

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА ДЕСТРУКЦИИ НЕФРАСА УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

¹Леонов К.А., ¹Асташкина А.П., ²Мостовская Т.А., ³Ивасенко Д.А., ³Анциферов Д.В.

¹ФГОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»,

Томск, e-mail: leonov_k90@mail.ru;

²ОАО «ТомскГазпром»;

³ООО «Экойл»

Изучен процесс биодеструкции нефраса углеводородокисляющими микроорганизмами методом газовой хроматографии. Показано, что комплексный состав биопрепарата способствует полной деструкции всех классов углеводородов, входящих в состав нефтепродукта. Выявлено, что большей скоростью ферментативной биотрансформации обладают парафины и нафтены, полная деструкция изопарафинов и ароматических углеводородов наступает через 9 дней. Показано, что количество индивидуальных компонентов сложной многокомпонентной системы нефтепродукта в процессе биодеструкции уменьшается в 25 раз. Отображена динамика изменения численности микроорганизмов в процессе биодеструкции. Установлено, что исследуемый биопрепарат является эффективным деструктором нефти и нефтепродуктов с похожими физико-химическими показателями. Полученные данные можно использовать при создании новых сообществ углеводородокисляющих микроорганизмов, ориентированных на физико-химические параметры загрязнителя.

Ключевые слова: углеводороды, углеводородокисляющие микроорганизмы, биодеструкция, биотрансформация, газовая хроматография, биопрепарат

STUDY OF THE PROCESS OF NEFRAS DESTRUCTION BY HYDROCARBON- OXIDIZING MICROORGANISMS

¹Leonov K.A., ¹Astashkina A.P., ²Mostovskaya T.A., ³Ivasenko D.A., ³Anciferov D.V.

¹National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, e-mail: leonov_k90@mail.ru;

²OJSC TomskGazprom;

³LLC Ecoil

The process of nefras biodegradation by hydrocarbon-oxidizing microorganisms by gas chromatography method was examined. It is shown that the complex structure of a biological product contributes to the total destruction of all hydrocarbons classes of oil. It was revealed that paraffins and naphthenes have the higher rate of enzymatic biotransformation, complete destruction of isoparaffins and aromatics comes in 9 days. It was shown that the amount of the individual components of the complex multi-component system in the biodegradable oil decreases 25 times. Dynamics of microorganisms population in the process of biodegradation was displayed. It was discovered that the studied biological product is effective destructor of oil and petroleum products with similar physical and chemical characteristics of nefras. The resulting data can be used to create new communities of hydrocarbon-oxidizing microorganisms focused on physical-chemical parameters of the pollutant.

Keywords: hydrocarbons, hydrocarbon-oxidizing microorganisms, biodegradation, biotransformation, gas chromatography, biological product

Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами – актуальная экологическая проблема для нефтедобывающих регионов. На различных производственно-технологических стадиях функционирования нефтегазового комплекса происходят аварийные ситуации, приводящие к загрязнению окружающей среды углеводородами нефти, газового конденсата и продуктами их переработки. В среднем 3% добываемой нефти попадает в окружающую среду только на этапе ее добычи и транспортировки, что в абсолютном исчислении составляет десятки миллионов тонн [1, 2, 5].

Наиболее перспективным, экологически чистым и часто единственно возможным способом решения данных экологических проблем является применение биологических технологий, основанных на использовании микробных биопрепаратов,

изготовленных из активной биомассы углеводородокисляющих микроорганизмов. Для таких микроорганизмов углеводороды являются естественным источником питания, поэтому в процессе жизнедеятельности они активно размножаются, потребляя загрязнения вплоть до их полного исчерпания [3].

Анализ изменений, происходящих в микробных сообществах нефтяных загрязнений путём определения численности микроорганизмов, выделения и идентификации микроорганизмов-деструкторов углеводородов, изучения биодинамики на основании оценки активности ферментов с параллельным химическим анализом остаточного содержания нефтяного загрязнителя, позволяет разработать параметры микробиологических процессов в нефтезагрязнённых почвах и водных акваториях [4].

Целью работы является изучение процесса деструкции нефраса углеводородокисляющими микроорганизмами биопрепарата «МД» с помощью метода газовой хроматографии.

Материалы и методы исследования

В работе использовали углеводородокисляющие микроорганизмы, входящие в состав биопрепарата мар-

Макросоли	
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	10 г
K_2HPO_4	10 г
MgSO_4	0,7 г
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0125 г
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0125 г
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0125 г
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,003 г
NaCl	0,1 г

В колбу объемом 2 л вносили 1 л минеральной среды, 50 мл нефтепродукта и 50 мл биопрепарата «МД». Культивирование проводилось на термостатированной качалке ЛАБ-ПУ-01 с частотой вращения 105–110 об/мин при температуре 30–32 °С.

В качестве субстрата использовался Нефрас С2 – 80/120 °С; ТУ 38-401-67-108-92 (ЗАО «Рязанская нефтеперерабатывающая компания») – прозрачная маслянистая жидкость, представляющая собой легкокипящую фракцию деароматизованного бензина прямой перегонки малосернистых нефтей. Данный нефтепродукт характеризуется следующими физико-химическими свойствами:

Плотность при Т – 20 °С, кг/м ³	689,2
Массовая доля серы, %	0,000036
Фракционный состав:	
температура начала кипения, °С	84
98 % перегоняется при температуре, °С	92
остаток в колбе после перегонки, %	0,8

Содержание углеводородов в нефтепродукте определяли на хроматографе «Хроматэк-Кристалл 5000» с пламенно-ионизационным детектором при следующих условиях:

- длина колонки – 100 м;
- диаметр колонки – 0,25 мм;
- температура испарителя – 295 °С;
- температура термостата – 290 °С;
- газ-носитель – гелий;
- расход газа-носителя – 315 мл/мин;
- общее время анализа – 2 ч 30 мин.

Для подсчета численности и отображения динамики роста микроорганизмов производилось последовательное разведение и посев на плотную среду (мясопептонный агар) по методу Коха. Рост бактерий на агаризованной среде осуществлялся при температуре 29–31 °С в течение 2 суток.

Результаты исследования и их обсуждение

Нефрас является сложной многокомпонентной системой, содержащей 98 индивидуальных компонентов всех классов углеводородов. Процесс деструкции нефраса углеводородокисляющими микроорганизмами осуществлялся путем ежедневного

ки «МД», произведенного компанией ООО «Экойл» (город Томск). Биопрепарат содержит несколько штаммов микроорганизмов-деструкторов, способных утилизировать углеводороды с различной длиной углеродной цепи. Использовалась жидкая форма биопрепарата, представляющая собой маточную культуру с плотностью микроорганизмов 10^8 – 10^9 КОЕ/мл.

Для роста, развития микроорганизмов и активации ферментов готовилась минеральная среда следующего состава:

Микросоли	
Трилон Б	500 мг
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200 мг
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 мг
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3 мг
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	20 мг
H_3BO_3	30 мг
$\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2 мг
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3 мг

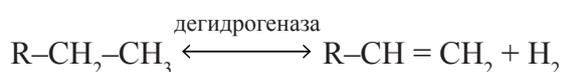
отбора проб из реакционной массы на химический и микробиологический анализы. По данным анализа методом газовой хроматографии судили об остаточном содержании и степени деструкции компонентов нефтепродукта и отдельных классов углеводородов.

Как видно из рис. 1, первыми биодеструкции подвергаются молекулы алканов и циклопарафинов вследствие простого строения углеродной цепи. Так, в первые сутки происходит значительное снижение количества алканов в смеси, их концентрация через 24 часа снизилась на 49%. Минимальное содержание парафинов в анализируемом нефтепродукте наблюдается после 96 часов воздействия микроорганизмов. Концентрация нафтеновых углеводородов спустя 72 часа биодеструкции сводится к нулю.

В процессе деструкции изопарафинов происходит биотрансформация (химическая модификация) вещества под действием ферментативного аппарата углеводородокисляющих микроорганизмов: изомеразы (катализируют структурные превращения изомеров) и дегидрогеназы (катализируют перенос протона, отщепление водорода). Изменение концентрации изоалканов в процессе биотрансформации показано на рис. 2.

Значительное снижение концентрации изопарафинов наблюдается через 24 часа, когда доля изоалканов снизилась в 3,7 раза по сравнению с первоначальным содержанием.

Изменение концентрации олефинов в системе также связано с химическими превращениями под воздействием дегидрогеназы, протекающими по следующей схеме:



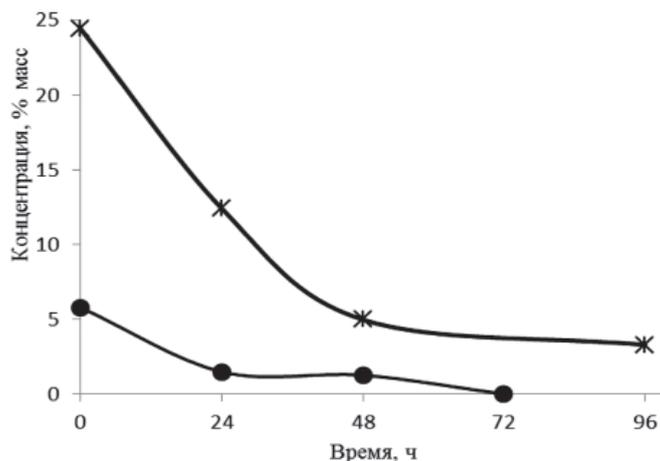


Рис. 1. Динамика деструкции нафтен и парафинов

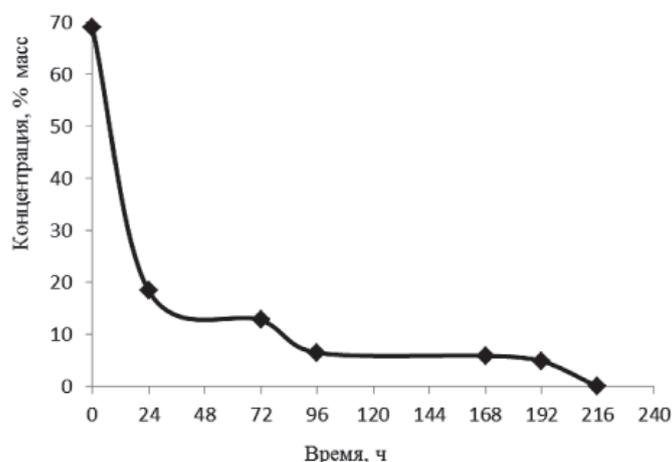


Рис. 2. Снижение концентрации изопарафинов

Параллельно в системе проходит накопление ароматических углеводородов, связанное со снижением концентрации легких фракций тремя путями:

- 1) дегидроциклизация алканов;
- 2) дегидрирование циклоалканов;
- 3) дегидрирование алкилзамещенных циклоалканов.

Процесс деструкции ароматических углеводородов ускоряется в смешанной микробной популяции, где степень окисления ароматических углеводородов ассоциацией микроорганизмов выше, чем отдельных компонентов чистыми культурами. Изучаемый биопрепарат «МД» является комплексным, т.е. содержит несколько культур углеводородоксилирующих микроорганизмов, что способствует высокой скорости деструкции аренов.

Из рис. 3 видно, что после накопления ароматических углеводородов в течение 24 часов происходит их дальнейшая деструкция, объясняемая процессами со-

окисления. Так, углеводороды, устойчивые к биодеструкции (например, полиароматические), исчезают из среды вследствие разрушения в условиях сопряженных окислительных реакций.

Также отслеживалась деструкция общего числа компонентов в системе. Изначально в нефтепродукте содержалось 98 углеводородов. На рис. 4 изображена кривая изменения количества индивидуальных компонентов в смеси. Видно, что через 216 часов биодеструкции в системе их осталось 4, т.е. общее число компонентов уменьшилось в 25 раз. Остаточными углеводородами являются тяжелые парафины – преимущественно декан и пентадекан.

Параллельно в ходе исследования деструкции нефраса углеводородоксилирующими микроорганизмами следили за численностью микроорганизмов. На рис. 5 отображена динамика изменения численности микроорганизмов в процессе биодеструкции.

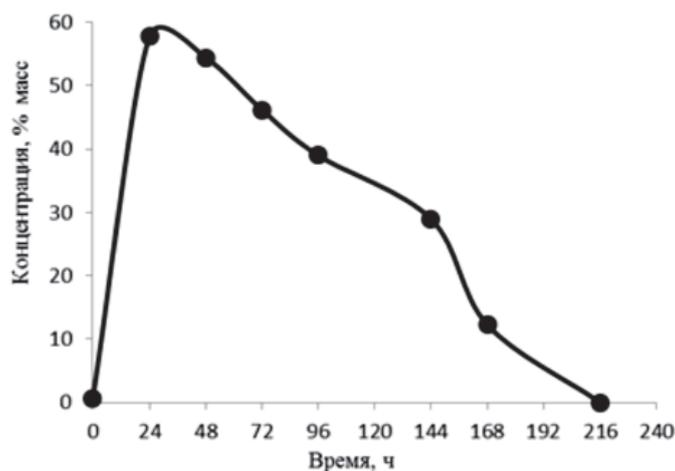


Рис. 3. Динамика изменения доли ароматических соединений

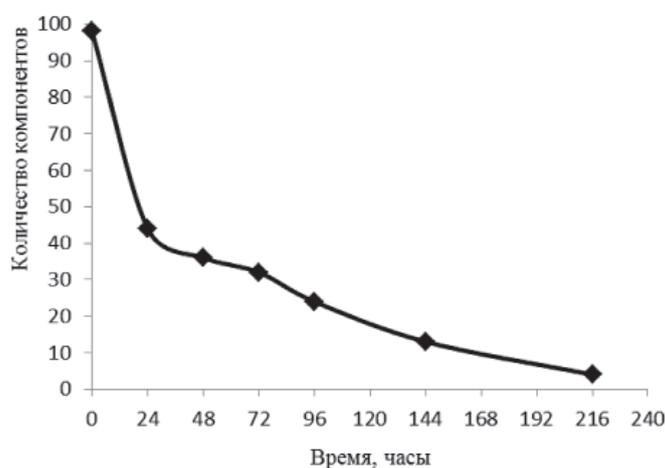


Рис. 4. Динамика снижения числа индивидуальных компонентов в смеси

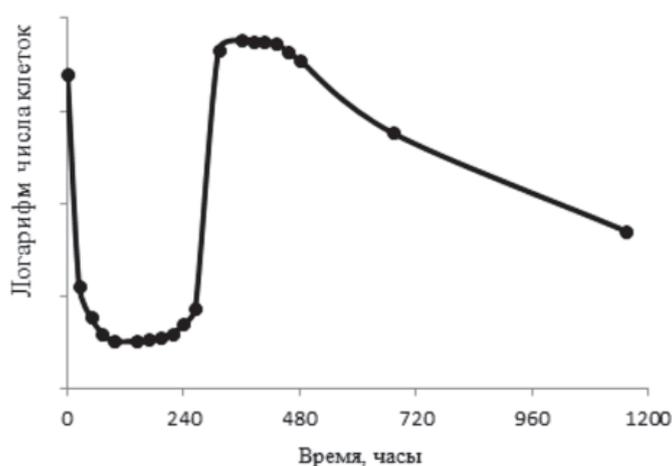


Рис. 5. Динамика изменения численности микроорганизмов

На полученной типичной кривой роста бактерий можно выделить 4 фазы: лаг-фаза (24–264 часа), соответствующая периоду физиологического приспособления. Имен-

но в этой фазе происходит биодеструкция парафинов, изопарафинов, ароматических углеводородов. Далее в системе образуются кислородсодержащие органические

соединения: эфиры (этил-трет-бутиловый эфир, трет-амиловый эфир, диизопропиловый эфир) и спирты (пропанол, бутанол), что соответствует экспоненциальной фазе роста бактерий (264–312 часов), характеризующейся максимальной скоростью клеточного деления. После 456 часов наступает фаза отмирания, причиной которой являются накопление токсичных метаболитов и разрушение под действием собственных ферментов.

Выводы

Таким образом, исследован процесс биодеструкции нефраса углеводородокисляющими микроорганизмами биопрепарата «МД». Показано, что комплексный состав биопрепарата способствует полной деструкции всех классов углеводородов входящих в состав нефтепродукта. Доказано, что быстрее всего биодеструкции подвергаются парафины и нафтены, их концентрация через 48 часов снижается на 80%. Через 216 часов биодеструкции концентрация изопарафинов уменьшается на 100%, происходит полное исчезновение данного класса углеводородов. Деструкции подвергаются также и ароматические углеводороды, их полная биотрансформация наступает через 9 суток воздействия биопрепарата.

Исследуемый биопрепарат является эффективным деструктором нефти и нефтепродуктов со схожими физико-химическими характеристиками нефраса.

Данные, полученные в ходе эксперимента, могут быть использованы при создании новых сообществ углеводородокисляющих микроорганизмов, ориентированных на физико-химические параметры загрязнителя.

Работа выполнена в рамках государственного задания «Наука» по теме 3.2702.2011.

Работа выполнена при поддержке программы проведения поисковой научно-исследовательской работы в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг «Поддержка научных исследований, проводимых молодыми учеными – кандидатами наук по научному направлению «Науки о жизни («Живые системы)» № 14 В37.21.1510

Список литературы

1. Башкин В.Н., Калинина И.Е., Галиулин Р.В., Галиулина Р.А. // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2009. – № 6. – С. 4–6.
2. Заборская А.Ю., Крамм Э.А., Кустова Н.А. Изучение влияния структураторов на процесс биоремедиации нефтезагрязненных почв // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2011. – № 1. – С. 10–13.
3. Киасса В., Пастнова И.Л., Абрамова И.Г. Попытка изоляции микроорганизмов рода *Pseudomonas* с территории НПЗ г. Алжира // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2007. – № 5. – С. 37–39.
4. Плешакова Е.В. Эколого-функциональные аспекты микробной ремедиации нефтезагрязненных почв: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Саратов, 2010. – 47 с.
5. Рудакова Л.В., Сакаева Э.Х., Петров В.Ю. Использование биореакторной технологии при восстановлении нефтезагрязненных почв // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2011. – № 7. – С. 35–38.

References

1. Bashkin V.N., Kalinina I.E., Galiulin R.V., Galiulina R.A. Protection of the environment in the oil and gas complex. 2009. no. 6. pp. 4–6.
2. Zaborckaya A.Y., Kramm E.A., Kustova N.A. Study of the influence of strukturators on the process of bioremediation of the petropolluted soils // Protection of the environment in the oil and gas complex. 2011. no. 1. pp. 10–13.
3. Kiassa V., Pastnova I.L., Abramova I.G. Attempt to isolation of microorganisms of the genus *Pseudomonas*, the refinery from the territory of Algeria // Protection of the environment in the oil and gas complex. 2007. no. 5. pp. 37–39.
4. Pleshakova E.V. Ecological and functional aspects of microbial remediation of petropolluted soils. Abstract of the thesis of the Dr. of biological sciences. Saratov, 2010. 47 p.
5. Rudakova L.V., Sakaeva E.H., Petrov V.Y. The use of bioreactor technology for the recovery of petropolluted soils // Protection of the environment in the oil and gas complex. 2011. no. 7. pp. 35–38.

Рецензенты:

Короткова Е.И., д.х.н., профессор кафедры физической и аналитической химии, заместитель директора по научной работе и инновационному развитию, ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск;

Ивашкина Е.Н., д.х.н., доцент кафедры химической технологии топлива и химической кибернетики, ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск.

Работа поступила в редакцию 01.07.2013.