өсу параметрлері, олардың шунгит негізінде тасымалдаушыларда сорбциялану қабілеті, мұнаймен ластанған топырақтар мен органикалық ластауыштардан су қоймаларын биоремедиациялауға арналған жаңа биопрепараттар құрамына енгізу мақсатында мұнайға қатысты деструктивті белсенділік зерделенетін болады. 3.3 Сенгер бойынша геннің 16S rRNA секвенирлеу әдісімен микроорганизм-деструктор штамдарын молекулалық-генетикалық идентификациялау.

Мұнай көмірсутектерін сіңіру қабілеті әртүрлі жүйелік топтардың микроорганизмдеріне тән - микромицеттер, ашытқылар мен бактериялар және т.б. олардың негізгі сипаттамасы ароматты заттарды қоса алғанда, көмірсутектердің кең спектрін сіңіру қабілеті саналады. Мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған топырақ пен су қоймаларының биоремедиациясының биологиялық өнімі ретінде оларды қолдану дәл осы қабілетке негізделген. Бөлінген дақылдардың морфолого-культуралдық және физиолого-биохимиялық белгілерін зерттеу жалпы қабылданған әдістер мен молекулалық-генетикалық әдістер бойынша жүргізілді [12]. Барлық зерттелген дақылдардан мұнайдың ыдырау дәрежесін зерттеу нәтижелері бойынша *B1* және *B2* штамдары жоғары мұнай өткізгіштік белсенділігін көрсетті. Осыған байланысты, бұл штамдар түрге дейін анықтау үшін таңдалды. Микроорганизмдерді молекулалық-генетикалық сәйкестендіру Сенгер бойынша секвенирлеу әдісімен жүргізілді. ПТР әдісімен 16S rRNA генінің фрагменті амплификацияланды, шамамен 700 ж.н. Үлгілерді амплификациялау нәтижелері 4-кестеде көрсетілген. ДНҚ генінің 16s rRNA фрагментін амплификациялау өнімдерінің электрофорграммасы.

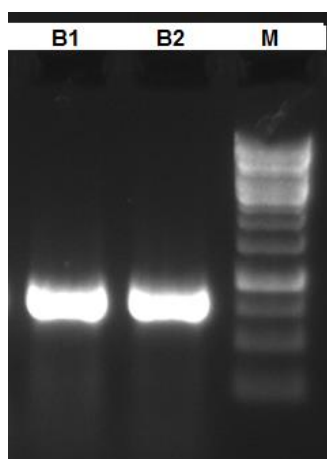
Кесте 4. Qubit флуориметрінің көрсеткіштері бойынша ДНҚ концентрациясы

№ п/п	Сынаманың атауы	Концентрация, нг/мкл
1	B1	65,6
2	B2	60,0

Алынған ДНҚ-дан ПТР арқылы 16s rRNA генінің фрагменті амплификацияланды, шамамен 600 ж.н. Үлгілерді амплификациялау нәтижелері 6-суретте көрсетілген.

Секвенирлеу реакциясынан кейін ПТР өнімін екінші тазарту BigDye X Terminator Purification Kit секвенирлеу реакцияларын тазарту жиынтығымен жүргізілді және капиллярлық фореозді жүргізу үшін ABI 3500 генетикалық анализаторына жүктелді.

Анықталған штамдар генінің 16S rRNA нуклеотидтік тізбегі талданды және SeqA (Applied Biosystems) бағдарламалық жасақтамасында жалпы бірізділікке біріктірілді. Ұзындығы шамамен 600 ж. н. нуклеотидтер реттілігін алғаннан кейін, BLAST алгоритмі бойынша GeneBank Халықаралық деректер базасында сәйкестендіру жүргізілді. Зерттелген штамдардың нуклеотидтік тізбегі және 16S rRNA гендік тізбегін филогенетикалық талдау қорытындылары генетикалық қашықтықты есептеудің кластерлік әдісін қолдана отырып, MEGA6 бағдарламасында салынған ағаштар түрінде келтірілген.

