

УТИЛИЗАЦИЯ углеводородов, смол и асфальтенов нефтеокисляющими МИКРООРГАНИЗМАМИ КЕРЧЕНСКОГО ПРОЛИВА

Исследована биodeградация углеводородов, смол и асфальтенов сырой нефти 14 штаммами нефтеокисляющих микроорганизмов, выделенных в 2007 г. на месте аварийного разлива нефтепродуктов в Керченском проливе Азовского моря. Показано, что все исследованные штаммы утилизируют смолы, содержащиеся в сырой нефти, а подавляющее их большинство деградирует также углеводороды и асфальтены.

По суммарной биodeградации сырой нефти лидируют штаммы *Achromobacter xylosoxidans* № 4, 5, 7 и *Acinetobacter calcoaceticus* № 6 и 13.



Введение

Окисление углеводородов микроорганизмами – ведущий фактор природного процесса деградации нефти [1, 2]. В состав сырых нефтей входят тысячи соединений различной химической природы [3-7], среди которых выделяют такие крупные группы веществ, как углеводороды, смолы и асфальтены. За прошедшие десятилетия изучения биodeградации нефти хорошо исследована утилизация линейных и разветвленных углеводородов (особенно с низкой и средней молекулярной массой), а также ароматических углеводородов с пятью и менее ароматическими кольцами в составе молекулы [8, 9]. Тем не менее, Хараяма с соавт. в 1999 г. отметил, что способность микроорганизмов к биodeградации смол и асфальтенов не изучена [10]. К сожалению, за прошедшее десятилетие наши знания по этому вопросу изменились незначительно.

Предметом проводимых исследований являлась утилизация углеводородов, смол и асфальтенов нефтеокисляющими микроорганизмами (14 штаммов), выделенными в 2007 г. на месте аварийных разливов нефтепродуктов в Керченском проливе, соединяющем Азовское и Черное моря [11]. Исследование нефтедеградирующей микрофлоры

И.С. Сазыкин*,
научный сотрудник
лаборатории
промышленных
микроорганизмов
Научно-
исследовательского
института биологии
Южного
Федерального
Университета

М.А. Сазыкина,
кандидат
биологических наук,
доцент,
зав. лабораторией
промышленных
микроорганизмов
Научно-
исследовательского
института биологии
Южного
Федерального
Университета

Керченского пролива представляет особый интерес в связи с интенсивным судоходством, и, как следствие, достаточно сильным антропогенным загрязнением нефтепродуктами, даже в отсутствие аварийных ситуаций.

Основной задачей работы являлось определение, какие именно группы компонентов нефти и в какой степени подвергаются биodeградации изучаемыми штаммами нефтеокисляющих микроорганизмов.

Материалы и методы исследования

Инкубация нефтедеградирующих микроорганизмов в среде, содержащей нефть. Культуры нефтеокисляющих микроорганизмов выращивали на среде Ворошиловой и Диановой следующего состава: NH_4NO_3 – 1,0 г/л; K_2HPO_4 – 1,0 г/л; KH_2PO_4 – 1,0 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г/л; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,02 г/л; насыщенный раствор $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 200 мкл/л [12].

В качестве единственного источника углерода в данную среду добавляли 2 % сырой нефти

* Адрес для корреспонденции: zebra-sis@yandex.ru

(сырая нефть Октябрьского месторождения Ростовской области, богатая тяжелыми фракциями, скважина № 41, пласт XXII). Также в состав среды (в количестве 1 мл на 1 л среды) добавлялся раствор микроэлементов по Федорову:

H_3BO_3 – 5,0 г/л; $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ – 5,0 г/л;
 KI – 5,0 г/л; NaBr – 5,0 г/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г/л; $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ – 0,3 г/л [12].

Нефтеокисляющие микроорганизмы выращивали в конических колбах объемом 50 мл с 15 мл минеральной среды Ворошиловой и Диановой с 2 % (300 мкл) сырой нефти в шейкере-инкубаторе Biosan ES-20 (Biosan, Литва) в течение 7 сут при температуре 30 °С и скорости вращения платформы 220 об/мин. Контролем служили незасеянные (стерильные) колбы со средой Ворошиловой и Диановой с добавлением такого же количества нефти, инкубированные аналогичным образом.

