

IRSTI: 69.25.03

B.B. MAKHATAYEVA¹, P.S. UALIEVA¹, G.Zh. ABDIEVA¹, E.K. ONGARBAYEV²,
A.S. NURMAGANBETOVA¹

¹Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

²Institution of Combustion Problems, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: bmakhatayeva@mail.ru

STUDY OF THE DESTRUCTIVE ACTIVITY OF BIOSORBENT BASED ON OIL- OXIDIZING BACTERIA

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.15

Abstract

The growth activity of oil oxidizing microorganism strains in the oil-contaminated areas and the efficiency of oil decomposition were studied. During the experiment, a microbial consortium was formed using selected strains of microorganisms which were then immobilized in sorbents made of carbonized shungite and rice husks. A biosorbent based on a consortium of microorganisms, *Pseudomonas poae* TM1, and *Pseudomonas migulae* TM2, along with carbonized shungite and rice husks, has shown promising results in the bioremediation of oil-contaminated areas.

Keywords: sorbent, oil-oxidizing microorganisms, consortium, biosorbent.

Currently, Kazakhstan is one of the largest oil producing countries. In Kazakhstan, soil pollution with oil and oil products is a big problem. In terms of negative impact on the environment, oil production occupies one of the leading positions among the sectors of the fuel and energy complex, which is due to the large-scale production and the eclipse of oil in the country. Its discharge into the environment leads to the destruction of the life of many organisms, as well as changes and degradation of ecosystems. Currently, microbiological methods are used to combat oil and oil products. Soil microorganisms play a major role in the process of detoxifying chemicals. The ability of microorganisms to break down oil is associated with a large number of biochemical reactions carried out by them and a high level of their adaptation. Pollution with oil and oil products has a very negative effect on the soil, reducing the quality and productivity of the land. Contaminated soil becomes toxic to plants, animals and humans, and in some cases can cause serious poisoning and death.

Because of environmental disasters associated with accidents in deposits where mining occurs, soil pores become clogged, making it hydrophobic and usually leading to a decrease in water storage capacity. Oil and oil product spills are possible through the direct production, transportation, processing and use of hydrocarbons. When entering the environment, oil or petroleum products negatively affect the ecosystem, while significantly changing the pH level and the degree of aeration of the soil [1].

Among the measures taken in order to protect the environment from oil pollution, one of the most promising and environmentally safe methods is the method of soil bioremediation, which is based on the ability of some microorganisms to destroy oil and oil products. The ability of microorganisms to convert or decompose oil hydrocarbons is known and allows them to be used for bioremediation of contaminated areas [2].

Bioremediation is one of the most promising methods for cleaning oil-contaminated soil. It is based on the ability of microorganisms and other living organisms to break down and destroy various hydrocarbons. In the natural environment, there is no waste, biodegradation occurs continuously, and everywhere; any organic matter can provide nutrients to the entire complex of microorganisms and eventually Mineralize organic matter to form carbon dioxide and water.

It is known that carbon materials and composites containing some mineral and plant materials are promising in the use of microbial cells as carriers. Such carrier sorbents are capable

of high chemical resistance, mechanical strength, ion exchange properties, sufficient permeability to water and other substrates, biocompatibility and processing [1].

The distinctive properties of the main carrier sorbents are that they are made from cheap and affordable pyrolysis products of plant residues from agriculture and woodworking, as well as zeolites enriched with trace elements and some other examples of natural aluminosilicates and oxides. Immobilized microorganisms, along with free cells, have several advantages, so high bioremediation efficiency can be achieved by using immobilized microorganism cells in cleaning contaminated ecosystems [3].

Increasing the effectiveness of biological products can be achieved with immobilized destructor cells in various carriers. This is because the adhesion of cells to hard surfaces ensures a high concentration of microbial cells in the zone of action, prevents their leaching, protects against the effects of high concentrations of toxic oil components, and allows you to increase the specific destructive activity of microflora [4].

The purpose of this article is to compare the ability of *Pseudomonas poae* TM1 and *Pseudomonas migulae* TM2 to a consortium of microorganisms and a biosorbent based on carbonized shungite and rice husk and a sorbent based on carbonized shungite and rice husk to bioremediate oil-contaminated areas.

Materials and methods of research

Determination of the number of different groups of microorganisms

To identify pollutant-resistant physiological groups, the number of different groups of soil microorganisms was determined, and the microbiological composition of soil microflora in areas adjacent to warehouses was compared using the sequential dilution method of soil suspension in dense culture media. The number of cells was determined using the Koch method, which involves seeding a specific volume of the studied microorganism suspension into petri dishes containing a dense medium. The colonies that grew after incubation were then counted. Sowing was performed in petri dishes in an agaric medium. Meat-peptone agar (MPA) was used to determine the total number of microorganisms, wort agar (WA) to assess the content of fungi in the soil, and specific culture media were employed to determine the number of different physiological groups of microorganisms. Molds were considered using the agaric medium of Czapek dox, ammonifying bacteria in agar based on fishmeal hydrolysate, nitrogen-fixing bacteria in the Ashby medium, and aerobic cellulolytic bacteria in the dense growing medium of Hutchinson and Clayton.

Cultivation of crops at a temperature of 28-30°C in the thermostat was carried out for 2 days to isolate heterotrophic bacteria, actinomycetes, nitrogen-fixing and mold fungi were isolated for 5-7 days and cellulolytic bacteria for 7-9 days. After crop incubation, a quantitative calculation of the colonies that grew was carried out and the number of colony-forming units (CFU) in 1 g of soil was determined.

Methods for isolating pure strains from soil samples

Obtaining pure strains was carried out by mechanical separation on the surface of a dense culture medium (Loop annealing method) [5]. Individual colonies were tested for purity by microscopy and sown in oblique nutrient agar for cultivation.

Methods of studying morphological-cultural, physiological-biochemical properties of isolated microorganisms

The study of morphological, physiological and biochemical features of bacteria was carried out according to generally accepted methods. Morphological and cultural properties of pure cultures of separated microorganisms were studied based on the following features: cell shape and location, cell size, cell mobility, presence of endospores, staining by Gram, characteristics of a colony in a solid culture medium, growth pattern in a liquid culture medium, and growth pattern in an oblique Agar. The physiological and biochemical properties of bacteria and yeast were determined based on the following features: bacterial reproduction at 42°C, hydrolysis of gelatin, starch, casein, the presence of catalase and the use of molecular nitrogen, fermentation of various carbohydrates and alcohols [6].

Obtaining bio destructors based on immobilized microorganism cells

Sorption cell immobilization was carried out as follows:

100 ml of cell suspension in an isotonic NaCl solution in the presence of carriers at the rate of 1 g per 100 ml of medium, incubated for 48 hours in an Erlenmeyer flask at room temperature, shaken at 220 rpm in a laboratory shaker. The carrier with immobilized cells was then washed with isotonic solution from weakly attached cells and the number of desorbed cells was determined.

Methods for determining sorption and desorption of cells:

To assess the degree of sorption and desorption of cells, cell concentration in solution was measured by the optical density of the suspension in standard cuvettes with an optical path length of 1 cm, a wavelength of 540 Nm using a KFK - 2MPA photocolormeter, in "sharp" experiments [7].

A calibration curve was constructed to determine the relationship between cell number and optical density.

The number of attached cells was calculated based on the difference in the initial and final values of the optical density of the samples. The proportion of adsorbed cells was determined by the Nikovskaya method:

$$\% = 100 \times \frac{D_{exp}}{D_{pri}} \quad (1)$$

where, D_{exp} is the optical density of the original suspension

D_{pri} – optical density of experimental samples.

Cleaning oil from the soil through the Soxlet. The prepared soil loop was placed in a prepared sleeve of 10.00 G and obtained in the Soxlet apparatus by adding 70 ml of chloroform for 8 hours. After extraction, the volume of the extract was measured with a measuring cylinder. All analyzes were carried out in two parallels [8].

Preparation of sowing material. To obtain biomass from a consortium of oil destructors, microorganisms were grown individually in an optimal medium of 10^9 CFU/ml of liquid with a cell titer in a thermoshaker (220/min) for 2 days under aeration and at a temperature of 28°C . The inoculate was transferred from the sowing medium to the optimal nutrient medium. To do this, 100 ml of the nutrient medium was introduced into 500 ml flasks. The strains were grown at a temperature of 28°C to 10^{10-12} CFU/ml cell titer for 2 days. After 48 hours, the total number of cells of microorganisms was determined. To obtain the required amount of biomass, the cell suspension was replaced with the INOBIO-5BG bioreactor.

