

Е. В. Перушкина, З. О. Садыкова, А. С. Сироткин

ХАРАКТЕРИСТИКА АБОРИГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ ВЫСОКОСЕРНИСТОЙ НЕФТИ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН

Ключевые слова: высокосернистая нефть, микроорганизмы, восстановленные соединения серы.

Исследован состав аборигенной микрофлоры высокосернистой нефти Омбйского месторождения Республики Татарстан. При аэробном культивировании на нефтесодержащей питательной среде обнаружены углеводородокисляющие бактерии родов Acinetobacter, Pseudomonas, Bacillus, Micrococcus. Выделены сероокисляющие бактерии нефти (около 10 % общего числа аэробных микроорганизмов). Аборигенные бактерии обладали низкой способностью окисления компонентов нефти: при периодическом культивировании более 20 суток концентрация сульфатов в культуральной жидкости была около 30 мг/л.

Keywords: sour crude oil, microorganisms, reduced sulfur compounds.

The composition of native microflora of sour crude oil of Ombiyskoe field of Republic of Tatarstan was investigated in the periodic aerobic cultivation process. The hydrocarbon-oxidizing bacteria Acinetobacter sp., Pseudomonas sp., Bacillus sp., Micrococcus sp. were detected. The oil sulfur-oxidizing bacteria were isolated (about 10% of the total number of aerobic microorganisms). These bacteria were characterized by low oil components oxidation rate: the sulfates concentration was about 30 mg/l after 20 days of periodic cultivation.

Введение

Высокосернистая и высоковязкая нефть является одной из главных составляющих минерально-сырьевой базы Республики Татарстан. Известно, что около 60% добычи нефти в РТ составляет высокосернистая нефть [1,2].

В зависимости от содержания серы в составе нефти принято выделять малосернистую (массовое содержание серы до 0,5%), сернистую (1-3%) и высокосернистую (более 3%) нефть [3]. При добыче и переработке высокосернистой нефти возникает комплекс существенных проблем [4]. Высокая вязкость нефти, высокая минерализация пластовых вод, механические примеси осложняют процесс добычи такой нефти. Присутствие сероводорода в её составе, в том числе в результате развития сульфатовосстанавливающих бактерий, приводит к коррозии металла трубопроводов [5].

Кроме того, сера и сульфокислоты входят в состав природных битумов, признанных ценным химическим сырьём, запасы которого на территории РТ весьма значительны [1]. Именно сверхтяжёлые нефти и нефтебитумы принято считать доступными энергоисточниками в условиях возрастающего дефицита нефти и газа.

Обращая внимание на разнообразие сернистых соединений нефти и распределение их по отдельным фракциям, следует отметить, что эти параметры зависят от природы нефти и характера сернистых соединений. Как правило, содержание серы возрастает от низших фракций нефти к высшим, большое количество серы обнаруживается в составе высококипящих фракций и остатке перегонки нефти [6]. Например, производные соединения тиофена составляют до 50-80% состава средних и высококипящих нефтяных фракций (керосин, дизельное топливо, масла). Необходимо отметить, что природные тиофены в составе нефти относятся к наиболее химически стабильным

неуглеводородным соединениям [5], трудно удаляемым при нефтепереработке.

При этом следует предположить, что высоковязкая нефть с высоким содержанием серы может быть источником микроорганизмов, способных к трансформации сернистых соединений. Микробиологические исследования пластовых вод месторождений нефти позволили идентифицировать гетеротрофные, сапрофитные, сульфатредуцирующие, нефтеокисляющие, денитрифицирующие, метанобразующие группы микроорганизмов [7].

Настоящая статья посвящена анализу состава микробного сообщества высокосернистой нефти в аэробных условиях культивирования. Цель исследования состояла в оценке степени активности аборигенной микрофлоры нефти в процессах биологического окисления восстановленных соединений серы. Особое внимание было уделено характеристике микроорганизмов нефти, способных активно трансформировать её серосодержащие компоненты.