Количественное определение пофракционной биodeградации компонентов нефти спектрофотометрическим и флуориметрическим методом

Разделение нефти на углеводороды, смолы и асфальтены проводилось методом тонкослойной хроматографии [13-17]. После хроматографирования в системе растворителей гексан : четыреххлористый углерод : уксусная кислота зоны углеводородов, смол и асфальтенов счищались с пластинок и элюировались четыреххлористым углеродом (углеводороды) и хлороформом (смолы и асфальтены).

Спектры возбуждения и люминесценции полученных растворов имели максимумы:

В.А. Чистяков,
кандидат биологических наук, зав. лабораторией экспериментального мутагенеза Научно-исследовательского института биологии Южного Федерального Университета

А.А. Кленкин,
доктор химических наук, доцент, зав. лабораторией аналитического контроля водных экосистем ФГУП «АзНИИРХ»

Л.Ф. Павленко,
кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории аналитического контроля водных экосистем ФГУП «АзНИИРХ»

◆ углеводороды – $\lambda_{\text{возб}} = 380$ нм, $\lambda_{\text{люм}} = 440$ нм;
◆ смолы – $\lambda_{\text{возб}} = 410$ нм, $\lambda_{\text{люм}} = 490$ нм;
◆ асфальтены – $\lambda_{\text{возб}} = 450$ нм, $\lambda_{\text{люм}} = 500$ нм.
Из полученных фракций углеводородов, смол и асфальтенов готовились растворы с известной концентрацией, которые затем использовались для построения градуировочных графиков.

Измерение оптических характеристик растворов с различными концентрациями углеводородов, смол и асфальтенов, полученных путем последовательного разбавления исходных растворов, проводилось на ИК-спектрофотометре IR-270 (Hitachi), УФ-спектрофотометре UV-2450 (Shimadzu), спектрофлуориметрах RF-510 и RF-5301PC (Shimadzu). Опытные образцы нефти также разделяли при помощи тонкослойной хроматографии, счищали с пластинок и элюировали, как описано выше. Количество углеводородов, смол и асфальтенов в образцах нефти, инкубированных с нефтедеградирующими микроорганизмами, определяли по интенсивности оптических характеристик их элюатов. Все эксперименты проводились в 3 повторностях.

Результаты и их обсуждение

Концентрации углеводородов, смол и асфальтенов, обнаруженные в культуральной жидкости после биodeградации нефти различными микроорганизмами, приведены в табл. 1.

Изменение их концентраций представлено в табл. 2.

Обнаружено разнонаправленное изменение концентраций углеводородов и асфальтенов в ходе экспериментов с различными штам-



Таблица 1

Концентрации (мг/мл) углеводов, смол и асфальтенов в культуральной среде после воздействия различных штаммов микроорганизмов в течение 7 сут.

