

ПОДБОР АССОЦИАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ–ДЕСТРУКТОРОВ НЕФТЯНОЙ ФРАКЦИИ ТВЕРДЫХ АЛКАНОВ ПРИ НИЗКИХ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ
Алексеев А.Ю.^{1,2}, Смородина Е.А.², Адаменко Л.С.², Емельянова Е.К.^{2,3}, Забелин В.А.⁴,
Ильичева Т.Н.^{1,2}, Резников В.А.¹, Шестопапов А.М.^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск

Новосибирск, Россия (630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2), al-alexok@ngs.ru

²Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово

Новосибирская обл., Кольцово, Россия (630559, Кольцово), shestopalov2@ngs.ru

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Новосибирский Государственный Медицинский Университет, Новосибирск

Новосибирск, Россия (630091, Новосибирск, Красный проспект, 52), emelen1@yandex.ru

⁴Закрытое акционерное общество «Биоойл», Новосибирск

Новосибирск, Россия (630091, Новосибирск, ул. Мичурина 12а, оф. 401), biooil2002@biosib.ru

Из природных субстратов районов нефтедобычи севера Западной Сибири выделены микроорганизмы-деструкторы нефти, способные утилизировать твердые n-алканы с длиной цепи C17 – C39 при низких температурах. Полученные микроорганизмы идентифицированы как *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. Степень деструкции нефти отдельными штаммами составила 77 – 83 %, ассоциацией штаммов – 89,8 % в течение 28 суток культивирования в лабораторных условиях. Для определения влияния температуры на скорость и степень деструкции твердых алканов штаммами микроорганизмов-деструкторов нефти проведены сравнительные эксперименты при разных температурах (+4 °C и +8 °C). При температуре +4 °C степень деструкции твердых алканов на 5-11 % ниже по сравнению со степенью деструкции при температуре +8 °C. Подобранный ассоциация бактериальных штаммов может быть рекомендована для разработки препарата, направленного для очистки загрязненных нефтью территорий в условиях севера, а также обработки цистерн и др. емкостей, длительное время используемых для хранения нефтепродуктов.

Ключевые слова: микроорганизмы-деструкторы, биодеструкторы, биоремедиация, нефть.

SELECTION OF THE MICROORGANISMS ASSOCIATION FOR BIO DESTRUCTION OF SOLID ALKANES FRACTION AT LOW POSITIVE TEMPERATURES

Alekseev A.Y.^{1,2}, Smorodina E.A.², Adamenko L.S.², Emelyanova E.K.^{2,3}, Zabelin V.A.⁴,
Ilyicheva T.N.^{1,2}, Reznikov V.A.¹, Shestopalov A.M.^{1,2}

¹Novosibirsk State University, Novosibirsk

Novosibirsk, Russia (630090, Novosibirsk, Pirogova st., 2), al-alexok@ngs.ru

²State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

Novosibirsk region, Koltsovo, Russia (630559, Koltsovo), shestopalov2@ngs.ru

³Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk

Novosibirsk, Russia (630091, Novosibirsk, Krasniy prospekt, 52), emelen1@yandex.ru

⁴Join Stock Company Biooil, Novosibirsk

Novosibirsk, Russia (630091, Novosibirsk, Michurina st. 12a, of. 401), biooil2002@biosib.ru

Oil – destructing microorganisms were isolated from the natural substrates originating from oil producing regions on the north part of western Siberia. The resulting bacteria were identified as *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. N-alkanes with a chain length of C17 - C39 can be utilized (degraded) by this microorganisms at low temperatures. The degree of degradation of individual bacterial strain was 77 - 83%, the association of strains - 89.8% within 28 days of cultivation in the laboratory. For evaluating temperature-dependence of solid alkanes bio destruction speed and degree by microorganisms a series of experiments at different temperatures (+4 °C - +8 °C) were settled. the results of these experiments showed that bio destruction of solid alkanes is 5-11% more effective at +8 °C then at +4 °C. So selected bacteria association can be recommended for usage as oil destructing agent in a conditions of northern lands, handling barrels and other vessels used for long termed oil storage.

Keywords: microorganisms-destructors, biodestructors, bioremediation, oil.