Экспериментальная часть

Объектом исследований являлась высоковязкая высокосернистая нефть Омбйского месторождения РТ, предоставленная ОАО «Татекс» (г. Альметьевск РТ).

Изучение аборигенной микрофлоры нефти проводили при выделении накопительных и чистых микробных культур с использованием метода предельных разведений образца высокосернистой нефти в физиологическом растворе [8], а также с предварительной подготовкой нефти для микробиологического анализа. Для этого проводили культивирование аборигенной микрофлоры в составе образца нефти (1% об.) в физиологическом растворе в течение 24 ч при температуре 28°C с дополнительной аэрацией жидкости.

Микробную суспензию высевали на плотные питательные среды следующего состава (г/дм³ дистиллированной воды): селективные питательные среды (ПС) для выделения сероокисляющих бактерий **ПС1** ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 10; KH_2PO_4 – 4; K_2HPO_4 – 4; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8; NH_4Cl – 0,4) [9]; **ПС2** ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 5; NaHCO_3 – 1; NH_4Cl – 0,1; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 2; $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ следы) [9]; **ПС3** ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; $\text{CaCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,025; K_2HPO_4 – 0,06; KH_2PO_4 – 0,043; CH_3COONa – 0,25; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; ЭДТА следы; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ следы) [9]; питательная среда Чапека-Докса для выделения микроскопических грибов [10]; питательная среда **ПС4** (пептон – 10; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 10), рекомендуемая для культивирования бактерий р. *Pseudomonas* [11]; глюкозо-пептонная питательная среда для выделения дрожжей [10]; питательная среда для выделения актиномицетов [10]; мясо-пептонный агар (МПА) [8]. Для уплотнения жидких питательных сред использовали агар бактериологический в концентрации 15% масс.

Инкубирование образцов проводили при температуре 28°C в течение 14 суток, периодически визуально оценивали рост микроорганизмов на поверхности плотной питательной среды, проводили микроскопирование препаратов живых клеток и окрашенных по Граму клеток [8], тесты на определение отношения микроорганизмов к кислороду [10] и способности к спорообразованию [12].

Для определения степени активности аборигенной микрофлоры нефти в процессе биоокисления сернистых компонентов до сульфатов проводили периодические эксперименты в аэробных условиях культивирования микроорганизмов. Единственным источником серы и углерода в составе питательной среды являлась высокосернистая нефть (2% об.). Для проведения эксперимента была подобрана питательная среда следующего состава (г/дм³ дистиллированной воды): NH_4Cl – 0,1; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 2; $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; NaHCO_3 – 1, в которую дополнительно вносили следы $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, далее обозначаемая **ПС5**. В процессе 23-суточного культивирования регистрировали значения pH и концентрации сульфатов, белка микробной биомассы в культуральной жидкости [13], проводили высеив образцов на питательные среды и подсчет количества клеток методом Коха с предварительной подготовкой образца нефти [8].

Результаты и их обсуждение

Известно, что многие микроорганизмы обладают способностью использовать нефть в качестве субстрата; их часто объединяют термином «углеводородокисляющие микроорганизмы». Прежде всего, это бактериальные формы рр. *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Cytophaga*, *Clostridium*,

Corynebacterium, *Flavobacterium*, *Methanobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Vibrio*, микроскопические грибы рр. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma* и дрожжи рр. *Candida*, *Endomycopsis*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* [8].

В настоящей работе при микробиологическом анализе высоковязкой высокосернистой нефти установлено преобладание аэробных хемоорганогетеротрофных микроорганизмов (более 80% от общего числа КОЕ) (таблица 1). Среди них отмечено присутствие микромицетов (около 1,5%), которые по культуральным и морфологическим признакам можно идентифицировать как представители р. *Aspergillus*, а также дрожжей (около 1,5%). Развитие указанных микроорганизмов может приводить к биодеструкции углеводородов нефти [8,14,15].