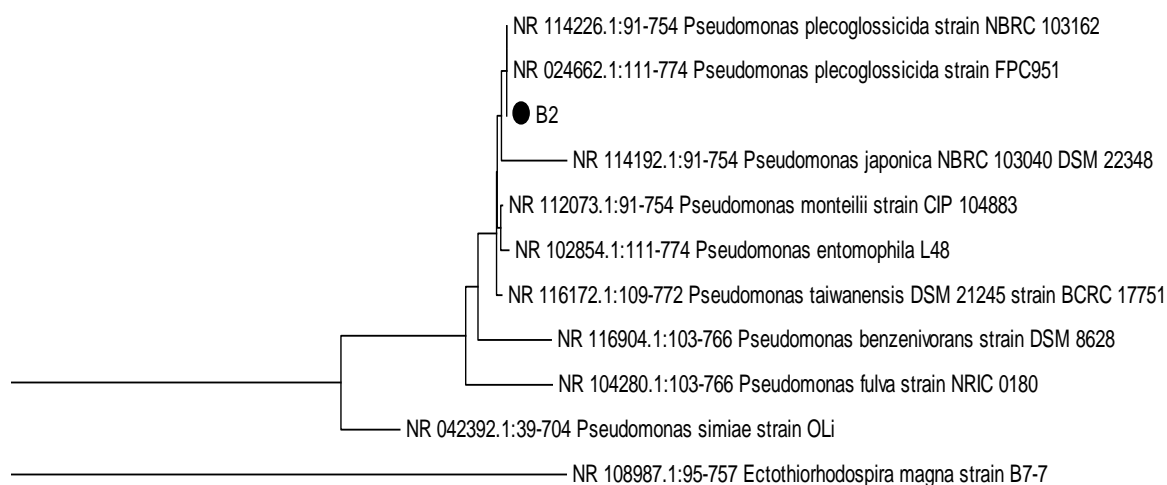


Сурет 6. ПТР-тазартылғанға дейін геннің 16S rRNA учаскесіне әмбебап праймерлермен алынған өнім

Ескертпе: B1, B2 – сынамалар; M – *O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder* ұзындықты маркер.

Кесте 5. 16S rRNA генінің нуклеотидтер тізбегін талдау әдісімен идентификациялау нәтижелері

№	Штам атауы	Геннің 16s rRNA фрагментінің реттілігі	Халықаралық деректер базасында нуклеотидтер тізбегін анықтау алгоритмі		
			Genebank түгендеу нөмірі (Accession number)	Штам атауы	сәйкестік %
1	2	3	4	5	
1	B1	GTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTCCACATCTCT ACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTC TCCTCTTCTGCACTCAAGTCCCCAGTTTCCAAT GACCSTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACAT CAGACTTAAGGAACCGCCTGCGAGCCCTTTACG CCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACG TATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGT GGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCC CTATTCGAACGGTACTTGTCTTCCCTAACAAC AGAGCTTTACGATCCGAAAACSTTCATCACTCA CGCGGCGTTGCTCCGTCAGA	BGSC 3A28	<i>Bacillus subtilis</i>	99%
		CTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCTACTGCTG CCTCCCCTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCC CAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGCTAC GCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCA ACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGT GGTAGCCGAAGCCACSTTTTATGTTTGAACCAT GCGGTTCAAACAAGCATCCGGTATTAGCCCCG GTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGG TTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCGCTAA CATCAGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGA CTTGCATGTATTAGGCACGCCGCC			



Сурет 8. *Pseudomonas plecoglossicida* тобының 16S rRNA генінің фрагментін талдау негізінде салынған филогенетикалық ағашы

Микроорганизмдердің іріктелген штамдарын молекулярлық-генетикалық сәйкестендіру нәтижесінде *B1* штамы *Bacillus subtilis* түріне, *B2* штамы *Pseudomonas plecoglossicida* түріне жатқызылды.