Острой экологической проблемой территорий России (особенно северных) являются разливы нефти. Главные потенциальные источники загрязнения природной среды нефтью и нефтепродуктами – это нефтепромыслы, нефтепроводы, нефтеперерабатывающие предприятия, нефтехранилища, наземный и водный транспорт, перевозящий нефтепродукты. На нефтепромыслах, кроме эксплуатационных и разведочных скважин, имеются и другие источники загрязнения: трубопроводы, сборные пункты, хранилища, пункты подготовки нефти. В зависимости от положения нефтепромысла в ландшафтно-геохимической системе потоки нефти и нефтяных вод могут захватывать и смежные территории. Нефтепродукты обнаруживаются даже в областях, свободных от хозяйственной деятельности человека (заповедниках, труднодоступных территориях), т. к. транспортируются воздушными и водными потоками [3].

Проблема загрязнения окружающей среды нефтью особенно актуальна для Сибири (в частности, Ямало-Ненецкого и Ханты-Мансийского автономных округов), где располагается основной нефтегазоносный район России.

Значительная часть Пуровского и Надымского районов Ямало-Ненецкого автономного округа (ЯНАО) занята природными ландшафтами различной степени нарушенности вследствие обустройства месторождений и размещения вспомогательных объектов, городской инфраструктуры, вахтовых поселений.

В природно-климатических условиях ЯНАО в результате нефтяных разливов изменяются тепловые и физические свойства почвы, нарушается почвенный режим промерзания – оттаивания, чрезвычайно медленно протекает самовосстановление экосистем, что провоцирует ускорение эрозийных процессов. Отмечается большая неоднородность распределения нефтяных компонентов в почвах разных участков нефтепромыслов, что зависит от физических и химических свойств конкретных почв, качества и состава поступившей нефти. В результате этого условия самоочищения окружающей среды от токсичных органических веществ техногенного происхождения в ландшафтных зонах и областях различны [4]. Опасность остаточного накопления нефтепродуктов возрастает с юга на север.

Самоочищение почво-грунтов и водоемов от нефтезагрязнений с помощью эндогенной углеводородокисляющей микробиоты происходит с небольшой скоростью и лимитируется неблагоприятными факторами (низкими среднегодовыми температурами, недостатком аэрации, отсутствием необходимого количества биогенных элементов и др.). Кроме того, характерной чертой северных экосистем является небольшая мощность гумусового горизонта, низкая биологическая активность почв, относительная обедненность видового состава растений, микроорганизмов и почвенных животных. Поэтому процессы биодеструкции нефтепродуктов и других загрязнителей заторможены и носят кратковременный характер [1, 4].

В местах проложенных трубопроводов разливы нефти повторяются регулярно. Временной мерой к устранению видимого нефтяного загрязнения является засыпка песком или торфом, являющаяся впоследствии не эффективной, поскольку нефть, поднимаемая грунтовой или дождевой водой, все равно всплывает на поверхность. При засыпке загрязнения торфом происходит захоронение и консервация тяжелых фракций нефти в нижележащих обводненных слоях торфа, где наблюдаются низкие температуры и нехватка свободного кислорода. При этом деструкции нефти аборигенной микробиотой почти не происходит, и отсутствуют физико-химические факторы разложения (солнечное излучение, ферменты микроорганизмов, растений и окислительные химические соединения) [2].

На данный момент известно множество видов микроорганизмов-нефтедеструкторов, которые входят в состав биопрепаратов, широко применяющихся для ликвидации аварийных разливов нефти и нефтепродуктов. Не вызывает сомнения, что с помощью микробиоты происходит полное разложение всех фракций нефти, в том числе и парафинов (твердых алканов). В связи с этим, существует реальная необходимость и возможность успешного проведения поисковой работы по выделению, изучению способностей и потенциала деструкции парафинов природными микроорганизмами – деструкторами нефти и нефтепродуктов.

Целью работы являлось исследование деструкции предельных углеводородов микроорганизмами, выделенными из северных районов нефтедобычи, при пониженных положительных температурах.