Results and discussion

Extraction of biomass from the community of destructor strains for bioremediation of oil-contaminated soils

Bioremediation technologies are being used more widely compared to physical and chemical recovery methods due to their high efficiency, low cost and harmlessness of products (mainly CO₂ and water) [9]. The most important factors for bioremediation are the size and activity of microorganisms, soil nutrients, and oxygen state. However, oil-contaminated soil usually has a low number of microbes, low porosity, and nutrients, which limits the decomposition efficiency of microorganisms in practical applications [10-12].

Natural purification of natural objects from oil pollution is a long process; therefore, the problem of restoring oil-contaminated soil, in particular bioremediation, becomes especially relevant. A promising technology for cleaning oil-contaminated soil is considered to be the introduction into the soil of various complexes of microorganisms that are distinguished by an increased ability to biodegrade certain hydrocarbon components of oil and oil products [13].

In this regard, in conditions of complex pollution, the possibility of using destructive microorganisms capable of growing in an environment with high hydrocarbons and showing active biochemical activity, capable of biodestructors of these substances, is relevant.

An important condition for the effective transformation of xenobiotics is the absence of antagonism between destructor organisms. Microorganisms can use organic pollutants as the only source of carbon, which allows them to break down organic pollutants in the soil [14].

In the course of the work, the INOBIO-5BG bioreactor was used to obtain biomass (Figure 1). Bacterial strains were grown in an optimal liquid medium for 48 hours, the pH of the medium has a neutral value. In the course of the experiment, the number of viable cells of oil detractors was determined. The standard serial dilution method was used to determine the number of colony-forming units (CFU) in the culture suspension.

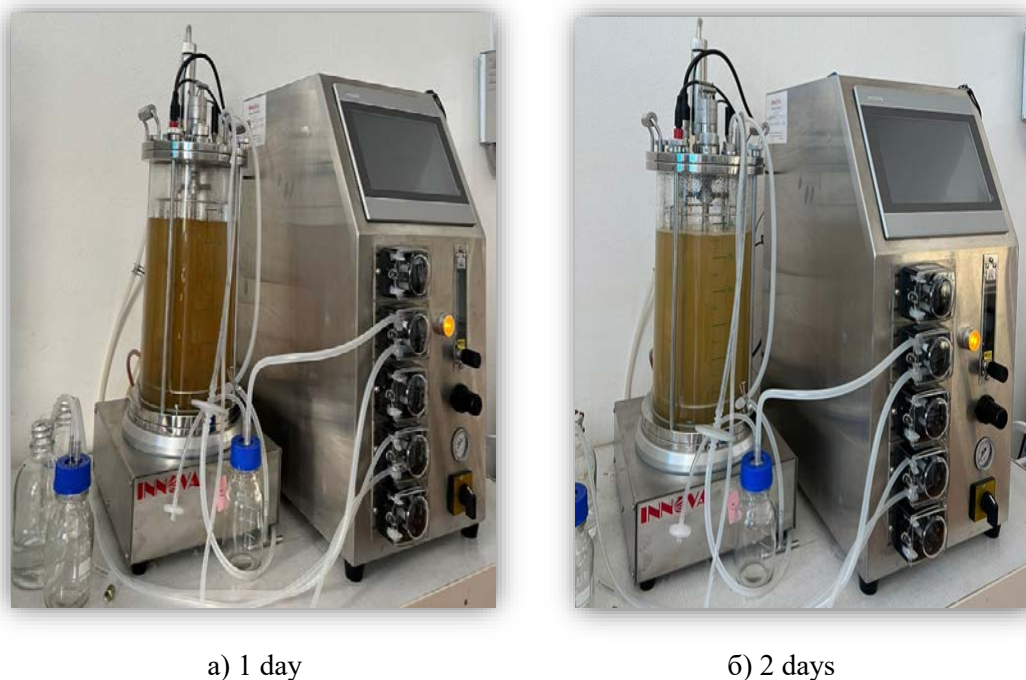


Figure 1- Cultivation of strain-destructors in INOBIO-5BG bioreactor

In Figure 1, in the bioreactor, on the 1st day, the nutrient medium is transparent, on the day 2, there is an active growth of strains and there is a clouding of the environment. Also, during cultivation, the number of viable cells of microorganisms in the culture fluid was determined after 24 hours and 48 hours (Figure 2).

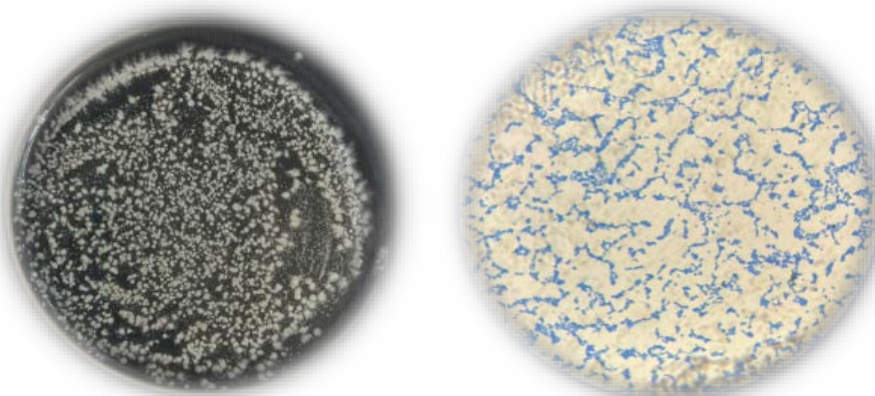


Figure 2 – Macro- and micromorphology of oil oxidizing bacteria grown in bioreactor

As can be seen from Figure 2, the cultures of the oil oxidizing bacteria are pure, with microscopy revealing cells similar in morphology. The number of homogeneous colonies and colony-forming units was 2.5×10^{10} CFU/ml.

Testing of sorbents made to clean the soil contaminated with specific oil

The development and improvement of technologies for bioremediation of areas contaminated with oil hydrocarbons is currently an active area of fundamental and Applied Research. Crude oil is a mixture of chemicals with hundreds of components. The main difference between oil produced in different geographical regions is not in the chemical composition, but in the composition of the individual component; the latter affects the chemical and physical properties of crude oil. Therefore, microbial associations consisting of two or more strains are now used in bioremediation, as the introduction of monoculture of hydrocarbon-oxidizing microorganisms into oil-reduced environment does not completely solve the purification problem [15].

In the course of the work, the destructive activity of a sorbent based on carbonized shungite and rice husk, as well as a biosorbent based on microorganisms, was studied in field conditions. The results of the experiment showed that, to increase the degradation of oil, it can be said that the use of mixed cultures consisting of several microorganisms and methods of immobilizing them on carriers are effective.

In the work, oil oxidizing microorganisms were combined into a new consortium on the principle of compatibility with each other. In these consortia, the destructive strains *Pseudomonas poae* TM1 and *Pseudomonas migulae* TM2 are used.

At the beginning of the experiments, oil-contaminated soil was prepared from a waste landfill near the village of Bayandy. The test site is located 35 km from the city of Aktau. The landfill is designed to store oil waste imported from oil fields engaged in oil production and refining. The plants are small, represented by Wormwood and sand male. The climate is moderately dry, the wind speed is 0.7 m/s, the air temperature during the period of cleaning measures was from 32°C to 35°C. at the beginning of the experiments, plots were prepared, the area of the site (3x3.5) is 10.5 m². The next step was the introduction of a sorbent and biosorbent based on carbonized shungite and rice husk (1:1.7); strains of oil-oxidizing microorganisms into oil-contaminated soil. After applying a biosorbent based on sorbent and oil destructors, the soil was moistened and loosened. To account for microorganisms in the soil, generally accepted methods used in microbiology were used.



Figure 3- Oil-contaminated soil of the landfill near the village of Bayandy

In Figure 3, it can be seen that the soil of the landfill is visually oily and has a pungent smell of petroleum products. The initial level of contamination with oil hydrocarbons was 158.2 g/kg of soil. After 10, 30, 60 days, soil samples were taken from the experimental site to determine the survival rate of microorganisms and determine their number. The degree of oil purification of the soil was also determined.