Штамм		Содержание отдельных компонентов нефти, мг/мл			Σ нефтяных компонентов, мг/мл
№	Видовое название	углеводороды	смолы	асфальтены	
	Контроль*	11,23 ± 0,16	1,75 ± 0,07	0,39 ± 0,04	13,35 ± 0,19
1.	<i>Exiguobacterium undae</i>	11,08 ± 0,17	1,18 ± 0,00	0,57 ± 0,01	12,83 ± 0,18
2.	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	11,30 ± 0,24	1,18 ± 0,02	0,60 ± 0,03	13,08 ± 0,24
3.	<i>Kocuria rosea</i>	11,35 ± 0,14	1,18 ± 0,00	0,59 ± 0,04	13,12 ± 0,13
4.	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	9,58 ± 0,31	1,11 ± 0,03	0,35 ± 0,01	11,04 ± 0,33
5.	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	9,64 ± 0,27	1,13 ± 0,03	0,36 ± 0,01	11,12 ± 0,30
6.	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	10,15 ± 0,74	1,14 ± 0,02	0,51 ± 0,11	11,81 ± 0,86
7.	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	9,77 ± 0,21	1,11 ± 0,02	0,36 ± 0,02	11,24 ± 0,23
8.	<i>Kocuria rosea</i>	10,88 ± 0,32	1,47 ± 0,03	0,37 ± 0,01	12,7 ± 0,31
9.	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	10,39 ± 0,59	1,32 ± 0,18	0,37 ± 0,01	12,09 ± 0,76
10.	<i>Shewanella putrefaciens</i>	11,17 ± 0,17	1,18 ± 0,16	0,32 ± 0,21	12,78 ± 0,33
11.	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	11,47 ± 0,25	1,17 ± 0,02	0,32 ± 0,01	12,95 ± 0,26
12.	<i>Micrococcus luteus</i>	11,5 ± 0,15	1,18 ± 0,03	0,33 ± 0,01	13,02 ± 0,17
13.	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	9,35 ± 0,24	1,45 ± 0,22	0,33 ± 0,01	11,13 ± 0,32
14.	<i>Kocuria rhizophila</i>	11,15 ± 0,48	1,17 ± 0,04	0,35 ± 0,02	12,67 ± 0,52

* Питательная среда Ворошиловой и Диановой с нефтью, инкубированная без микроорганизмов.

Таблица 2

Изменение концентраций компонентов нефти в ходе экспериментов с различными штаммами микроорганизмов, %.

Штамм		Углеводороды	Смолы	Асфальтены	Σ нефтяных компонентов
№	Видовое название				
1.	<i>Exiguobacterium undae</i>	>1,3*	>32,7	<46,6	>3,9
2.	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<0,7	>32,7	<55,2	>2,0
3.	<i>Kocuria rosea</i>	<1,1	>32,7	<53,4	>1,7
4.	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	>14,7	>36,9	>8,6	>17,3
5.	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	>14,1	>35,7	>6,9	>16,7
6.	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	>9,6	>35,0	<32,8	>11,5
7.	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	>12,9	>36,9	>6,9	>15,8
8.	<i>Kocuria rosea</i>	>3,1	>16,3	>3,4	>4,7
9.	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	>7,4	>24,7	>3,4	>9,4
10.	<i>Shewanella putrefaciens</i>	>0,5	>32,7	>17,2	>4,2
11.	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	<2,1	>33,5	>17,2	>2,9
12.	<i>Micrococcus luteus</i>	<2,5	>32,7	>13,8	>2,4
13.	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	>16,7	>17,1	>15,5	>16,6
14.	<i>Kocuria rhizophila</i>	>0,7	>33,5	>8,6	>5,1

* Снижение концентрации обозначено знаком >, повышение – знаком <. Курсивом выделено увеличение количества группы компонентов нефти в процессе инкубации с микроорганизмами.

мами (табл. 2). Для смол, независимо от штамма, отмечено падение их концентраций. Для асфальтенов при инкубации с большинством штаммов (за исключением штаммов № 1, 2, 3 и 6) также отмечено уменьшение концентраций, при этом инкубация со штаммами № 1, 2, 3 и 6 приводила к значительному (до 55 % у штамма № 2) росту количества асфальтенов.

Содержание углеводов в процессе инкубации с десятью штаммами из четырнадцати исследованных снижалось, причем в некоторых случаях весьма заметно (штаммы № 4, 5, 7 и 13). В присутствии штаммов № 2, 3, 11 и 12 количество углеводов незначительно возрастало.

Рост количества асфальтенов и углеводов может быть связан с отщеплением алифатических заместителей у молекул смол, а рост количества асфальтенов — с последующей конденсацией полиароматических ядер смол в процессе их окисления. Определенный вклад, по всей видимости, могут вносить также собственные процессы биосинтеза микроорганизмов и трансформация остальных компонентов нефти.