Таблица 1 – Количественный состав микрофлоры высокосернистой нефти Омбийского месторождения РТ (КОЕ – колониеобразующая единица)

Питательная среда для выделения микроорганизмов нефти	Число КОЕ $\times 10^4 / \text{см}^3$
ПС1 [8]	19±4
ПС2 [8]	41±3
ПС3 [8]	23±2
Среда Чапека-Докса [9]	2±0,3
ПС4 [10]	255±6
Глюкозо-пептонная среда [9]	2±0,1
Среда для актиномицетов [9]	13±2
Мясо-пептонный агар [7]	111±3

В составе аборигенной микрофлоры высокосернистой нефти, развивающейся в условиях присутствия кислорода воздуха, преобладали бактерии семейства *Pseudomonadaceae* (около 55% от общего числа КОЕ). Следует отметить, что это семейство объединяет Грам-отрицательные прямые или слабо изогнутые палочки с полярно расположенными жгутиками, не образующие спор и растущие в аэробных условиях. Большинство псевдомонад являются хемоорганотрофными организмами, обладающие способностью усваивать гетероциклические и ароматические соединения [16].

При описании бактериального разнообразия высокосернистой нефти необходимо отметить присутствие аэробных спорообразующих палочковидных бактерий, которые можно отнести к роду *Bacillus*. На питательной среде МПА отмечен рост бактерий р. *Micrococcus* (24% от общего числа КОЕ), образующих круглые колонии розового и желтого цвета. Известно, что представители родов *Pseudomonas*, *Bacillus* и *Micrococcus* являются активными нефтедеструкторами, на их основе созданы микробные препараты для восстановления нефтезагрязненных почв [14].

В течение 14-суточного поверхностного культивирования микробных образцов отмечено развитие бактерий на селективных питательных средах **ПС1**, **ПС2** и **ПС3**. Это свидетельствует о

наличии сероокисляющих микроорганизмов в составе аборигенной микрофлоры нефти (18% от общего числа КОЕ). Выделенные микроорганизмы являются медленно растущими и длительно адаптируются к новым условиям среды и источникам питания [9,10].

Палочковидные бактерии, которые предположительно можно отнести к группе «тионовых сероокисляющих бактерий», обнаружены на питательной среде **ПС2**. Это грамотрицательные палочковидные бактерии, одиночные клетки которых способны к движению. Бактерии способны развиваться в условиях доступа кислорода воздуха, согласно проведенным тестам представлены аэробами. На поверхности плотной питательной среды **ПС2** образуют колонии белого цвета круглой формы с плоским профилем диаметром от 1,5 мм до 2,5 мм.

При микроскопическом анализе выделенных бактерий высокосернистой нефти установлено присутствие Грам-отрицательных шаровидных клеток (18% от общего числа КОЕ). Указанные микроорганизмы развивались на питательных средах для выделения актиномицетов, **ПС3** и **ПС4**, содержащих в своем составе органические источники углерода (ацетат натрия, пептон, дрожжевой экстракт, крахмал). В результате микробиологических исследований показано, что выделенные бактерии - Грам-отрицательные кокки, образующие скопления из двух клеток или цепочки различной длины. Клетки неподвижны, не образуют спор. На плотной питательной среде развиваются в виде колоний кремового или белого цвета диаметром 1-2 мм. По морфологическим и культуральным признакам указанные бактерии предположительно можно отнести к роду *Acinetobacter*.