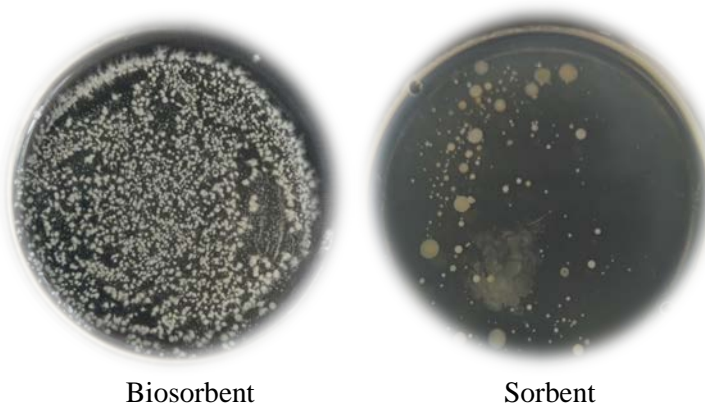


Figure 4- Microbial diversity of the oil-contaminated soil of the landfill

On the 10th, 30th and 60th day with the introduction of a biosorbent and sorbent based on destructors, morphological colonies similar to the introduced strains were identified on oil-contaminated soil. When introduced into the soil, it was found that the cells of oil oxidizing bacteria retained their viability during the experiment (Figure 3-4).

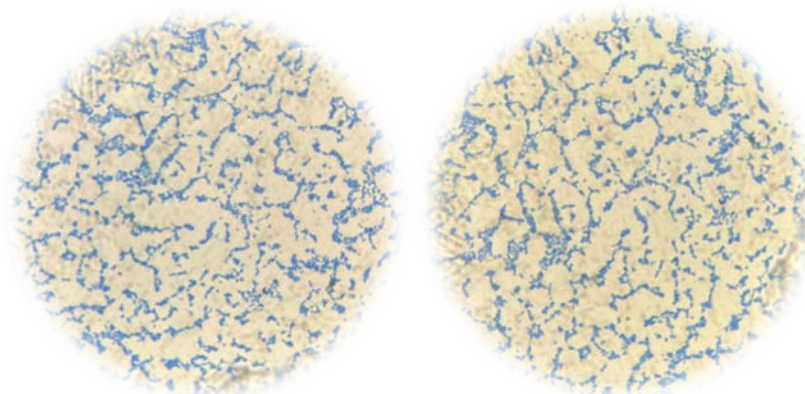


Figure 5 - Morphology of strain-destructors immobilized in sorbent

During the microscopy, rod-shaped, small cells were detected, characteristic of *Pseudomonas* in morphological features. Further in the work, the number of microorganisms in oil-contaminated soil from the experimental site of the landfill was studied (Table 1).

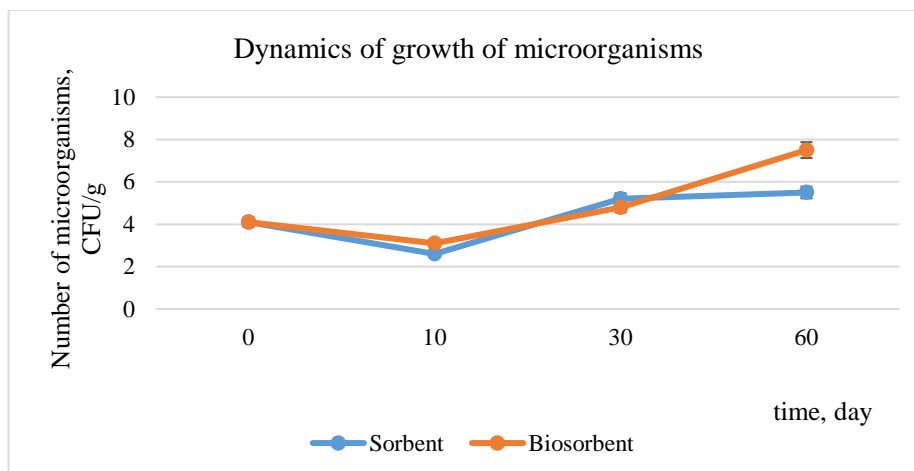


Figure 6 - The number of microorganisms in the oil-contaminated soil of the experimental site of the landfill

As can be seen from the figure, the number of microorganisms in the samples of the control soil was 4.1×10^6 CFU/g. On oil-contaminated soil of the experimental site of the landfill, the number of colony-forming units of microorganisms for the 10th day was 3.1×10^{10} CFU/g in the version with the introduction of biosorbent, 2.6×10^9 CFU/g in the version with the introduction of sorbent.

On the 30th and 60th days of a field experiment on soils contaminated with oil and petroleum products, microorganisms show a tendency to increase in numbers and their viability remains. So, on the soils where the biosorbent was introduced, by the 60th day, the number of microorganisms reached 7.5×10^{11} CFU/g and the sorbent reached 5.5×10^{10} CFU/g. When determining the number of microorganisms, the titer of viable cells will be much lower than when introducing culture into the soil at the beginning of the experiment. This indicates that oil maintains the viability and quantitative indicators of destructor cells, since for them oil and petroleum products are the only sources of carbon. The diversity of microorganisms capable of destroying oil and petroleum products is due to high competition and numerous ways of degradation of their various fractions. Microorganisms have the property of selective access to various hydrocarbons.

The work investigated the degree of soil purification from oil and oil products at the experimental site using a sorbent based on shungite and rice husk and a biosorbent based on oil destructors. The content of petroleum products in the soil was determined by the weight method after removing hydrocarbons from the soil suspension with hot hexane in the Soxhlet apparatus. Figure 6 shows data on the amount of oil in oil-contaminated soil after purification with the introduction of a sorbent and a biosorbent.

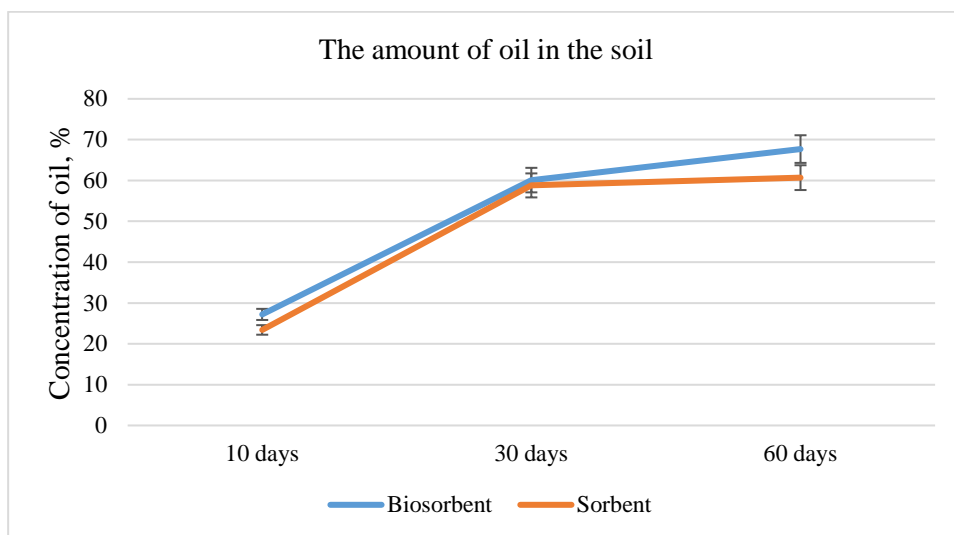


Figure 6 - Petroleum content in oil-contaminated soil after purification

After the introduction of the sorbent and biosorbent into the oil-contaminated soil of the landfill, soil samples were taken at 10, 30 and 60 days. In soil samples where biosorbent was introduced, oil degradation was 27.2% in 10 days, 60.1% in 30 days, and 67.7% in 60 days. In samples in which the sorbent was administered, oil degradation was 23.4% at 10 days, 58.8% at 30 days, and 60.7% at 60 days. Thus, as a result of the work, the oil content in the oil - contaminated soil of the landfill decreased from 23.4% to 67.7%.

Conclusion

In general, field tests carried out on specific oil-contaminated soils have shown the effective removal of oil hydrocarbons by a consortium of destructive strains based on immobilized crops and a carbonized rice husk and shungite-based sorbent. The results of the study of the destructive activity of biosorbent in field experiments showed that the oil content in the soil of the landfill with the addition of oil-contaminated sorbent and biosorbent decreased to 60.7% and 67.7%,

respectively. The results of preliminary scientific research will allow us to develop a technology for the treatment of oil and oil waste. The obtained results are of practical importance for cleaning oil-containing objects in the environment.