Материал и методы исследования

В районах нефтедобычи ЯНАО были взяты образцы воды, почвы, техногенного грунта и отсыпки для изучения микробного разнообразия из следующих экосистем: сосняк зеленомошный, верховое болото (мохово-кустарничковое), верховое болото (осоково-пушицевое), сосново-березовый смешанный лес, песчаная отсыпка. Образцы с загрязненных нефтью территорий включали в себя торф, воду болот, донные отложения, грунтовую воду, песок, почву верхних, средних и граничащих с мерзлотой горизонтов.

Для выделения штаммов-нефтедеструкторов образцы природных субстратов инкубировали в жидкой селективной питательной среде 8E (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 - 1.5$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.7$; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0.8$; $\text{NaCl} - 0.5$; pH 7.2 с добавлением нефти по весу (до 2 %) на качалке при температуре +8-10 °С; затем полученные накопительные культуры переносили на агаризованную среду для получения чистых культур углеводородокисляющих микроорганизмов.

Морфологические признаки полученных изолятов-деструкторов изучали с помощью световой микроскопии живых и окрашенных клеток с использованием микроскопа Carl Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия).

Оценку способности микроорганизмов к деструкции нефти осуществляли в жидкой питательной среде с добавлением нефти месторождений Западной Сибири в качестве единственного источника углерода. Биоэмульгирующие и биodeградирующие способности микроорганизмов оценивали визуально и с помощью газовой хроматографии. Первичная биodeградация нефти в пробирках оценивалась по следующим параметрам: разбиванию поверхностной пленки нефти, помутнению питательной среды за счет роста биомассы, образованию однородной эмульсии нефти в среде, газообразованию.

Выбор эффективных штаммов-деструкторов осуществляли по результатам хроматографических исследований и способности к росту и утилизации нефти при температуре 4-8° С.

Чистые культуры микроорганизмов-деструкторов исследовали на наличие ферментативных свойств: протеолитической, амилитической, желатиназной, каталазной, цитратной, оксидазной активности, способности к сбраживанию углеводов. Идентификацию штаммов бактерий осуществляли по определителю Берджи [6].

Косвенные признаки патогенности выявляли после постановки теста на наличие гемолизиса на кровяном агаре, фибринолитических и плазмокоагулирующих свойств с цитратной кроличьей плазмой.

Эксперименты с деструкцией нефти в почве производились в пластиковых контейнерах при температурах 8 °С и 4 °С в течение 28 сут. Содержание нефти в почве составляло 10 % по весу. При этом на 1 г почвы вносилось 10^6 КОЕ чистой культуры.

Количественное определение содержания предельных углеводородов в образцах проводили методом капиллярной газовой хроматографии на приборе Varian 3600, оснащенный колонкой J&W Scientific DB-5, 30 м. x 0.22 мм, инжектором с делением потока (темп. 320 °С), пламенно-ионизационным детектором (темп. 335 °С), системой регистрации и обработки хроматографических данных (ChromStar, Bruker). В ходе анализа программировали изменение температуры колонки: 50 °С – 2 мин, 50 °С – 320 °С – 15 °С /мин, 320 °С – 5 мин. Отнесение хроматографических пиков выполняли по времени удерживания с использованием калибровочного образца Boiling Point Calibration Sample #1, «ULTRA Scientific, Inc.», США.

Результаты исследования и их обсуждение

активность														
------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Выделенные тринадцать наиболее эффективных штаммов-деструкторов были внесены в емкости с загрязненной высокопарафинистой нефтью почвой с целью выяснения степени ее деструкции, а также разложения н-алканов. В результате было показано, что все штаммы деградируют за 4 недели до 69,4-89,9 % нефти. Количество предельных углеводородов твердой фракции (С17-С39) при этом снижалось на 60,7-84,9 % (табл. 2). Лучшие результаты по деструкции твердых алканов были показаны у штаммов 2, 4, 6, 12, 13, которые были объединены в микробную ассоциацию ДТА-1.