Содержание отдельных компонентов в нефти из разных месторождений может варьировать в очень широких пределах [3-7]. Углеводы обычно составляют основную долю в массе нефти — 70–95 %. Содержание смолисто-асфальтеновых компонентов может достигать более 40 %. С увеличением плотности нефтей доля смолистых компонентов возрастает. К смолисто-асфальтеновым веществам относятся высокомолекулярные гетероорганические соединения нефти, в состав которых одновременно входят угле-

Ключевые слова:
нефтеоокисляющие
микроорганизмы,
углеводороды,
смолы,
асфальтены,
биодegradация

род, водород, кислород, сера, а часто азот и металлы. Деление на смолы и асфальтены проводят весьма условно по ряду признаков: молекулярной массе, элементному составу и степени насыщенности.

Элементный состав асфальтенов близок к элементному составу смол, но отличается более высоким содержанием углерода и кислорода. Среднее отношение углерода к водороду у смол порядка 8:1, а у асфальтенов — 12:1 [18].

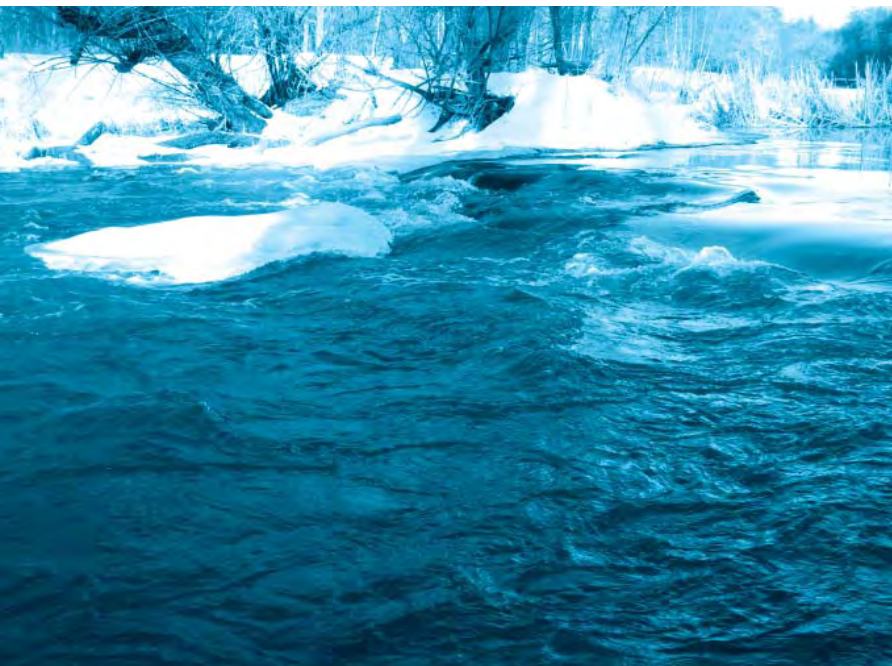
Молекулярные массы смол колеблются от 500 до 2000, составляя, в основном, 600-1000, асфальтенов — от 1000 до 10000, причем большая часть их имеет молекулярную массу от 5000 до 10000 [19].

Кроме этого, асфальтены отличаются от смол меньшим содержанием водорода и, соответственно, большим содержанием углерода и гетероатомов. Без гетероатомов общую формулу для смол и асфальтенов можно представить в виде C_nH_{2n-x} , где значения x для смол колеблются в пределах от 10 до 34, а для асфальтенов могут достигать 100-120 [5].

В результате исследования биодegradации фракций нефти исследуемыми штаммами нефтеоокисляющих микроорганизмов были определены наиболее активные деструкторы углеводов (штаммы *Achromobacter xylosoxidans* № 4, 5, 7 и *Acinetobacter calcoaceticus* № 13), смол (штаммы *Achromobacter xylosoxidans* № 4, 5, 7 и *Acinetobacter calcoaceticus* № 6) и асфальтенов (штаммы *Shewanella putrefaciens* № 10, *Pseudomonas anguilliseptica* № 11, *Micrococcus luteus* № 12 и *Acinetobacter calcoaceticus* № 13). По суммарной биодegradации сырой нефти лидировали штаммы *Achromobacter xylosoxidans* № 4, 5, 7 и *Acinetobacter calcoaceticus* № 6 и 13, каждый из которых утилизировал более 10 % нефти во время инкубации в течение 7 сут.

В целом, в результате анализа фракционной биодegradации нефти становится очевидной заметная утилизация микроорганизмами смол (молекулярная масса 600-1000) и асфальтенов (молекулярная масса 1000-10000).

Данные по количественной утилизации нефти, полученные нами, согласуются с данными по нефтеоокисляющей активности микроорганизмов из районов с высоким уровнем антропогенной нагрузки, таких как прибрежные воды Норвегии [20], эстуарии Темзы [21] и Сены [22]. К сожалению, в перечисленных работах речь идет лишь об утилизации алканов с длиной цепочки до 32-36 атомов углерода и 3-5 кольцевых ПАУ и не рассматривается биодegradация таких тяжелых фракций, как смолы и асфальтены. При



этом ассимиляция алканов достигает 41-99 %, нафталина – 43-99 % и 4-5 кольцевых ПАУ – 32-82% в течение 3-10 недель, а наиболее активный метаболизм углеводов наблюдается у микроорганизмов, выделенных из Северного моря [20].

Несколько особняком стоят данные Шкидченко и Аринбасарова по деградации нефти микроорганизмами, выделенными из загрязненных нефтью грунтов побережья Каспийского моря в окрестностях Баку [23]. По данным исследователей, эти микроорганизмы метаболизировали до 24-32 % как легких, так и тяжелых фракций нефти в течение 6 сут, что характеризует их как крайне активных деструкторов. Эти данные поддерживают методологию поиска наиболее активных штаммов нефтедеградирующих микроорганизмов для применения в биоремедиационных технологиях в местах, подверженных постоянному загрязнению различными нефтепродуктами, к которым можно отнести и Керченский пролив Азовского моря.

Заключение

Показано, что все исследованные штаммы нефтеокисляющих микроорганизмов утилизируют смолы, содержащиеся в сырой нефти. Подавляющее большинство штаммов утилизирует также углеводороды и асфальтены, у остальных незначительный рост количества углеводородов и заметное увеличение количества асфальтенов в процессе инкубации могут быть связаны с биodeградацией смол. Путем сравнения экспериментальных данных с литературными подтверждена стратегия поиска и отбора нефтедеградирующих микроорганизмов для применения в биоремедиации в местах, подвергающихся постоянному загрязнению нефтью и нефтепродуктами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и образования РФ (проект по аналитической ведомственной целевой программе «Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2010 годы)», грант № 2.1.1/5232).

Литература

1. Atlas R.M. Bioremediation of petroleum pollutants: diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation / R.M. Atlas, C.E. Cerniglia // *BioScience*. 1995. V. 45. P. 332-338.



2. Миронов О.Г. Нефтеокисляющие микроорганизмы в море. Киев, 1971. 335 с.
3. Кормак Д. Борьба с загрязнением нефтью и химическими веществами. – Москва: Транспорт, 1989. 367 с.
4. Израэль Ю.А., Цыбань А.В. Антропогенная экология океана. Л.: Гидрометеоздат, 1988. 528 с.
5. Эрих В.Н. Химия нефти и газа. Л.: Химия, 1969. 281 с.
6. Вассоевич Н.Б. Происхождение нефти // *Вестник МГУ, серия Геология*, 1975. № 6. С. 3-23.
7. Патин С.А. Экологические проблемы освоения нефтегазовых ресурсов морского шельфа. М.: ВНИРО, 1997. 349 с.
8. Van Hamme J.D. Recent Advances in Petroleum Microbiology / J.D. Van Hamme, A. Singh, O.P. Ward // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003, V. 67. № 4. P. 503–549.
9. Lafortune I. Bacterial diversity of a consortium degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons in a two-liquid phase biosystem / I. Lafortune, P. Juteau, E. D'ziel, F. Lipine, R. Beaudet, R. Villemur // *Microb. Ecol.* 2009. V. 57. № 3. P. 455-468.
10. Harayama S. Petroleum biodegradation in marine environments / S. Harayama, H. Kishira, Y. Kasai, K. Shutsubo // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1999. V. 1. № 1. P. 63-70.
11. Керченская авария: последствия для водных экосистем. Авторский коллектив / под ред. И.Г. Корпаковой, С.А.Агапова. Ростов н/Д: ФГУП АЗНИИРХ, 2008. 229 с.
12. Родина А.Г. Методы водной микробиологии. М.: Наука, 1965. 363 с.
13. Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах природных (пресных и морских) и очищенных сточных и питьевых вод // Регистрат