Funding

The work was carried out within the framework of the project AR08856559 "Development of sorbents on the basis of shungite pipes for oil and gas", funded by the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan.

References:

- 1 Elizaveta, M., & Maria, U. Ecological aspects of sorbents use to improve the efficiency of bioremediation on oil-contaminated lands. *Revista Fuentes, el reventón energético*, 2021, 19(1): 65-73. (doi: <https://doi.org/10.18273/revfue.v19n1-2021006>)
- 2 Babaev E.R. Mikrobiologicheskaya destrukciya nefti v pochvah Apsheronского poluostrova. *Territoriya neftegaza* 2011, 11: 64-69. (URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/mikrobiologicheskaya-destruktsiya-nefti-v-pochvah-apsheronского-poluostrova>)
- 3 Gaur, N., Narasimhulu, K., & PydiSetty, Y. Recent advances in the bio-remediation of persistent organic pollutants and its effect on environment. *Journal of cleaner production*, 2018, 198: 1602-1631 (doi: [10.1016/j.jclepro.2018.07.076](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.07.076))
- 4 Kazankapova M. K. Sozdanie modifitsirovannykh uglerodmineral'nykh sorbentov dlya ochistki prirodnykh ob"ektov ot tekhnogennykh zagryaznenij. Dokt. dis. Almaty, 2013. (URL: <https://studylib.ru/doc/2096334/dissertacionnaya-rabota-kazankapovoj-m?ysclid=lo6qj51xbp396403342>)
- 5 Netrusov A. I. Bol'shoj praktikum po mikrobiologii. M., 2005.
- 6 Ignatova L.V. Osnovy mikrobiologii. Kazak Univer-ti, 2009.
- 7 Nikovskaya.G.N. Adgezionnaya immobilizaciya mikroorganizmov v ochistke vody. *Himiya i tekhnologiya vody*, 1989, 11(2): 158-169.
- 8 Drugov YU. S., Rodin A.A. Analiz zagryaznennoj pochvy i opasnykh othodov. M., 2007.
- 9 Ebadi A, Khoshkholgh Sima NA, Olamaee M, Hashemi M, Ghorbani Nasrabadi R. Remediation of saline soils contaminated with crude oil using the halophyte *Salicornia persica* in conjunction with hydrocarbon-degrading bacteria. *J Environ Manage*, 2018, 1(219): 260-268. (doi: [10.1016/j.jenvman.2018.04.115](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.115))
- 10 D. Borah and R. N. S. Yadav, Bioremediation of petroleum based contaminants with biosurfactant produced by a newly isolated petroleum oil degrading bacterial strain Egypt. *J. Pet.*, 2017, 26: 181–188 (doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2016.02.005>)
- 11 H. Cui, X. Yang, L. Xu, Y. Fan, Q. Yi, R. Li and J. Zhou, Effects of goethite on the fractions of Cu, Cd, Pb, P and soil enzyme activity with hydroxyapatite in heavy metal-contaminated soil. *RSC Adv.*, 2017, 7: 45869–45877 (doi: <https://doi.org/10.1039/C7RA08786A>)
- 12 H. Su, S. Mi, X. Peng and Y. Han, The mutual influence between corrosion and the surrounding soil microbial communities of buried petroleum pipelines. *RSC Adv.*, 2019, 9: 18930–18940. (doi: <https://doi.org/10.1039/C9RA03386F>)
- 13 Kurakov A.V., Il'inskij V.V., Kotolevcev S.V., Sadchikov A.P. Bioindikaciya i reabilitaciya ekosistem pri pochvennykh zagryazneniyah. M., 2006. (URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/otsenka-mikrobnoy-transformatsii-azota-i-ugleroda-v-usloviyah-neftyanogo-i-radioaktivnogo-zagryazneniya>)
- 14 Velacano, M. Castellanohinojosa, A. Vivas, A.F. Toledo, M.V.M. Effect of Heavy Metals on the Growth of Bacteria Isolated from Sewage Sludge Compost Tea. *Adv. Microbiol.*, 2014, 4: 644–655. (doi: <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2014.410070>)
- 15 I.A. Pyrchenkova, A.B. Gafarov, I.F. Puntus. Vychor i harakteristika aktivnykh psihrotrofnykh mikroorganizmov-destruktorov nefti. *Prikl. biohim. mikrobiol.*, 2006, 42(3): 298-305. (URL: <https://www.dissercat.com/content/ekologo-funksionalnye-aspekty-mikrobnoi-remediatsii-neftezagryaznennykh-pochv>)

Б.Б. МАХАТАЕВА^{1*}, П.С. УАЛИЕВА¹, Г.Ж. АБДИЕВА¹, Е.К. ОНГАРБАЕВ^{1,2},
А.С. НҰРМАҒАНБЕТОВА¹

¹ Казахский Национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

² Институт проблем горения, Алматы, Казахстан

*e-mail: bmakhatayeva@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕСТРУКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ БИОСОРБЕНТА НА ОСНОВЕ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Аннотация

Изучена активность роста штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов в нефтезагрязненной зоне и активность разложения нефти. В ходе эксперимента были созданы микробные ассоциации из отобранных штаммов микроорганизмов и иммобилизованы на сорбенты из карбонизированных шунгитовых и рисовых шелух. Биосорбент на основе консорциума микроорганизмов *Pseudomonas poae* TM1 и *Pseudomonas migulae* TM2 и карбонизированного шунгита и рисовой шелухи показал многообещающее применение при биоремедиации нефтезагрязненных регионов.

Ключевые слова: сорбент, нефтеокисляющие микроорганизмы, консорциум, биосорбент.

FTAMP: 69.25.03

Б.Б. МАХАТАЕВА^{1*}, П.С. УАЛИЕВА¹, Г.Ж. АБДИЕВА¹, Е.К. ОНГАРБАЕВ^{1,2},
А.С. НҰРМАҒАНБЕТОВА¹

¹ ал-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан

² Жану проблемалары институты, Алматы, Қазақстан

*e-mail: bmakhatayeva@mail.ru

МҰНАЙТОТЫҚТЫРУШЫ БАКТЕРИЯЛАР НЕГІЗІНДЕГІ БИОСОРБЕНТТІҢ ДЕСТРУКТИВТІ БЕЛСЕНДІЛІГІН ЗЕРТТЕУ

doi:10.53729/MV-AS.2023. 04.15

Түйін

Мұнай тотықтырушы микроорганизм штамдарының мұнаймен ластанған аймақта өсу белсенділігі және мұнайды ыдырату белсенділігі зерттелді. Тәжірибе барысында таңдалып алынған микроорганизм штамдарынан микробтық консорциум құрастырылып көміртектендірілген шунгит және күріш қауыздарынан жасалған сорбенттерге иммобилизация жасалды. *Pseudomonas poae* TM1 және *Pseudomonas migulae* TM2 микроорганизмдер консорциумына және көміртектендірілген шунгит пен күріш қауызына негізделген биосорбент мұнаймен ластанған аймақтарды биоремедиациялауда перспективті екендігін көрсетті.

Кілтгі сөздер: сорбент, мұнай-тотықтырушы микроорганизмдер, консорциум, биосорбент.

Қазіргі таңда Қазақстан ірі мұнай өндіруші елдердің қатарына кіреді. Қазақстан үшін топырақтың мұнаймен және мұнай өнімдерімен ластануы үлкен мәселе болып табылады. Қоршаған ортаға теріс әсер ету бойынша мұнай өндіру отын-энергетика кешені салаларының арасында жетекші орындардың бірін алады, бұл мұнайдың елімізде кең көлемінде өндірілуіне және тұтылуына байланысты. Оның қоршаған ортаға төгілуі көптеген организмдердің тіршілігінің жойылуына, экожүйенің өзгеруі мен деградациясына әкеліп соғады. Қазіргі кезде мұнай және мұнай өнімдерімен күресу жолында микробиологиялық әдістер қолданылады. Химиялық заттарды детоксикациялау процесінде топырақ микроорганизмдері үлкен рөл атқарады. Микроорганизмдердің мұнайды ыдырату қабілеті олар жүргізетін биохимиялық реакциялардың көптігімен және олардың

бейімделуінің жоғары деңгейімен байланысты. Мұнай мен мұнай өнімдерімен ластану топыраққа өте жағымсыз әсер етеді, жердің сапасы мен өнімділігін төмендетеді. Ластанған топырақ өсімдіктерге, жануарларға және адамдарға улы болады және кейбір жағдайларда ауыр улану мен өлімге әкелуі мүмкін.