Согласно литературным данным [17] бактерии р. *Acinetobacter* в стационарной фазе роста отличаются формой кокков, в логарифмической фазе представлены короткими Грам-отрицательными палочками размером $0,9-1,6 \times 1,5-2,5$ мкм. Ультраструктуры клеточной стенки являются типичными для Грам-отрицательных бактерий. Клетки обычно расположены в паре, а также в цепях разной длины, не обладают способностью к спорообразованию, жгутики отсутствуют. Колонии обычно непигментированы, но некоторые штаммы образуют колонии от белого до кремового цвета, размером 1-2 мм в диаметре. Бактерии р. *Acinetobacter* составляют до 0,001% от общей численности гетеротрофных аэробных почвенных и водных микроорганизмов [17]. Известно, что Грам-отрицательные кокки – алканотрофы, выделенные из техногенной почвы, способны к эффективной деструкции нефтяных углеводородов [18]. Возможно использование бактерий р. *Acinetobacter* в составе микробного препарата для очистки морской воды от нефтяного загрязнения [19].

Исходя из вышеизложенного анализа микробного состава высокосернистой нефти, следует вывод о разнообразии аэробной нефтяной

микрофлоры. Преобладающими формами являются углеводородокисляющие бактерии, среди которых установлено присутствие представителей родов *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*. Палочковидные бактерии, способные к окислению соединений серы, выделены на питательной среде **ПС2** и составляют около 9% от общего числа КОЕ исследуемого образца нефти. Именно эта группа микроорганизмов, относимая авторами к «тионовым» сероокисляющим бактериям, способна принимать участие в процессах биологического окисления серосодержащих компонентов нефти. Также следует отметить, что бактерии р. *Pseudomonas*, обнаруженные в составе аборигенной микрофлоры исследованных образцов нефти, являются неспецифичными сероокисляющими микроорганизмами (рисунок 1). У бактерий данной группы удаление серы из молекул углеводородов является побочным процессом в разрушении углеводородов и происходит вместе с ним [20].

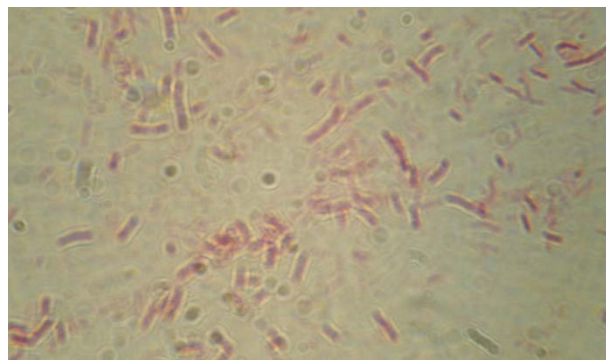


Рис. 1 – Микрофотография препарата фиксированных клеток микроорганизмов, окрашенных по Граму, выделенных на питательной среде **ПС4 (×1500)**

Для оценки способности аборигенной микрофлоры высокосернистой нефти утилизировать серосодержащие соединения проводили её культивирование в составе образца нефти в минеральной питательной среде **ПС5**, состав которой был оптимален для развития аборигенной сероокисляющей микрофлоры нефти (состав **ПС5** идентичен с **ПС2**, отличаясь от последней отсутствием источника восстановленной серы - тиосульфата натрия).

Известно, что развитие сероокисляющих микроорганизмов связано с окислением восстановленных соединений серы до конечного продукта – сульфатов или до частично окисленных форм, например политионатов, что сопровождается изменением pH среды [9,21]. В настоящем эксперименте при развитии аборигенных микроорганизмов на **ПС5** в присутствии 2% (об.) высокосернистой нефти отмечено снижение pH среды с 9,7 до 8,5. Понижение pH питательной среды связано с образованием сульфатов в процессе окисления серосодержащих компонентов нефти (рисунок 2). На 23 сутки эксперимента концентрация сульфатов в культуральной жидкости

составила более 33 мг/дм³, что свидетельствует о развитии сероокисляющих бактерий аборигенной микрофлоры.