ционный код МВИ по Федеральному реестру: ФР.1.31.2005.

14. Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в пробах почв и донных отложений пресноводных и морских водоёмов // Регистрационный код МВИ по Федеральному реестру: ФР.1.31.2005.01512.

15. Кленкин А.А. Некоторые методические особенности определения уровня нефтяного загрязнения водных экосистем / А.А. Кленкин, Л.Ф. Павленко, З.А. Темердашев // Заводская лаборатория. 2007. Т. 73. № 2. С. 31–35.

16. Павленко Л.Ф. Смолистые компоненты нефти в природных водах / Л.Ф. Павленко, А.Д. Семенов, А.Г. Страдомская, Л.Н. Лопатина // Гидрохим. мат.-лы, 1978. Т. 74. С. 18–23.

17. Павленко Л. Ф. Определение нефтепродуктов в природных водах. Автореф. дис... канд. хим. наук. Ростов н/Д.: ГХИ, 1982. 28 с.

18. Сергиенко С.Р. Обзор структур нефтяных смол и асфальтенов в различных русских нефтях // Нефтехимия. 1977. Т.17. № 6. С. 809- 819.

19. Witherspoon P.A. The asphaltic components of petroleum / P.A. Witherspoon, R.S. Winniford // Chapt. 6, Fundamental aspects

of petroleum geochemistry. Amsterdam, 1967. 200 p.

20. Brakstad O.G. Biotransformation and dissolution of petroleum hydrocarbons in natural flowing seawater at low temperature / O.G. Brakstad, K. Bonaunet, T. Nordtug, O. Johansen // Biodegradation. 2004. V. 15. № 5. P. 337-346.

21. McKew B.A. Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK / B.A. McKew, F. Coulon, A.M. Osborn, K.N. Timmis, T.J. McGenity // Environ. Microbiol. 2007 V. 9. № 1. P. 165-176.

22. Niepceon M. Both Cycloclasticus spp. and Pseudomonas spp. as PAH-degrading bacteria in the Seine estuary (France) / M. Niepceon., F. Portet-Koltalo, C. Merlin, A. Motelay-Massei, S. Barray, J. Bodilis // FEMS Microbiol. Ecol. 2010. V. 71. № 1. P. 137-147.

23. Шкидченко А.Н., Аринбасаров М.У. Изучение нефтедеструктивной активности микрофлоры прибрежной зоны Каспийского моря // Прикл. биохим. и микробиол. 2002. Т. 38. №5. С. 509-512.



I. S. Sazykin, M.A. Sazykina, V.A. Chistyakov, A.A. Klenkin, L.F. Pavlenko

HYDROCARBON RESIN AND ASPHALTEN UTILIZATION BY PETROLEUM-DEGRADING MICROORGANISMS TAKEN FROM KERCH STRAIT

Hydrocarbon resin and raw petroleum asphalten biodegradation by 14 strains of petroleum-degrading microorganisms has been investigated. The microorganisms were separated out of Kerch Strait (Sea of Azov) in the very

place of accidental oil spill in 2007. All investigated strains were proved to utilize resins in raw petroleum, the majority of them degrading hydrocarbons and asphaltens. *Achromobacter xylooxidans* strain № 4, 5, 7 and *Acinetobacter*

calcoaceticus strain № 6, 13 are the leading ones in petroleum-degrading process.

Key words: petroleum-degrading microorganisms, hydrocarbons, resins, asphaltens, biodegradation