Қорытынды

Өзен және Жетібай кен орындарының топырақ үлгілерінен бөлініп алынған микроорганизмдердің алуантүрлілігін зерттеу нәтижесінде топырақтар бірдей нәтиже көрсетті. Өзен кен орынының топырағында гетеротрофты бактериялар – $4,3 \times 10^8$ КТБ/г, псевдомонадалар – $3,0 \times 10^8$ КТБ/г, ашытқылар – $3,5 \times 10^8$ КТБ/г құрады, ал мицелиалды саңырауқұлақтардың саны гетеротрофты бактерияларға қарағанда біршама төмен болды. Жетібай кен орнының топырақ үлгілерінде гетеротрофты бактериялар – $4,7 \times 10^8$ КТБ/г, псевдомонадалар – $3,2 \times 10^8$ КТБ/г, ашытқы және мицелиалды саңырауқұлақтар – сәйкесінше $2,8 \times 10^8$ және $4,0 \times 10^8$ КТБ/г құрады.

Микроорганизмдердің сапалық көрсеткішін анықтау барысында Өзен кен орнының топырақ үлгілеріндегі микрофлораның сапалық және сандық құрамын зерттеу нәтижесінде микрофлорада гетеротрофты бактериялар (34%) және ашытқылар (28%) басым екендігі көрсетілді. Псевдомонадалардың саны 24%, зең саңырауқұлақтарының саны – 14%. Жетібай кен орнындағы топырақ үлгілерінде микрофлорада гетеротрофты бактериялар (32%) және ашытқылар (27%) басым. Псевдомонадалар мен зең саңырауқұлақтарының саны сәйкесінше 22% және 19% болып, төмен болды.

Мұнай деструкторлаушы микроорганизмдердің белсенді штамдары ПТР анализі арқылы идентификацияланды. Идентификациялау нәтижесінде *B1* штамы *Bacillus subtilis* түріне, *B2* штамы *Pseudomonas plecoglossicida* түріне жатқызылды.

Жоғарыда келтірілген мәліметтерден бұл дақылдарды мұнай және мұнай өнімдерінің биодеструкторы ретінде пайдалану үшін кешенді биологиялық препарат жасау үшін ұсынуға болады.

Жұмыс ҚР БҒМ қаржыландырған АР08856559 «Разработка сорбентов на основе шунгитовых пород для очистки нефтезагрязненных почв» жобасы аясында жасалды.

Әдебиет:

1. Буддыбаева Г.Н. Влияние нефтегазовой отрасли на социально-экономическое развитие западного региона Республики Казахстан. // Вестник КазНУ. Серия психологии и социологии. №2 (45). 2013. С.116-124.
2. Феофанов Ю.А. Опыт применения и перспективы развития биофильтров для очистки сточных вод. – Киев: Знание, 1984. - 16 с.
3. Очистка сточных вод от органических веществ, токсичных соединений и азота. // Микробиологическая промышленность: Экспресс-информация.– 1987. - Вып.3.
4. Кожанова Г.А., Гудзенко Т.В., Соловьев В.И., Бобрешова Н.С., Беляева Т.А., Садовничий В.А. Создание стойких систем микробной биодеградация углеводородов нефти в водной среде с использованием бактерий-деструкторов // Вісник Одеського національного ун-та. Сер. Біологія. – 2001. – Т. 8. – С. 26-30.
5. Kroos H. Biologische Adwassereiniung mit “gezuchteten spezia/bakterien” // Ernährungsindustriec. – 1982. - Vol. 3. - P. 61-62.
6. Биосинтез БАВ иммобилизованными клетками микроорганизмов. Егоров Н.С., Ландау Н.С., Борман Е.Н. и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 1984. - Т. 20. Вып. 5. - С. 579–592.
7. Абишева А.К., Каирманова Г.К., Мансурова Р. М., Жубанова А.А., Мансуров З.А. Получение модифицированных иммобилизованными клетками зауглероженных сорбентов на основе скорлупы грецких орехов для избирательной сорбции ионов тяжелых металлов из водных растворов // Вестник КазГУ, сер. экологическая. – 1999. № 5. - С.66–71.
8. Klein J., Wagner F. Immobilized cell //Dechema Monogr. – 1978. – Vol. 82. - P. 142-164.
9. Никовская Г.Н. Адгезионная иммобилизация микроорганизмов в очистке воды //Химия и технология воды. 1989. - Т. 11, № 2. - С. 158-169.
10. Синицин А.П., Райнина Е.И., Ефремов А.Б. Иммобилизация дрожжей рода *Saccharomyces cerevisiae* на алломоборосиликатных стекловолокнах //Биотехнология. – 1986. № 3. - С. 66-69.
11. Жубанова А.А., Баубекова А.С., Абишева Н.К., Кайырманова Т.К. Иммобилизация клеток дрожжей и бактерий на зауглероженные природные носители // Вестник КазНУ. Сер.экол., 2001. - № 2 (9). – С. 46-50.
12. Нетрусова А.И. Большой практикум по микробиологии // учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений под ред. М.: ИЦ «Академия», - 2005. - № 2. - С. 608.
13. Vegas E.Z.S., Nieves B., Araque M., Velasco E., Ruiz J., Vila J. Outbreak of infection with *Acinetobacter* strain RUH 1139 in an intensive care unit // Infection Control and Hospital Epidemiology. - 2006. - Vol. 27. - P. 397-404.
14. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Research*, 1997. Vol. 25, No. P. 3389-3402.
15. Kumar S., K. Tamura, and M. Nei. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in bioinformatics*. Vol. 5 No 2. 150-163. June, 2004.
16. Altschul, S.F., et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Research*, 1997. Vol. 25, No. P. 3389-3402.
17. Микайло И.И., Бобрик Н.Ю., Кривцова М.В., Ніколайчук В.І. Влияние антропогенных поллютантов на почвенный микробиоценоз в условиях Закарпатья // Международный журнал «Устойчивое развитие», - 2013. - №11. – С. 130-137.
18. Патент 2361686 РФ Биопрепарат для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов/Сваровская Л. И., Писарева С.И., Алтунина Л. К.; Опубл. 13.08.07 БИ №20, 2009.
19. Кошко, В.А. Физиология и биохимия культурных растений. // Охрана окружающей среды: современные исследования по экологии и микробиологии: материалы междунар. регион. семинара. – Ужгород, 1997. – No 5. – С. 14-22.
20. О.С. Игнатовец, Е.В. Феськова, Т.И. Ахрамович, В.Н. Леонтьев. Применение микроорганизмов-деструкторов для биоремедиации почв, загрязненных 2,4-д и пестицидами группы сульфонилмочевины//Учреждение образования «белорусский государственный технологический университет, материалы 17-й Международной научной конференции, Минск, 18–19 мая 2017 г. : в 2 ч. Ч. 2 / Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета; [под общ. ред. С.А. Маскевича, С.С. Позняка, редкол.: С. Е. Головатый и др.]. - Минск: ИВЦ Минфина, 2017. - С. 27-28.

References:

1. Buldybaeva G.N. Vliyanie neftegazovoy otrasli na social'no-ekonomicheskoe razvitie zapadnogo regiona Respubliki Kazahstan. // Vestnik KazNU. Seriya psihologii i sociologii. №2 (45). 2013. S.116–124.
2. Feofanov Yu.A. Opyt primeneniya i perspektivy razvitiya biofil'trov dlya ochistki stochnyh vod. – Kiev: Znanie, 1984. - 16 s.
3. Ochistka stochnyh vod ot organicheskikh veshchestv, toksichnyh soedinenij i azota. // Mikrobiologicheskaya promyshlennost': Ekspres-informaciya.– 1987. - Vyp.3.
4. Kozhanova G.A., Gudzenko T.V., Solov'ev V.I., Bobreshova N.S., Belyaeva T.A., Sadovnichij V.A. Sozdanie stojkih sistem mikrobnoy biodegradacii uglevodorodov nefti v vodnoj srede s ispol'zovaniem bakterij-destruktorov // Visnik Odes'kogo nacional'nogo un-ta. Ser. Biologiya. – 2001. – T. 8. – S. 26-30.
5. Kroos H. Biologische Adwassereiniung mit “gezuchteten spezia/bakterien” // Ernahrungsindustriec. – 1982. - Vol. 3. - P. 61-62.
6. Biosintez BAV immobilizovannymi kletkami mikroorganizmov. Egorov N.S., Landau N.S., Borman E.N. i dr. //Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. – 1984. - T. 20. Vyp. 5. - S. 579–592.
7. Abisheva A.K., Kairmanova G.K., Mansurova R.M., ZHubanova A.A., Mansurov Z.A. Poluchenie modifitsirovannyh immobilizovannymi kletkami zauglerozhennyh sorbentov na osnove skorlupy greckih orekhov dlya izbiratel'noj sorbcii ionov tyazhelyh metallov iz vodnyh rastvorov //Vestnik KazGU, ser. ekologicheskaya. – 1999. № 5. - S.66–71.
8. Klein J., Wagner F. Immobilized cell // Dechema Monogr. – 1978. – Vol. 82. - P. 142-164.
9. Nikovskaya G.N. Adgezionnaya immobilizaciya mikroorganizmov v ochistke vody // Himiya i tekhnologiya vody. 1989. - T. 11, № 2. - S. 158-169.
10. Sinicin A.P., Rajnina E.I., Efremov A.B. Immobilizaciya drozhzhey roda Saccharomyces cerevisiae na alyumoborosilikatnyh steklovoloknah // Biotekhnologiya. – 1986. № 3. - S. 66-69.
11. Zhubanova A.A., Baubekova A.S., Abisheva N.K., Kajyrmanova T.K. Immobilizaciya kletok drozhzhey i bakterij na zauglerozhennye prirodnye nositeli // Vestnik KazNU. Ser.ekol., 2001. - № 2 (9). – S. 46-50.
12. Netrusova A.I. Bol'shoj praktikum po mikrobiologii // ucheb. posobie dlya stud. vyssh. ucheb. zavedenij pod red. M.: IC «Akademiya», - 2005. - № 2. - S. 608.
13. Vegas E.Z.S., Nieves B., Araque M., Velasco E., Ruiz J., Vila J. Outbreak of infection with Acinetobacter strain RUH 1139 in an intensive care unit // Infection Control and Hospital Epidemiology. - 2006. - Vol. 27. - P. 397-404.
14. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. Nucleic Acids Research, 1997. Vol. 25, No. P. 3389-3402.
15. Kumar S., K. Tamura, and M. Nei. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in bioinformatics. Vol. 5 No 2. 150-163. June, 2004.
16. Altschul, S.F., et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. Nucleic Acids Research, 1997. Vol. 25, No. P. 3389-3402.
17. Mikajlo I.I., Bobrik N.Yu., Krivcova M.V., Nikolajchuk V.I. Vliyanie antropogennyh pollyutantov na pochvennyj mikrobiocenz v usloviyah Zakarpat'ya // Mezhdunarodnyj zhurnal «Ustojchivoe razvitie», - 2013. - №11. – S. 130-137.
18. Patent 2361686 RF Biopreparat dlya ochistki pochvy i vody ot nefti i nefteproduktov/Svarovskaya L. I., Pisareva S.I., Altunina L.K.; Opubl. 13.08.07 BI №20, 2009.
19. Koshko, V.A. Fiziologiya i biokhimiya kul'turnyh rastenij. // Ohrana okruzhayushchej sredy: sovremennye issledovaniya po ekologii i mikrobiologii: materialy mezhdunar. region. seminar. – Uzhgorod, 1997. – No 5. – S. 14-22.
20. O.S. Ignatovec, E.V. Fes'kova, T.I. Ahramovich, V.N. Leont'ev. Primenenie mikroorganizmov-destruktorov dlya bioremediacii pochv, zagryaznennyh 2,4-d i pesticidami grupy sul'fonilmocheviny // Uchrezhdenie obrazovaniya «belorusskij gosudarstvennyj tekhnologicheskij universitet, materialy 17-j Mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii, Minsk, 18–19 maya 2017 g.: v 2 ch. CH. 2 / Mezhdunarodnyj gosudarstvennyj ekologicheskij institut imeni A.D. Saharova Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta; [pod obshch. red. S.A. Maskevicha, S.S. Poznyaka, redkol.: S.E. Golovatyj i dr.]. - Minsk: IVC Minfina, 2017. - S. 27-28.