

УДК 579.873.6.017.7.

Биодеструкция углеводородов высоковязкой нефти почвенными микроорганизмами

В. С. ОВСЯННИКОВА, Д. А. ФИЛАТОВ, Л. К. АЛТУНИНА, Л. И. СВАРОВСКАЯ

*Институт химии нефти Сибирского отделения РАН,
проспект Академический, 4, Томск 634021 (Россия)**E-mail: varja@ipc.tsc.ru*

(Поступила 20.03.14)

Аннотация

Исследовано влияние высоковязкой нефти месторождения Цагаан Элс (Монголия) на кислородную активность аборигенной почвенной микрофлоры. Показано, что после адаптации микроорганизмов к углеводородам их численность возрастает на два порядка, а ферментативная активность увеличивается в 2–3 раза. За 180 сут эксперимента утилизация вязкой нефти составляет 78 %. Анализ нефти после биодegradации показал, что в ней содержится большое количество кислородсодержащих соединений – промежуточных продуктов окисления при микробиологической ассимиляции нефтяных углеводородов. В составе исследуемой высоковязкой нефти все углеводороды затронуты биохимическим окислением почвенными микроорганизмами.

Ключевые слова: аборигенная почвенная микрофлора, ферментативная активность, биодеструкция, высоковязкие нефти, углеводородокисляющие микроорганизмы, нефтяные углеводороды, нафтены, арены

ВВЕДЕНИЕ

Проблема нефтяного загрязнения приобрела глобальные масштабы в конце XX века. Это связано с тем, что нефть стала самым распространенным источником энергии [1]. Из-за снижения запасов и объемов добычи маловязких, так называемых легких нефтей во многих нефтедобывающих регионах мира, в том числе и в России, необходимо вовлекать в хозяйственный оборот вязкие и высоковязкие нефти (с вязкостью выше 30 мПа·с) [2]. Россия занимает третье место после Канады и Венесуэлы по запасам тяжелых углеводородных ресурсов, которые составляют 7–13,5 млрд т [3].

Несовершенство технологий добычи, транспортировки, переработки и хранения нефти приводит к ее значительным потерям и в той или иной мере – к загрязнению атмосферы, почвы, вод, а также к негативному воздей-

ствию на человека, флору, фауну [4]. Потери нефти при современных объемах ее добычи исчисляются десятками миллионов тонн в год.

Из многочисленных методов, которые позволяют уменьшить концентрацию нефти в экосистемах, наиболее перспективными считаются биологические [5]. При этом предполагается не только внесение биопрепаратов, содержащих углеводородокисляющие микроорганизмы (УОМ), но и активация аборигенной микрофлоры загрязненных объектов.

Интенсивность процессов самоочищения почвы определяется наличием в ней углеводородокисляющей микрофлоры, способной к биодegradации нефти и нефтепродуктов. Эта таксономически разнообразная группа микроорганизмов способна окислять любые органические соединения нефтяного ряда, благодаря чему углерод нефти может вовлекаться в биохимический цикл. Представители этой группы широко распространены в природе.

Скорость и полнота утилизации нефтепродуктов в почве во многом зависят от численности и видового состава микрофлоры, а также ее углеводородокисляющей активности [6, 7].

Достаточно хорошо исследованы физико-химические свойства вязких нефтей и их углеводородный состав [8]. Но их трансформация в процессе биодеструкции изучена недостаточно. Высоковязкие и тяжелые нефти считаются труднодоступными для утилизации микроорганизмами, поэтому целью данной работы было изучение биохимического окисления углеводородов (УВ) высоковязкой нефти месторождения Цагаан Элс аборигенной почвенной микрофлорой.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбранная в качестве объекта исследования нефть месторождения Цагаан Элс (Монголия) относится к классу малосмолистых, высокопарафинистых тяжелых нефтей с повышенной вязкостью (табл. 1).

Загрязнение почвы проводили искусственно. Для этого почву просеивали через сито с размером ячеек 3 мм, взвешивали, загрязняли нефтью в концентрации 50 г/кг и гомогенизировали. Для эксперимента применяли почвогрунт "Гарант" (производство ПК Темп-2, Томская обл., Россия) на основе низинного торфа и биогумуса. Приготовленную таким

образом почву с нефтью помещали в стеклянные эксикаторы (толщина слоя почвы 12 см). Модельные почвенные системы инкубировали при температуре 20–22 °С. Влажность почвы поддерживали на уровне 26–28 %.

Схема эксперимента:

1) контроль: чистая почва для сравнительной оценки динамики численности микроорганизмов и ферментативной активности;

2) опыт № 1: почва, загрязненная высоковязкой нефтью, для определения динамики численности микроорганизмов и ферментативной активности;

3) опыт № 2: почва, загрязненная высоковязкой нефтью, для определения степени ее утилизации и анализа изменения ее состава.

Продолжительность эксперимента составила 180 сут.

В ходе опыта № 1 через определенные сутки отбирали усредненные пробы, оценивали численность в них гетеротрофной микрофлоры на мясопептонном агаре (МПА). После термостатирования вели подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ), а затем пересчитывали на 1 г сухой почвы [9].

Дегидрогеназную активность определяли фотокolorиметрическим методом по выделению окрашенного трифенилформаза (ТФФ) при инкубации почвы с раствором 2,3,5-трифенилтетразолия хлористого (ТТХ). Активность фермента выражали в мг ТФФ на 1 г почвы за 24 ч. Полифенолоксидазную и пероксидазную активность почвы определяли по интенсивности окраски хинона, образующегося при окислении гидрохинона кислородом воздуха. Активность ферментов выражали в миллиграммах хинона на 1 г почвы за 30 мин [10].

Остаточное содержание нефти в почве определяли гравиметрическим методом. Нефть из загрязненных образцов почвы экстрагировали хлороформом в аппарате Сокслета, затем освобождали от хлороформа на роторном испарителе и взвешивали [11].

Изменение структурного состава нефти анализировали методом ИК-спектроскопии на Фурье-спектрометре Nicolet 5700 FT-IR (Thermo Electron, США) и методом протонного магнитного резонанса на ЯМР-Фурье-спектрометре Avance-AV-300 (Bruker BIOSPIN, Германия).

ТАБЛИЦА 1

Физико-химическая характеристика нефти Цагаан-Элс

Показатели	Значения
Вязкость при 20 °С, мПа · с	21346
Плотность при 20 °С, кг/м ³	872.0
Содержание, мас. %	
парафины	21.2
ароматические УВ	68.0
смолы	9.8
асфальтены	1.0
Элементный состав, мас. %	
С	87.7
Н	11.08
Н	0.3
S	следы
О	1.1

Компонентный анализ органических соединений исходной и биodeградированной нефтей проводили методом хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) с внутренним стандартом на приборе DFS, Thermo Scientific (Германия), с кварцевой капиллярной хроматографической колонкой Thermo Scientific: внутренний диаметр 0.25 мм, длина 30 м, неподвижная фаза TR-5MS.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На процесс химического и биологического преобразования УВ нефти в почве влияет множество факторов: концентрация и состав нефтяного загрязнения, качественный и количественный состав почвенной микрофлоры, минеральный и органический состав почвы, температура, влажность, аэрация и кислотность среды и т. д. Но даже с учетом всех этих условий невозможно точно спрогнозировать путь, скорость и степень преобразования УВ в каждом конкретном случае [12].

На рис. 1 представлена динамика численности гетеротрофных бактерий в чистой (контроль) и нефтезагрязненной (опыт № 1) почве. В начальный период после загрязнения (кривая 2) отмечено снижение численности микроорганизмов от $(4-5) \cdot 10^6$ до $(0.8-0.9) \cdot 10^6$ КОЕ/г, что, вероятно, связано с гибелью неустойчивых групп в результате токсического действия некоторых УВ нефти (циклоалканы, ароматические). На 15-20-е сутки численность микроорганизмов достигла исходного уровня,

что, очевидно, обусловлено перестройкой микробиоценоза почвы, при которой преимущество получили УОМ. Относительно долгий период адаптации, по-видимому, объясняется тем, что высоковязкая нефть содержит большое количество высокомолекулярных соединений, которые трудно поддаются биологическому окислению. В целом, нефть обычно вызывает уменьшение видового разнообразия почвенной микрофлоры, вследствие чего начинают преобладать микроорганизмы-нефтедеструкторы родов *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*. Одновременно повышается способность почвенного микробиоценоза к использованию ранее недоступных субстратов. На 60-е сутки опыта достигнут максимум численности гетеротрофных бактерий $((730-850) \cdot 10^6$ КОЕ/г почвы), который сохранялся вплоть до 130 сут опыта. В контроле максимальная численность микроорганизмов была значительно ниже и не превышала $(7-13) \cdot 10^6$ КОЕ/г почвы (см. рис. 1, кривая 1).

Распад нефтяных УВ в почве представляет собой окислительно-восстановительный процесс с участием различных ферментов [13]. По этой причине данные об активности разных почвенных ферментов могут быть важны для оценки напряженности процессов трансформации нефтяного загрязнения.

Внесение высоковязкой нефти повлияло на активность всех изучаемых в работе ферментов – каталазы, дегидрогеназы, пероксида-

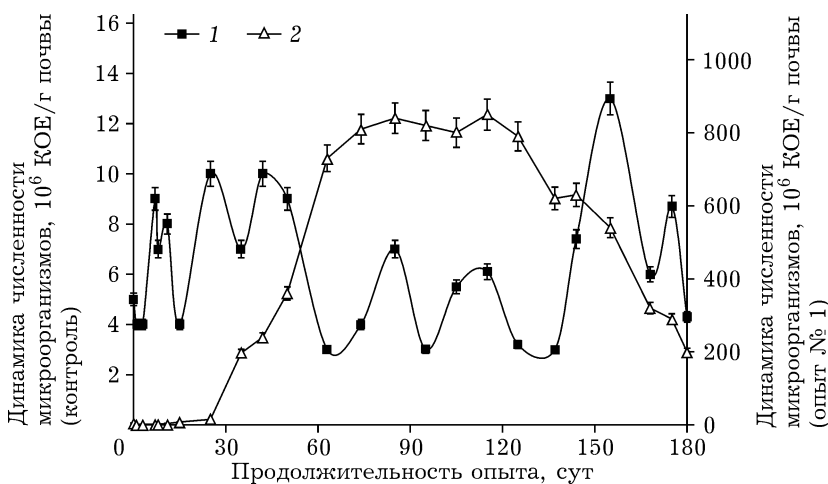


Рис. 1. Динамика численности гетеротрофных бактерий в чистой (1) и в загрязненной нефтью (2) почвах.

зы и полифенолоксидазы. Каталаза – окислительный фермент, участвует в разложении пероксидов (первичных продуктов, образующихся при внедрении кислорода в молекулу УВ) и обеспечивает микроорганизмы доступным кислородом, который необходим для минерализации нефти, так как все реакции микробиологического превращения УВ окислительные. Дегидрогеназы осуществляют в основном окисление алканов либо алифатической цепочки в сложных молекулах. Пероксидазы и полифенолоксидазы участвуют в многостадийных процессах разложения и синтеза органических соединений ароматического ряда.

На протяжении эксперимента активность всех исследованных ферментов возрастала и превышала контрольные данные в 2–3 раза, что свидетельствует об интенсивной трансформации УВ высоковязкой нефти (табл. 2).

Исследование гравиметрическим методом показало, что утилизация высоковязкой нефти за 180 сут составила 39 г/кг, или 78 % от исходного загрязнения.

Изменение структурного состава вязкой нефти при биодегградации исследовали методом ИК-спектроскопии в области частот 4000–800 см⁻¹, поскольку именно в этом диапазоне спектра проявляются полосы поглощения основных функциональных групп нефтяных УВ. В ИК-спектрах нефти после биодеструкции в почве фиксируются полосы поглощения (п.п.) в области 3290, 1708, 1736, 1290, 1270, 1210, 1170, 1070, 1030 см⁻¹, отсутствующие в ИК-спектрах исходной нефти. Нали-

чие этих полос указывает на появление большого количества кислородсодержащих соединений – спиртов, альдегидов, эфиров и карбоновых кислот, в том числе ароматических, которые являются промежуточными продуктами окисления УВ. В ¹³C ЯМР-спектрах биодegradированной нефти появляются сигналы (59–61, 62–63, 71–73, 165–172, 185–210 м. д.), характерные для этих же соединений.

Кислородсодержащие метаболиты, обладающие поверхностно-активными свойствами, диспергируют и эмульгируют УВ нефти, которые слаборастворимы или нерастворимы в воде. В результате увеличивается поверхность контакта бактерий с гидрофобными УВ и снижается межфазное натяжение на границе нефть – почва. Это подтверждает данные, полученные нами ранее при биодеструкции высоковязкой нефти Усинского месторождения [14], и свидетельствует об окислении различных по структуре УВ нефти микроорганизмами.

Характеристичными показателями для оценки степени биодегградации нефти служат спектральные коэффициенты (табл. 3). Рост спектральных коэффициентов С₁ и С₂ свидетельствует об увеличении ароматичности образца за счет снижения доли насыщенных УВ, а увеличение коэффициента разветвленности (СН₃/СН₂) указывает на относительное увеличение доли разветвленных алканов по отношению к длинноцепочечным. Коэффициенты окисленности (С=О/С–С) и (С=О/СН₃) определяются как отношение интенсивности образования продуктов окисления УВ С=О к

ТАБЛИЦА 2

Ферментативная активность почвы, загрязненной высоковязкой нефтью

Образцы почвы	Каталаза, мл/г	Дегидрогеназа, мг/г	Пероксидаза, мг/г	Полифенолоксидаза, мг/г
Исходная	3.30±0.25	0.32±0.02	0.31±0.03	0.18±0.02
<i>В течение 30 сут</i>				
Контроль	3.40±0.15	0.36±0.02	0.30±0.02	0.21±0.02
Опыт № 1	9.1±0.20	0.79±0.03	0.58±0.03	0.38±0.02
<i>В течение 90 сут</i>				
Контроль	2.95±0.20	0.34±0.02	0.37±0.02	0.20±0.03
Опыт № 1	9.00±0.30	1.10±0.04	1.01±0.04	0.59±0.02
<i>В течение 180 сут</i>				
Контроль	3.20±0.10	0.33±0.02	0.33±0.03	0.22±0.02
Опыт № 1	6.70±0.20	0.87±0.02	0.73±0.02	0.54±0.01

ТАБЛИЦА 3

Изменение спектральных характеристик в процессе биодеградациии высоковязкой нефти месторождения Цагаан Элс

Объекты	Спектральные коэффициенты				
	C ₁	C ₂	CH ₃ /CH ₂	C=O/C=C	C=O/CH ₃
	D ₁₆₁₀ /D ₇₂₀	D ₇₅₀ /D ₇₂₀	D ₁₃₈₀ /D ₇₂₀	D ₁₇₁₀ /D ₁₆₁₀	D ₁₁₇₀ /D ₁₃₈₀
Исходная нефть	0.43	0.62	1.11	0.01	0.03
После биодеструкции	1.17	0.98	2.93	2.01	0.64

ТАБЛИЦА 4

Хромато-масс-спектрометрический анализ исходной и биодеградированной нефти месторождения Цагаан Элс

Углеводороды	Химическая формула	Концентрация вещества в нефти, мг/г		Деструкция, %
		Исходная	После деструкции	
Алканы	C _n H _{2n+2}	35.94129	7.01933	80.47
Циклогексаны	C _n H _{2n}	5.44546	0.36103	93.37
Стераны	C ₂₇ H ₄₈ -C ₂₉ H ₅₂	0.24230	0.13181	45.60
Терпаны	C ₂₉ H ₅₀ -C ₃₀ H ₅₂	0.21221	0.10355	51.20
Бензолы (моноарены)	C _n H _{2n-6}	0.19867	0.06171	68.95
Алкилбензолы	C _n H _{2n-6}	0.21356	0.01616	98.17
Биароматические				
Нафталин	C ₁₀ H ₈	0.65421	0.17761	72.85
Метилнафталин	C ₁₁ H ₁₀	0.19534	0.04467	77.13
Диметилнафталин	C ₁₂ H ₁₂	0.10301	0.00226	97.80
Триметилнафталин	C ₁₃ C ₁₄	0.17631	0.00209	98.81
Тетраметилнафталин	C ₁₄ C ₁₆	0.09849	0.00087	99.11
Сумма нафталинов		1.22736	0.22750	81.46
Аценафтен + бифенил	C ₁₂ H ₁₀	0.19114	0.03792	80.16
Метил (бифенилы + аценафтен)	C ₁₃ H ₁₂	0.15005	0.02166	85.56
Диметил (бифенилы + аценафтен)	C ₁₄ H ₁₆	0.46003	0.03243	92.95
Триметил (бифенилы + аценафтен)	C ₁₆ H ₁₈	0.22967	0.01173	94.89
Тетраметил (бифенилы + аценафтен)	C ₁₈ H ₂₀	0.09575	0.00300	96.86
Сумма бифинилов		1.12660	0.10670	90.52
Триароматические				
Фенантрен	C ₁₄ H ₁₀	0.68979	0.11250	83.69
Метилфенантрен	C ₁₅ H ₁₂	0.41266	0.05405	86.90
Диметилфенантрен	C ₁₆ H ₁₄	0.64123	0.06078	90.52
Триметилфенантрен	C ₁₇ H ₁₆	0.29733	0.01016	96.58
Фенантрен + антрацен	C ₁₆ H ₁₃	0.30598	0.06342	79.27
Фенантрен + антрацен + ретен	C ₁₇ H ₁₄	0.65472	0.11182	82.92
Сумма фенантренов		3.00171	0.41273	86.26
Полиароматические				
Флуорантен	C ₁₆ H ₁₀	0.01348	0.00468	65.23
Метил (пирен + флуорантен)	C ₁₇ H ₁₂	0.01211	0.00323	73.31
Диметил (пирен + флуорантен)	C ₁₈ H ₁₄	0.02048	0.00364	82.21
Тетраметил (пирен + флуорантен)	C ₁₉ H ₁₆	0.04996	0.00673	86.51
Сумма флуорантенов		0.09603	0.01828	80.96

интенсивности полос поглощения ароматических и насыщенных УВ-структур (см. табл. 3). Закономерное увеличение всех спектральных коэффициентов указывает на процессы микробиологического окисления УВ нефти.

Согласно данным ГХ-МС, биодеструкция в той или иной степени затронула все содержащиеся в нефти УВ (табл. 4). Общая деструкция *n*-алканов составила 80.4 %. Циклогексаны (нафтены), входящие в состав нефти, относительно устойчивы к микробиологическому окислению. Хотя структуры нафтенов подобны *n*-алканам, их биоокисление реализуется по другой схеме. Микробное окисление нафтенов начинается с образования диолов, которые затем преобразуются до различных органических кислот. Показано, что циклические УВ исследуемых нефтей относительно легко окисляются почвенными бактериями. Деструкция циклогексанов составила 93.7 %. В силу строения стерановые и терпановые УВ устойчивы к биологическому воздействию, поэтому их содержание уменьшилось лишь на 45–51 %.

Устойчивость к микробиологическому окислению голоядерных и замещенных ароматических УВ зависит от разных факторов: числа колец, количества, структуры и положения заместителей. По этой причине степень биодegradации аренов разного строения оказалась различной: концентрация бензола снизилась на 68.9 %, алкилбензолов – на 98.1 %, голоядерных соединений (нафталин, бифенил, фенантрен, флуорантен) – на 65–83 %, а их метилзамещенных гомологов – на 73–99 %.

По-видимому, первичное окисление бензольного кольца полярных ароматических соединений происходит главным образом по месту присоединения боковой цепи или по месту соединения колец. Окисление алкильного заместителя зависит от его формы: чем он длиннее, тем выше степень его биохимического окисления.

В целом, пути распада ароматических соединений под влиянием микроорганизмов разнообразны [15]. В конечном счете микроорганизмы осуществляют превращение ароматических УВ до более простых соединений, которые затем усваиваются, например, по циклу Кребса с образованием окончательных продуктов CO_2 и H_2O .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что аборигенная микрофлора плодородных почв обладает высокой адаптивной способностью при низкой степени загрязнения (<5 %) вязкой высокопарафинистой нефтью. Численность микрофлоры по ходу эксперимента возрастает в 200–300 раз, активность изучаемых ферментов повышается в 2–3 раза, что обеспечивает за 180 сут биодеструкцию нефтезагрязнения на 78 %.