Тау-кен өндірісі орын алатын кен орындарындағы апаттармен байланысты экологиялық апаттардың нәтижесінде топырақ тесіктері бітеліп, оны гидрофобты етеді және әдетте суды сақтау қабілетінің төмендеуіне әкеледі. Мұнай мен мұнай өнімдерінің төгілуі көмірсутектерді тікелей өндіру, тасымалдау, өңдеу және пайдалану арқылы мүмкін болады. Қоршаған ортаға енген кезде мұнай немесе мұнай өнімдері экожүйеге теріс әсер етеді, сонымен бірге топырақтың рН деңгейі мен аэрация дәрежесін айтарлықтай өзгертеді [1].

Қоршаған ортаны мұнаймен ластанудан қорғау мақсатында қабылданатын шаралардың ішінде ең перспективті және экологиялық қауіпсіз әдістердің бірі кейбір микроорганизмдердің мұнай мен мұнай өнімдерін жою қабілетіне негізделген топырақты биоремедиациялау әдісі болып табылады. Микроорганизмдердің мұнай көмірсутектерін түрлендіру немесе ыдырату қабілеті белгілі және оларды ластанған аумақтарды биоремедиациялау үшін пайдалануға мүмкіндік береді [2].

Биоремедиация - мұнаймен ластанған топырақты тазартудың ең перспективалы әдістерінің бірі. Ол микроорганизмдер мен басқа тірі организмдердің әртүрлі көмірсутектерді ыдырату және жою қабілетіне негізделген. Табиғи ортада қалдықтар болмайды және биодеградация үздіксіз және барлық жерде жүреді; кез келген органикалық заттар микроорганизмдердің бүкіл кешенін қоректік заттармен қамтамасыз ете алады және ақырында көмірқышқыл газы мен су түзу үшін органикалық заттарды минералдандырады.

Кейбір минералды және өсімдік материалдары бар көміртекті материалдар мен композиттер микробтық клеткаларды тасымалдаушы ретінде пайдалануда перспективті екені мәлім. Мұндай тасымалдаушы сорбенттер жоғары химиялық төзімділікке, механикалық беріктікке, ион алмасу қасиеттеріне, суға және басқа субстраттарға жеткілікті өткізгіштікке, биоүйлесімділікке және өңдеуге қабілетті [1].

Негізгі тасымалдаушы сорбенттердің айрықша қасиеттері-олар ауыл шаруашылығы мен ағаш өңдеудің өсімдік қалдықтарының арзан және қол жетімді пиролиз өнімдерінен, сондай-ақ микроэлементтермен байытылған цеолиттерден және табиғи алюмосиликаттар мен оксидтердің кейбір басқа мысалдарынан жасалған. Иммобилизацияланған микроорганизмдер бос клеткалармен қатар бірнеше артықшылықтарға ие, сондықтан ластанған экожүйелерді тазартуда иммобилизацияланған микроорганизм клеткаларын қолдану арқылы биоремедиацияның жоғары тиімділігіне қол жеткізуге болады [3].

Биологиялық өнімдердің тиімділігін арттыруға әртүрлі тасымалдаушыларда иммобилизацияланған деструктор клеткаларды қолдану арқылы қол жеткізуге болады. Себебі клеткалардың қатты беттерге жабысуы микробтық клеткалардың әсер ету аймағында жоғары концентрациясын қамтамасыз етеді, олардың шайылып кетуіне жол бермейді, улы мұнай компоненттерінің жоғары концентрациясының әсерінен қорғайды және микрофлораның ерекше деструктивті белсенділігін арттыруға мүмкіндік береді [4].

Бұл мақаланың мақсаты *Pseudomonas poae* ТМ1 және *Pseudomonas migulae* ТМ2 микроорганизмдер консорциумына және көміртектендірілген шунгит пен күріш қауызына негізделген биосорбент пен көміртектендірілген шунгит пен күріш қауызына негізделген сорбенттің мұнаймен ластанған аймақтарды биоремедиациялау қабілетін салыстырмалы түрде зерттеу болып табылады.

Материалдар мен әдістер

Микроорганизмдердің әртүрлі топтарының санын анықтау

Ластаушыға төзімді физиологиялық топтарды анықтау үшін топырақ микроорганизмдерінің әртүрлі топтарының санын анықтау және қоймаларға іргелес жерлерде топырақ микрофлорасының микробиологиялық құрамын салыстыру тығыз

коректік орталарда топырақ суспензиясын дәйекті сұйылту әдісімен жүргізілді. Клеткалардың санын анықтау Кох әдісімен жүргізілді. Әдістің мәні микроорганизмдердің зерттелетін суспензиясының белгілі бір көлемін Петри табақшаларына тығыз ортаға себу және инкубациядан кейін өскен колонияларды санау болып табылады. Егіс агарлы ортада Петри табақшаларында жүзеге асырылады. Микроорганизмдердің жалпы санын анықтау үшін ет-пептон агары (ЕПА), топырақтағы саңырауқұлақтардың құрамын анықтау үшін-сусло-агар (СА), микроорганизмдердің әртүрлі физиологиялық топтарының санын анықтау үшін тиісті коректік орталар қолданылады. Зеңдер Чапек–Докстың агарлы ортасында, аммонизациялаушы бактериялар ГРМ-агарында, азотты бекітетін бактериялар – Эшби ортасында, аэробты целлюлозолитикалық бактериялар Хетчинсон мен Клейтонның тығыз өсетін ортасында саналды.

Дақылдарды өсіру термостатта 28-30°C температурада гетеротрофты бактерияларды бөліп алу үшін 2 күн, актиномицеттер, азотты бекітетін және зең саңырауқұлақтары 5-7 күн және целлюлозолитикалық бактериялар 7-9 күн ішінде бөлініп алынды. Егін инкубациясынан кейін өскен колониялардың сандық есебі жүргізіліп, 1 г топырақтағы колония түзетін бірліктердің (КТБ) саны анықталды.

Топырақ үлгілерінен таза дақылдарды оқшаулау әдістері

Таза дақылдарды алу тығыз коректік ортаның бетіндегі механикалық бөліну арқылы жүзеге асырылды (ілмекті күйдіру әдісі) [5]. Жеке колониялар микроскопия арқылы тазалыққа тексеріліп, өсіру үшін қиғаш коректік агарға себілді.

Бөлініп алынған микроорганизмдердің морфологиялық-культуралды, физиологиялық-биохимиялық қасиеттерін зерттеу әдістері

Бактериялардың морфологиялық, физиологиялық және биохимиялық белгілерін зерттеу жалпы қабылданған әдістерге сәйкес жүргізілді. Бөлінген микроорганизмдердің таза дақылдарының морфологиялық және культуралды қасиеттері келесі белгілер бойынша зерттелді: клеткалардың пішіні мен орналасуы, клеткалардың мөлшері, клеткалардың қозғалғыштығы, эндоспоралардың болуы, Грам бойынша боялуы, қатты коректік ортадағы колонияның сипаттамасы, сұйық коректік ортадағы өсу үлгісі, қиғаш агардағы өсу үлгісі. Бактериялар мен ашытқылардың физиологиялық-биохимиялық қасиеттері келесі белгілермен анықталды: 42°C кезінде бактериялардың көбеюі, желатин, крахмал, казеин гидролизі, каталазаның болуы және молекулалық азотты қолдану, әртүрлі көмірсулар мен спирттердің ашытуы [6].

Иммобилизацияланған микроорганизм клеткаларына негізделген биодеструкторларды алу

Сорбциялық клетка иммобилизациясы келесідей жүргізілді:

NaCl изотоникалық ерітіндісіндегі 100 мл клеткалық суспензия тасымалдаушылардың қатысуымен 100 мл ортаға 1 г мөлшерінде, Эрленмейер колбасында бөлме температурасында 48 сағат бойы инкубацияланды, зертханалық шейкерде 220 айн/мин шайқалды. Содан кейін иммобилизацияланған клеткалары бар тасымалдаушы әлсіз бекітілген клеткалардан изотоникалық ерітіндімен жуылды және десорбцияланған клеткалардың саны анықталды.

Клеткалардың сорбциясы мен десорбциясын анықтау әдістері:

Клеткалардың сорбциясы мен десорбция дәрежесін бағалау үшін ерітіндідегі клетка концентрациясын КФК - 2МПА фотоколориметрінің көмегімен оптикалық жолдың ұзындығы 1 см, толқын ұзындығы 540 нм болатын стандартты кюветтерде, «өткір» тәжірибелерде суспензияның оптикалық тығыздығы бойынша өлшеу жүргізілді [7].

Клеткалар саны мен оптикалық тығыздық арасындағы байланысты анықтау үшін калибрлеу қисығы салынды.

Бекітілген клеткалардың саны сынамалардың оптикалық тығыздығының бастапқы және соңғы мәндерінің айырмашылығына байланысты есептелді. Адсорбцияланған клеткалардың үлесі Никовская әдісімен анықталды:

$$\% = 100 \times \frac{D_{\text{тәж}}}{D_{\text{бас}}} \quad (1)$$

мұндағы, $D_{\text{бас}}$ – бастапқы суспензияның оптикалық тығыздығы
 $D_{\text{тәж}}$ – тәжірибелік сынамалардың оптикалық тығыздығы

Сокслет арқылы топырақтан мұнайды тазарту. Дайындалған топырақ ілмегі 10,00 г дайындалған жеңге салынып, 8 сағат ішінде 70 мл хлороформ қосу арқылы Сокслет аппаратында алынды. Экстракциядан кейін сығындының көлемі өлшеуіш цилиндрмен өлшенді. Барлық талдаулар екі параллельде жүргізілді [8].

Егу материалдарын дайындау. Мұнай деструкторларынан тұратын консорциумның биомассасын алу үшін микроорганизмдер аэрация кезінде және 28°C температурада 2 тәулік бойы термошейкерде (220/мин) клетка титрімен 10⁹ КТБ/мл сұйық оңтайлы ортада жеке өсірілді. Инокулят егу ортасынан оптималды қоректік ортаға ауыстырылды. Ол үшін 500 мл колбаларға 100 мл қоректік орта енгізілді. Штамдар 28°C температурада 10¹⁰⁻¹² КТБ/мл клетка титріне дейін 2 күн бойы өсірілді. 48 сағаттан кейін микроорганизмдер клеткаларының жалпы саны анықталды. Биомассаны қажетті мөлшерде алу үшін клеткалық суспензия INOBIO-5BG ферменттеріне ауыстырылды.

Нәтижелер және оларды талқылау

Мұнаймен ластанған топырақтарға биоремедиация жүргізу үшін деструктор-штамдар қауымдастығының биомассасын алу

Биоремедиация технологиялары жоғары тиімділігіне, төмен құнына және өнімдердің (негізінен CO₂ және су) зиянсыздығына байланысты физикалық және химиялық қалпына келтіру әдістерімен салыстырғанда кеңірек қолданылуға [9]. Биоремедиацияның маңызды факторлары микроорганизмдердің мөлшері мен белсенділігі, топырақтың қоректік заттары және оттегі күйі болып табылады. Дегенмен, мұнаймен ластанған топырақта әдетте микробтардың саны аз, кеуектілігі төмен және қоректік заттар бар, бұл практикалық қолдану кезінде микроорганизмдердің ыдырау тиімділігін шектейді [10-12].

Табиғи объектілерді мұнайдың ластануынан табиғи түрде тазарту ұзақ процесс болып табылады, сондықтан мұнаймен ластанған топырақты қалпына келтіру проблемасы, атап айтқанда биоремедиация ерекше өзектілікке ие болады. Мұнаймен ластанған топырақты тазартудың перспективті технологиясы топыраққа мұнай мен мұнай өнімдерінің белгілі бір көмірсутек компоненттерін биодеструкциялау қабілетінің жоғарылауымен ерекшеленетін микроорганизмдердің әртүрлі кешендерін енгізу болып саналады [13].

Осыған байланысты күрделі ластану жағдайында, осы заттардың биодеструкторларына қабілетті көмірсутектері жоғары ортада өсуге және белсенді биохимиялық белсенділікті көрсетуге қабілетті деструкторлық микроорганизмдерді қолдану мүмкіндігі өзекті болып табылады.

Ксенобиотиктердің тиімді трансформациясының маңызды шарты деструкторлық организмдер арасында антагонизмнің болмауы болып табылады. Микроорганизмдер органикалық ластаушы заттарды көміртектің жалғыз көзі ретінде пайдалана алады, бұл олардың топырақтағы органикалық ластаушы заттарды ыдыратуға мүмкіндік береді [14].

Жұмыс барысында биомасса алу үшін INOBIO-5BG ферменттері қолданылды (Сурет 1). Бактериялық штамдар оптималды сұйық ортада 48 сағат бойы өсірілді, ортаның pH бейтарап мәнге ие. Эксперимент барысында мұнай деструкторларының өміршең клеткаларының саны анықталды. Культуралық суспензиядағы колония түзуші бірліктердің (КТБ) санын анықтау үшін стандартты сериялық сұйылту әдісі қолданылды.



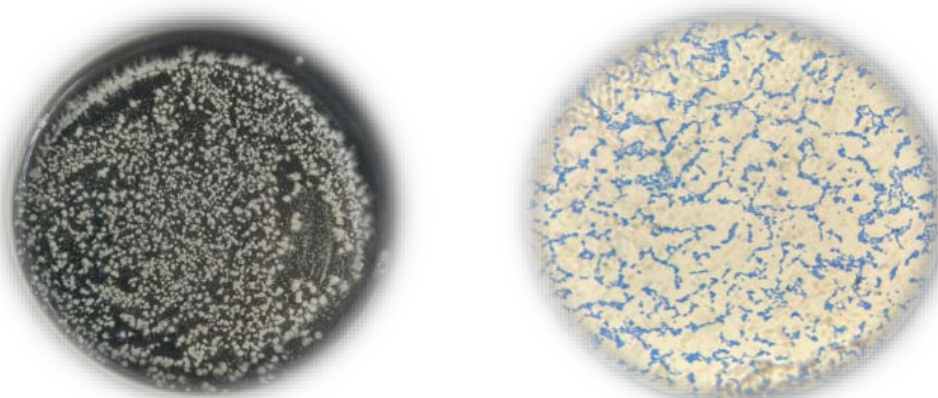
а) 1 тәулік



б) 2 тәулік

Сурет 1 - Штамм-деструкторларды INOBIO-5BG ферментерінде өсіру

1-суретте ферментерде 1-ші күні қоректік орта мөлдір, 2-ші күні дақылдардың белсенді өсуі байқалады және қоршаған ортаның бұлыңғырлығы байқалды. Сондай-ақ, өсіру кезінде культуралық сұйықтықтағы микроорганизмдердің өміршең клеткаларының саны 24 сағат және 48 сағаттан кейін анықталды (Сурет 2).



Сурет 2 - Ферментерде өсірілген мұнай тотықтырғыш бактериялардың макро және микроморфологиясы

2-суреттен көрініп тұрғандай, мұнай тотықтырғыш бактериялардың культуралары таза, микроскопия кезінде морфологиясы бойынша ұқсас клеткалар анықталды. Біртекті колониялар және колония түзуші бірліктердің саны $2,5 \times 10^{10}$ КТБ/мл құрады.

Нақты мұнаймен ластанған топырақты тазарту үшін жасалған сорбенттерді сынау

Мұнай көмірсутектерімен ластанған аумақты биоремедиациялау технологияларын әзірлеу және жетілдіру қазіргі уақытта белсенді іргелі және қолданбалы зерттеулер саласы болып табылады. Шикі мұнай – жүздеген компоненттері бар химиялық заттардың қоспасы. Әр түрлі географиялық аймақтарда өндірілген мұнайдың негізгі айырмашылығы химиялық

құрамға емес, жеке компоненттің құрамына байланысты; соңғысы шикі мұнайдың химиялық және физикалық қасиеттеріне әсер етеді. Сондықтан соңғы кездері биоремедиацияда екі немесе одан да көп штамдардан тұратын микробтық ассоциациялар қолданылады, өйткені көмірсутекті тотықтырғыш микроорганизмдердің монокультурасын мұнай-тотықсыздандырылған ортаға енгізу тазарту мәселесін толығымен шеше алмайды [15].

Жұмыс барысында көміртектендірілген шунгит пен күріш қабығына негізделген сорбенттің және микроорганизмдерге негізделген биосорбенттің деструктивті белсенділігі далалық жағдайларда зерттелді. Тәжірибе нәтижелері көрсеткендей, мұнайдың деградациясын арттыру үшін бірнеше микроорганизмдерден тұратын аралас культураларды қолдану және оларды тасымалдаушыларға иммобилизациялау әдістері тиімді деуге болады.

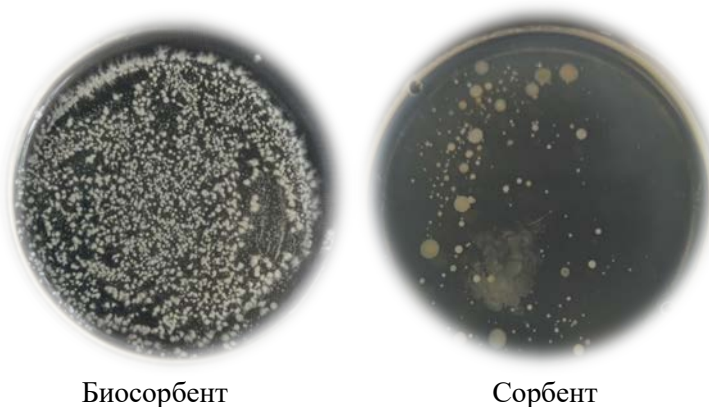
Жұмыста мұнай тотықтырушы микроорганизмдер бір-бірімен үйлесімділік принципі бойынша жаңа консорциумға біріктірілді. Бұл консорциумдарда *Pseudomonas poae* ТМ1 және *Pseudomonas migulae* ТМ 2 деструктивті штамдары қолданылады.

Тәжірибелердің басында Баянды кентінің маңындағы қалдықтар полигонының мұнаймен ластанған топырағы дайындалды. Полигон Ақтау қаласынан 35 км қашықтықта орналасқан. Полигон мұнай өндірумен және өңдеумен айналысатын мұнай кен орындарынан әкелінген мұнай қалдықтарын сақтауға арналған. Өсімдіктер аз, жусан мен құмдық еркекшөппен ұсынылған. Климаты орташа құрғақ, желдің жылдамдығы 0,7 м/с, тазарту шараларын жүргізу кезеңіндегі ауа температурасы 32°C-тан 35°C-қа дейін болды. эксперименттердің басында учаскелер дайындалды, учаскенің ауданы (3x3,5) 10,5 м². Келесі қадам көміртектендірілген шунгит пен күріш қабығына негізделген сорбентті (1:1,7) және биосорбентті; мұнай тотықтырушы микроорганизмдер штамдарын мұнаймен ластанған топыраққа енгізу болды. Сорбент пен мұнай деструкторларына негізделген биосорбентті қолданғаннан кейін топырақ ылғалдандырылып, қопсытылды. Топырақтағы микроорганизмдерді есепке алу үшін микробиологияда қолданылатын жалпы қабылданған әдістер қолданылды.



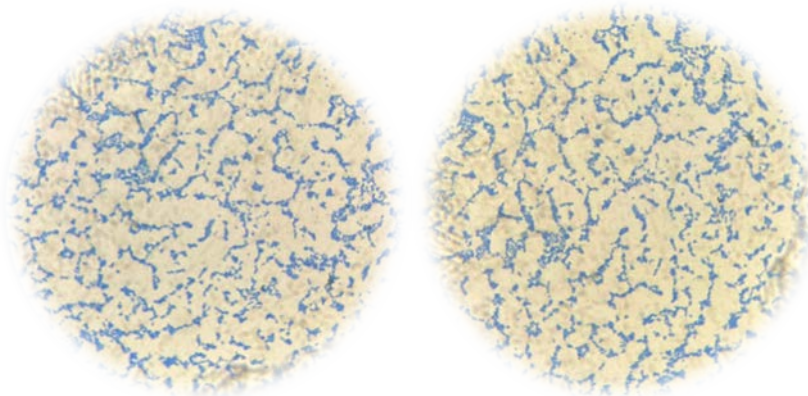
Сурет 3 - Баянды кентінің жанындағы полигонның мұнаймен ластанған топырағы

3-суретте полигонның топырағын көзбен майлы екендігін және де мұнай өнімдерінің өткір иісі бар екенін көруге болады. Мұнай көмірсутектерімен ластанудың бастапқы деңгейі 158,2 г/кг топырақты құрады. 10, 30, 60 тәуліктен кейін микроорганизмдердің тіршілік ету деңгейін анықтау және олардың санын анықтау үшін эксперименттік учаскеден топырақ сынамалары алынды. Сондай-ақ, топырақты мұнайдан тазарту дәрежесі анықталды.



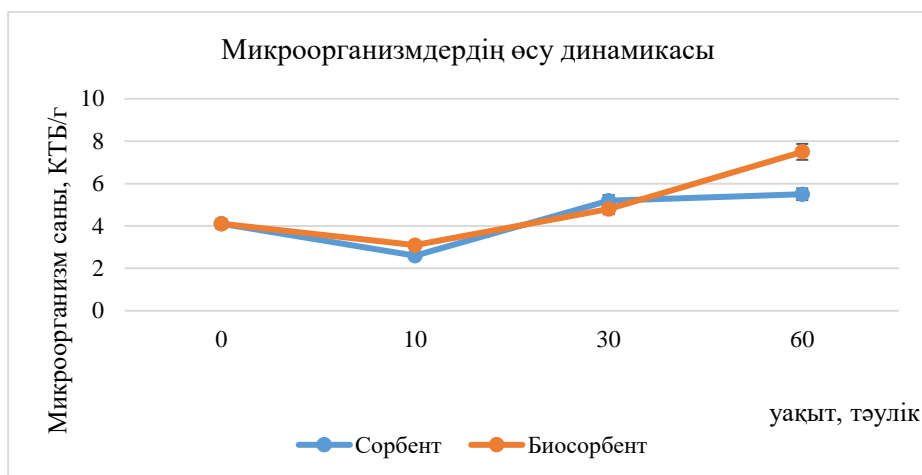
Сурет 4 - Полигонның мұнаймен ластанған топырағының микробтық алуантүрлілігі

Деструкторлар негізіндегі биосорбент және сорбент енгізе отырып 10-шы, 30-шы және 60-шы күні, мұнаймен ластанған топырақта енгізілген штамдарға ұқсас морфологиялық колониялар анықталды. Топыраққа енгізілген кезде мұнай тотықтырғыш бактериялардың клеткалары эксперимент кезінде өміршеңдігін сақтағаны анықталды (3-4-сурет).



Сурет 5 - Сорбентте иммобилизацияланған штамм-деструкторлардың морфологиясы

Микроскопия кезінде таяқша тәрізді, ұсақ клеткалар анықталды, морфологиялық белгілері бойынша псевдомоналарға тән. Әрі қарай жұмыста полигонның эксперименттік учаскесінен мұнаймен ластанған топырақтағы микроорганизмдердің саны зерттелді (1-кесте).

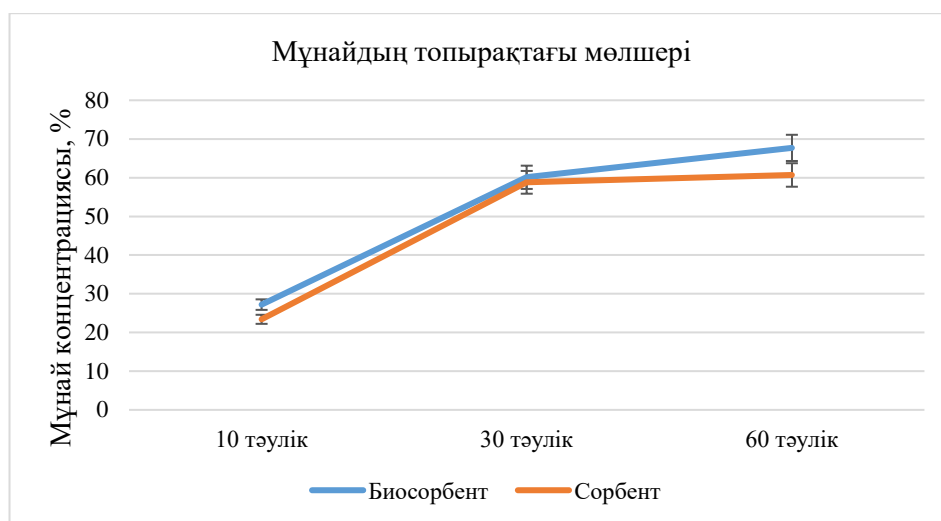


Сурет 6 - Полигонның эксперименттік учаскесінің мұнаймен ластанған топырағындағы микроорганизмдердің саны

Суреттен көріп отырғанымыздай, бақылау топырағының үлгілеріндегі микроорганизмдердің саны $4,1 \times 10^6$ КТБ/г құрады. Полигонның эксперименттік учаскесінің мұнаймен ластанған топырағында 10-шы тәулікке микроорганизмдердің колониялық түзуші бірліктерінің саны биосорбент енгізілген нұсқада $3,1 \times 10^{10}$ КТБ/г, сорбент енгізілген нұсқада $2,6 \times 10^9$ КТБ/г құрады.

Мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған топырақтардағы далалық эксперименттің 30 және 60-шы күндерінде микроорганизмдер санның өсу тенденциясын көрсетеді және олардың өміршеңдігі сақталады. Сонымен, биосорбент енгізілген топырақтарда 60-шы күні микроорганизмдердің саны $7,5 \times 10^{11}$ КТБ/г-ға жетті және сорбент $5,5 \times 10^{10}$ КТБ/г-ға жетті. Микроорганизмдер санын анықтаған кезде өміршең клеткалардың титрі эксперименттің басында топыраққа культура енгізуге қарағанда әлдеқайда төмен болады. Бұл мұнай деструкторшы клеткаларының өміршеңдігі мен сандық көрсеткіштерін сақтайтындығын көрсетеді, өйткені олар үшін мұнай мен мұнай өнімдері көміртектің жалғыз көзі болып табылады. Мұнай мен мұнай өнімдерін жоюға қабілетті микроорганизмдердің әртүрлілігі жоғары бәсекелестікке және олардың әртүрлі фракцияларының деградациясының көптеген жолдарына байланысты. Микроорганизмдер әртүрлі көмірсутектерге селективті қатынас қасиетіне ие.

Жұмыста шунгит пен күріш қабығына негізделген сорбентті және мұнай деструкторларына негізделген биосорбентті қолдана отырып, эксперименттік учаскедегі мұнай мен мұнай өнімдерінен топырақты тазарту дәрежесі зерттелді. Топырақтағы мұнай өнімдерінің құрамы Сокслет аппаратындағы ыстық гексанмен топырақ суспензиясынан көмірсутектерді алып тастағаннан кейін салмақ әдісімен анықталды. 6-суретте сорбент пен биосорбентті енгізе отырып, тазартудан кейін мұнаймен ластанған топырақтағы мұнай мөлшері туралы мәліметтер келтірілген.



Сурет 6 - Тазартудан кейін мұнаймен ластанған топырақтағы мұнайдың мөлшері

Сорбент пен биосорбентті полигонның мұнаймен ластанған топырағына енгізгеннен кейін 10, 30 және 60 тәулікте топырақ үлгілері алынды. Биосорбент енгізілген топырақ үлгілерінде 10 тәулікте мұнайдың деградациясы 27,2%, 30 тәулікте 60,1%, 60 тәулікте 67,7% болды. Сорбент енгізілген үлгілерде 10 тәулікте мұнайдың деградациясы 23,4%, 30 тәулікте 58,8%, 60 тәулікте 60,7% болды. Осылайша, жұмыс нәтижесінде полигонның мұнаймен ластанған топырағындағы мұнай мөлшері 23,4% - дан 67,7% - ға дейін төмендеді.

Қорытынды

Жалпы, нақты мұнаймен ластанған топырақтарда жүргізілген далалық сынақтар иммобилизацияланған дақылдарға негізделген деструктивті штаммдар консорциумының және көміртектендірілген күріш қабығы және шунгит негізіндегі сорбенттің мұнайдың

көмірсутектерін тиімді жоюын көрсетті. Биосорбенттің деструктивті белсенділігін далалық эксперименттерде зерттеу нәтижелері полигонның мұнаймен ластанған сорбент және биосорбент қосылған топырағындағы мұнай мөлшері сәйкесінше 60,7% және 67,7%-ға дейін төмендеді. Жүргізілген алдын ала ғылыми зерттеулердің нәтижелері мұнай және мұнай қалдықтарды тазарту бойынша технологияны әзірлеуге мүмкіндік береді. Алынған нәтижелер қоршаған ортаның құрамында мұнай бар объектілерді тазарту үшін практикалық маңызға ие.

Қаржыландыру

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

Әдебиеттер:

1 Elizaveta, M., & Maria, U. Ecological aspects of sorbents use to improve the efficiency of bioremediation on oil-contaminated lands. *Revista Fuentes, el reventón energético*, 2021, 19(1): 65-73. (doi: <https://doi.org/10.18273/revfue.v19n1-2021006>)

2 Бабаев Э.Р. Микробиологическая деструкция нефти в почвах Апшеронского полуострова. *Территория нефтегаз*, 2017, 11: 64-69. (URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/mikrobiologicheskaya-destruktsiya-nefti-v-pochvah-apsheronского-poluostrova>)

3 Gaur N., Narasimhulu, K., & PydiSetty, Y. Recent advances in the bio-remediation of persistent organic pollutants and its effect on environment. *Journal of cleaner production*, 2018, 198: 1602-1631 (doi: 10.1016/j.jclepro.2018.07.076)

4 Казанкапова М. К. *Создание модифицированных углеродминеральных сорбентов для очистки природных объектов от техногенных загрязнений. Докт. дис.* Алматы, 2013. (URL: <https://studylib.ru/doc/2096334/dissertacionnaya-rabota-kazankapovoj-m?ysclid=106qj51xbp396403342>)

5 Нетрусов А. И. *Большой практикум по микробиологии.* М., 2005.

6 Игнатова Л.В. *Основы микробиологии.* Қазақ Универ-ті, 2009.

7 Никовская.Г.Н. Адгезионная иммобилизация микроорганизмов в очистке воды. *Химия и технология воды*, 1989, 11(2): 158-169.

8 Другов Ю.С., Родин А.А. *Анализ загрязненной почвы и опасных отходов.* М., 2007.

9 Ebadi A, Khoshkholgh Sima NA, Olamaee M, Hashemi M, Ghorbani Nasrabadi R. Remediation of saline soils contaminated with crude oil using the halophyte *Salicornia persica* in conjunction with hydrocarbon-degrading bacteria. *J Environ Manage*, 2018, 1(219): 260-268. (doi: 10.1016/j.jenvman.2018.04.115)

10 D. Borah and R. N. S. Yadav, Bioremediation of petroleum based contaminants with biosurfactant produced by a newly isolated petroleum oil degrading bacterial strain Egypt. *J. Pet.*, 2017, 26: 181–188 (doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2016.02.005>)

11 H. Cui, X. Yang, L. Xu, Y. Fan, Q. Yi, R. Li and J. Zhou, Effects of goethite on the fractions of Cu, Cd, Pb, P and soil enzyme activity with hydroxyapatite in heavy metal-contaminated soil. *RSC Adv.*, 2017, 7: 45869–45877 (doi: <https://doi.org/10.1039/C7RA08786A>)

12 H. Su, S. Mi, X. Peng and Y. Han, The mutual influence between corrosion and the surrounding soil microbial communities of buried petroleum pipelines. *RSC Adv.*, 2019, 9: 18930–18940. (doi: <https://doi.org/10.1039/C9RA03386F>)

13 Кураков А.В., Ильинский В.В., Котолевцев С.В., Садчиков А.П. *Биоиндикация и реабилитация экосистем при почвенных загрязнениях.* М., 2006. (URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/otsenka-mikrobnoy-transformatsii-azota-i-ugleroda-v-usloviyah-neftyanogo-i-radioaktivnogo-zagryazneniya>)

14 Velacano, M. Castellano, Hinojosa, A. Vivas, A.F. Toledo, M.V.M. Effect of Heavy Metals on the Growth of Bacteria Isolated from Sewage Sludge Compost Tea. *Adv. Microbiol.*, 2014, 4: 644–655. (doi: <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2014.410070>)

15 И.А. Пырченкова, А.Б. Гафаров, И.Ф. Пунтус. Выбор и характеристика активных психротрофных микроорганизмов-деструкторов нефти. *Прикл. биохим. микробиол.*, 2006, 42(3): 298-305. (URL: <https://www.dissercat.com/content/ekologo-funktsionalnye-aspekty-mikrobnoi-remediatsii-neftezagryaznennykh-pochv>)