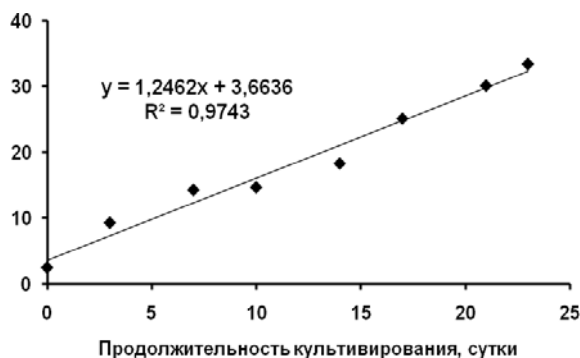


Рис. 2 - Изменение концентрации сульфатов в культуральной жидкости при развитии аборигенной микрофлоры нефти, мг/дм³

Анализ роста и развития микроорганизмов нефти в минеральной питательной среде показал накопление максимального количества биомассы в культуральной жидкости на 7 сутки эксперимента (таблица 2). Сероокисляющие микроорганизмы находятся в логарифмической фазе роста, которая характеризуется интенсивным окислением субстрата для обеспечения роста и деления клеток и выделением продуктов метаболизма (сульфатов).

Таблица 2 – Показатели роста в процессе периодического культивирования аборигенной микрофлоры высоковязкой нефти

	Продолжительность культивирования, сутки		
	0	7	13
Концентрация белка микробной биомассы, мг/дм ³	8,81±0,03	26,38±0,2	10,93±0,01
Число КОЕ×10 ⁵ /см ³	0,006±0,001	5,73±0,5	1,77±0,1

Процесс окисления серосодержащих соединений нефти происходит при непосредственном контакте клеток микроорганизмов с ней. Поэтому снижение количества биомассы в культуральной жидкости, отмеченное на 10-23 сутки культивирования, можно объяснить образованием скоплений микробных клеток на границе раздела нефти и питательной среды [22], что увеличивает интенсивность процесса окисления [23].

Микробиологические исследования образцов культуральной жидкости после 23-суточного периодического культивирования микрофлоры нефти проводили на 8 различных питательных средах, использованных ранее. После 7-суточного инкубирования посевов на питательных средах для выделения актиномицетов и Чапека-Докса установлено развитие микроскопических

грибов предположительно рода *Aspergillus*. К доминирующим микроорганизмам в составе микрофлоры, развивающейся в аэробных условиях в присутствии 2% (об) высокосернистой нефти, можно отнести бактерии pp. *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, а также сероокисляющие палочковидные бактерии, развивающиеся на *ПС2*. Число КОЕ указанных бактерий превышает 10⁸ клеток/см³ культуральной жидкости, что позволяет сделать вывод об участии выделенных микроорганизмов в процессе окисления серосодержащих компонентов нефти в аэробных условиях культивирования.

Таким образом, развитие углеводородокисляющих микроорганизмов р. *Aspergillus*, р. *Acinetobacter*, р. *Pseudomonas*, р. *Micrococcus* и сероокисляющих бактерий в составе нефти приводит к протеканию процессов деструкции углеводородов и окисления её серосодержащих компонентов. Рост и развитие аборигенной микрофлоры нефти в жидкой питательной среде *ПС5* свидетельствует о том, что условия эксперимента (температура 26-30°C, pH 8 - 9,5, дополнительная аэрация среды) являются благоприятными для развития выделенных микробных культур.

По результатам исследования можно сделать вывод о том, что аборигенная микрофлора высокосернистой нефти Омбийского месторождения РТ представлена более чем на 80% микроорганизмами-нефтедеструкторами, среди которых преобладают бактерии р. *Pseudomonas*; также обнаружено незначительное количество дрожжей и микромицетов. Только около 10% общего числа аэробных микроорганизмов составляют сероокисляющие бактерии. Аборигенные бактерии нефти обладают низкой сероокисляющей способностью по превращению серосодержащих компонентов нефти в конечный продукт – сульфаты: при длительном периодическом культивировании (более 20 суток) концентрация сульфатов в культуральной жидкости не достигает 50 мг/дм³.

Литература

1. Т.М. Акчурин, С.А. Горбунов, А.В.Дроздов. *Минеральные ресурсы Республики Татарстан*. ДАС, Казань, 2000. 32 с.
2. И.Н. Дияров, Н.Ю. Башкирцева. *Вестник Казанского технологического университета*, 4, 141-157 (2010).
3. И.Ю. Батуева, А.А. Гайле, Ю.В. Поконова. *Химия нефти*. Химия, Ленинград, 1984. 360 с.
4. М.З. Зарифьянова, С.Д. Вафина, В.А. Петров, Р.Р. Валиева, Х.Э. Харлампиди. *Вестник Казанского технологического университета*, 9, 224-225 (2011).
5. А.А. Масланов, *Современные наукоемкие технологии*, 11, 59-60 (2005).
6. И.Л. Гуревич. *Технология нефти. Общие свойства и первичная перегонка нефтей*. Гостехиздат, Москва, 1952. 271 с.
7. С.И. Кузнецов, М.В. Иванов, Н.Н. Ляликова. *Введение в геологическую микрофлору*. Издательство АН СССР, Москва, 1962. 238 с.

8. А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук. *Практикум по микробиологии*. Академия, Москва, 2005. 608 с.
9. Е.В. Перушкина. Дисс. канд. техн. наук, Казанский гос. технологический университет, Казань, 2008, 120 с.
10. Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. *Практикум по микробиологии*. Дрофа, Москва, 2004. 256 с.
11. С.И. Кузнецов, В.И. Романенко. *Микробиологическое изучение внутренних водоемов: лабораторное руководство*. Мир, Москва, 1963. 205 с.
12. Т.В. Тимошина, Т.О. Ринтцек. *Микробиологическое изучение грунтов*. НИИ «Сельского хозяйства Нива», Казань, 2004. 38 с.
13. Р. Досон, *Справочник биохимика*. Мир, Москва, 1991. 544с.
14. G.V. Cherkasova, M.I. Mavlyanova, G.R. Narmetova, S.I. Borminskiy, *V Moscow International Congress Biotechnology: State of the art and prospects of development* (Moscow, Russia, March 16-20, 2009). Abstracts. Moscow, 2009. Volume 2. P. 202-203.
15. Р.Х. Хузиахметов, А.Ф. Халилова, А.П. Денисова, Д.Р. Мухаметшина, И.П. Бреус. *Вестник Казанского технологического университета*, **19**, 130-132 (2012).
16. Г. Шлегель *Общая микробиология*. Мир, Москва, 1987. 567 с.
17. *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*. Springer, New York, NY 10013, USA, 2006, 746 - 758.
18. М. Кхариф. Автореф. дисс. канд. биол. наук, Санкт-Петербургский гос. технол. ин-т, Санкт-Петербург, 2000. 20 с.
19. Пат. РФ 2412912 (2008)
20. Пат. РФ 2376478 (1999)
21. А.В. Якушева, Е.В. Перушкина, А.В. Львова, Р.Р. Спиридонова, С.С. Галибеев, А.М. Кочнев, *Химическая промышленность сегодня*, **10**, 39-48 (2009).
22. *Промышленная микробиология* под ред. Н. С. Егорова. Высшая школа, Москва, 1989. 688 с.
23. Е.В. Перушкина, Г.И. Шагинурова, А.С. Сироткин, Ю.В. Васюнина, А.З. Миндубаев, С.Т. Минзанова, *Химическая промышленность сегодня*, **7**, 42-49 (2008).

© **Е. В. Перушкина** – канд. техн. наук, доц. каф. промышленной биотехнологии КНИТУ, elena.peroushkina@gmail.com;
З. О. Садыкова – соиск той же кафедры; **А. С. Сироткин** – д-р техн. наук, проф., зав. каф. промышленной биотехнологии КНИТУ, asirotkin@mail333.com.