После биодеструкции в нефти месторождения Цагаан Элс значительно снизилась доля насыщенных, циклических и ароматических компонентов и выросла доля кислородсодержащих структур.

Все определяемые УВ затронуты биоокислением, степень которого определяется их строением. Так, содержание алкилзамещенных моно-, би- и триаренов снизилось гораздо значительнее, чем голоядерных аренов того же класса. Содержание нафтенов уменьшилось на 93 %, алканов – на 80 %. Самыми устойчивыми к микробному окислению оказались стераны и терпаны: их содержание уменьшилось всего на 45–51 %.

Установлено, что консорциум аборигенной почвенной микрофлоры в результате биохимического окисления разрушает не только легкие фракции нефти (низкомолекулярные *n*-алканы, изоалканы и циклоалканы), которые более доступны для микробиологического окисления, но и би- и трициклические ароматические соединения – самую опасную группу веществ с точки зрения воздействия на живые организмы и наиболее токсические компоненты нефти.

Остаточная после биодegradации нефть, вероятно, представлена преимущественно высокомолекулярными гетероатомными неуглеводородными компонентами (смолами, асфальтенами, мальтенами и др.), которые не определяются комплексом использованных методов анализа.

Можно заключить, что для интенсивной биодеструкции УВ высоковязких нефтей обязательно использовать интродукцию чужеродных штаммов-нефтедеструкторов. Иногда достаточно максимально устранить факторы, ограничивающие рост аборигенных микроорганизмов, такие как температуру, аэрацию,

влажность и недостаток биогенных элементов. Обеспечив оптимальные условия функционирования аборигенной почвенной микрофлоры, можно эффективно и экономично восстановить территории, загрязненные как легкими, так и высоковязкими нефтями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Якуцени В. П., Петрова Ю. Э., Суханов А. А. // Нефтегазовая геология. Теория и практика. 2007. № 2. С. 1–11.
- 2 Полищук Ю. М., Яценко И. Г. // Нефт. хоз-во. 2007. № 2. С. 110–113.
- 3 Артеменко А. И., Кащавцев В. Е. // Нефть России. 2003. № 11. С. 30–33.
- 4 Оборин А. А., Хмурчик В. Т., Иларионов С. А., Назаров А. В. Нефтезагрязненные биоценозы. Пермь: Изд-во ПГУ, 2008. 511 с.
- 5 Жуков Д. В., Мурыгина В. П., Калужный С. В. // Усп. совр. биологии. 2006. Т. 126, № 3. С. 285–296.
- 6 Середина В. П., Бурмистрова Т. И., Терещенко Н. Н. Нефтезагрязненные почвы: свойства и рекультивация. Томск: Изд-во ТПУ, 2006. 270 с.
- 7 Иларионов С. А. Экологические аспекты восстановления нефтезагрязненных почв. Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 2004. 194 с.
- 8 Надиров Н. К. Высоковязкие нефти и природные битумы. В 5-ти т. Нетрадиционные методы переработки. Т. 3. Алматы: Гылым, 2001. 415 с.
- 9 Звягинцев Д. Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во МГУ, 1991. 231 с.
- 10 Хазиев Ф. Х. Методы почвенной энзимологии. М.: Наука, 2005. 252 с.
- 11 Другов Ю. С., Родин А. А. Анализ загрязненной почвы и опасных отходов. Практическое руководство. М.: Бином, 2007. 263 с.
- 12 Тимергазина А. Ф., Переходова Л. С. // Нефтегазовая геология. Теория и практика. 2012. № 1. С. 1–28.
- 13 Киреева Н. А., Водопьянов В. В., Мифтахова А. М. Биологическая активность нефтезагрязненных почв. Уфа: Гилем, 2001. 376 с.
- 14 Филатов Д. А., Гулая Е. В., Сваровская Л. И., Алтунина Л. К. // Нефтехимия. 2013. Т. 53, № 1. С. 64–69.
- 15 Ленева Н. А., Коломьцева М. П., Баскунов Б. П., Головлева Л. А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45, № 2. С. 188–194.