Таблица 2. Остаточное количество предельных углеводородов в образцах почвы после культивирования со штаммами микроорганизмов

Наименование образца	Остаточное количество нефтепродуктов		Остаточное количество предельных углеводородов С17-С39	
	Сумма, мг/10 г	Сумма, %	Сумма, мг/10 г	Сумма, %
контроль	880,45	100	442,74	100
1	269,76	30,64	174,13	39,33
2	120,37	10,25	71,74	16,20
3	224,54	25,50	163,13	36,85
4	102,6	11,65	84,63	19,11
5	205,67	23,36	138,79	31,35
6	91,41	10,38	74,89	16,92
7	148,22	16,83	125,22	28,28
8	170,19	19,33	122,78	27,73
9	185,23	21,04	167,43	37,82
10	131,7	14,96	123,9	27,98
11	226,77	25,76	216,44	48,89
12	108,7	10,12	66,69	15,06
13	112,75	12,81	101,72	22,98
Ассоциация ДТА-1	-	-	45,18	10,20

Полученная ассоциация из 5 штаммов ДТА-1 была изучена на способность к деструкции нефтяной фракции твердых алканов при низких положительных температурах. Степень деструкции твердых алканов С17-С39 ассоциацией ДТА-1 составила 89,8 %.

Для определения влияния температуры на скорость и степень деструкции твердых алканов штаммами микроорганизмов-деструкторов нефти проведены сравнительные эксперименты при разных температурах (+4 °С и +8 °С). В целом, нужно отметить, что температура культивирования влияет только на скорость деструкции. При температуре +4 °С степень деструкции твердых алканов на 5-11 % ниже по сравнению со степенью деструкции при температуре +8 °С.

Заключение

Проведенные эксперименты показали наличие высокоэффективной нефтеразлагающей аборигенной микробиоты в местах разливов нефти в ЯНАО. Выделенные микроорганизмы способны к деструкции многих компонентов нефти, в т.ч. твердых алканов. Наиболее эффективные биодеструкторы были объединены в ассоциацию бактериальных штаммов ДТА-1, которая может быть рекомендована для разработки препарата, направленного для очистки загрязненных нефтью территорий в условиях севера, а также обработки цистерн и др. емкостей, длительное время используемых для хранения нефтепродуктов.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 16.512.11.2160).

Список литературы

1. Алексеев А.Ю., Забелин В.А., Куц С.А., Пушкарев Н.С. Практика биологической рекультивации // Нефтяное хозяйство. - 2006. - №12. - С. 98-99.
2. Алексеев А.Ю. Не навреди // Промышленность и экология Севера. - 2011. №5-6 (13-14). - С. 40-47.
3. Андерсон Р.К., Мукатанов А.Х., Бойко Т.Ф. Экологические последствия загрязнения почв нефтью // Экология. - 1980. - №6. - С. 21-26.
4. Восстановление земель на Крайнем Севере. Ред. Арчегова И.Б. Коми научный центр УрО РАН, Сыктывкар, 2000. - 152 с.
5. Мокеева А.В., Алексеев А.Ю., Емельянова Е.К., Забелин В.А., Заушинцева А.В., Тараканова А.С., Шестопалов А.М., Ильичева Т.Н. Ассоциация штаммов бактерий-нефтедеструкторов для ремедиации нефтезагрязненных территорий // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. - 2011. - Т. 9, № 3. - С. 27-34.
6. Определитель бактерий Берджи: В 2 т. М.: Мир, 1997.
7. Balba M. T., Al-Awadhi N., Al-Daher R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation // Journal of Microbiological Methods. - 1998. - V. 32. - No. 2. - P. 155-164.
8. Joo H.-S., Ndegwa P. M., Shoda M., Phae Ch.-G., Bioremediation of oil-contaminated soil using *Candida catenulata* and food waste. // Environmental Pollution. - 2008. - V. 156. - No. 3. - P. 891-896.
9. Ghazali F.M., Rahman R.N., Salleh A.B., Basri M., International Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. // Biodeterioration & Biodegradation. - 2004 - V. 54. - No. 1. - P. 61-67
10. Rahman K. S. M., Thahira-Rahman J., Lakshmanaperumalsamy P., Banat I. M., Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. // Bioresource Technology. - 2002. - V. 85. - No. 3. - P. 257-261.

Рецензенты:

Беднаржевский С.С., д.т.н., профессор, заведующий кафедрой «Безопасность жизнедеятельности» Сургутского государственного университета, г. Сургут.

Загребельный С.Н., д.б.н., профессор кафедры химии окружающей среды Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск.