

УДК 578.68:579.873.2

В.С. Подгорский, Т.М. Ногина, Т.У. Думанская, А.Н. Остапчук

**ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА ПАРАФИНОНАФТЕНОВОЙ  
ФРАКЦИИ УГЛЕВОДОРОДОВ  
ПРИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКЕ ВОДЫ ОТ НЕФТИ**

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного  
НАН Украины, г. Киев, Украина  
podgorsky@serv.imv.kiev.ua

*Исследованы изменения состава парафинафтеновых углеводородов (ПНУ) при очистке воды препаратом "Еколан-М" от сырой нефти. Основными компонентами ПНУ являются n-алканы  $C_9 - C_{30}$  и изо-алканы  $C_8 - C_{17}$ . Отсутствие в очищенной воде изо-алканов и наличие в ней незначительного количества n-алканов  $C_{22} - C_{26}$ , концентрация которых снизилась по сравнению с начальной в 150 – 234 раза, свидетельствуют о практически полной утилизации микроорганизмами препарата этих фракций углеводородов.*

**Ключевые слова:** актинобактерии, биологическая очистка, вода, загрязненная нефтью, парафинафтеновые углеводороды.

**Введение.** Загрязнение поверхностных вод различными органическими токсикантами, включая углеводороды нефти, является одним из показателей общего ухудшения состояния окружающей среды. Тенденция снижения качества воды наблюдается, в частности, в р. Днепр, в бассейн которой сбрасываются миллиарды кубометров сточных вод, что приводит к загрязнению реки экологически опасными веществами [1]. Значительную проблему представляют нефтяные загрязнения открытых водоемов. Так, показано [2], что разлив 1 дм<sup>3</sup> нефти может лишить кислорода около 40 тыс. дм<sup>3</sup> воды, препятствует его доступу в толщу водной среды и приводит к нарушению экологической системы водоема.

Для ликвидации нефтяных загрязнений природных и производственных объектов все более широкое применение получают

© В.С. Подгорский, Т.М. Ногина, Т.У. Думанская, А.Н. Остапчук, 2015

углеводородоокисляющие микроорганизмы (УОМ), как, например, представители родов *Rhodococcus*, *Gordonia* и *Dietzia*, благодаря своей метаболической универсальности и широкой распространенности в микробиоценозах чистых и нефтезагрязненных экосистем [3 – 4]. В последние годы для очистки воды используют биопрепараты, включающие иммобилизованные формы микроорганизмов, которые, в отличие от свободных клеток, не вымываются из загрязненной среды, проявляют более высокую деструктивную активность по отношению к углеводородам и устойчивость к неблагоприятным факторам среды [5, 6]. Использование в качестве носителей для микроорганизмов нефтепоглощающих сорбентов ускоряет удаление загрязнения с поверхности воды, позволяя кислороду растворяться в ее верхних слоях, что создает более благоприятные условия для деструкции углеводородов.

Цель данной работы – определение изменений в составе парафино-нафтеновой фракции углеводородов при очистке воды, загрязненной нефтью, препаратом "Эколан-М" и оценка его эффективности в этом процессе.

**Методика эксперимента.** Объектом исследований являлся препарат "Эколан-М", в состав которого входят иммобилизованные на измельченном древесном угле (фракция 1 – 5 мм) углеводородоокисляющие актинобактерии *Dietzia maris* IMB B-7278, *Gordonia rubripertincta* IMB Ac-5005, *Rhodococcus erythropolis* IMB B-7012 и *Rhodococcus erythropolis* IMB B-7277. Для получения препарата культуры выращивали отдельно на жидкой минеральной среде с 0,5% дизельного топлива в колбах на качалках (240 об/мин) при 28°C в течение 72 ч. Смесь культуральных жидкостей (КЖ) в соотношении 1:1:1 (с общим титром клеток  $5,8 \times 10^8$  кл/см<sup>3</sup>) наносили на сорбент из расчета 800 см<sup>3</sup> КЖ на 1 кг сорбента. Препарат высушивали на открытом воздухе при 20 – 25°C до влажности 7% при периодическом перемешивании.

Модельные эксперименты по очистке воды от нефти проводили в течение 28 сут во флаконах объемом 250 см<sup>3</sup>, содержащих 200 см<sup>3</sup> природной прудовой воды (рН 7,8, жесткость – 6,5 мг/дм<sup>3</sup>, O<sub>2</sub> – 8,5 мг/дм<sup>3</sup>, углеводороды < 0,01 мкг/дм<sup>3</sup>), в которую вносили сырую нефть (удельный вес – 0,88 г/см<sup>3</sup>) до конечной концентрации 4000 мг/дм<sup>3</sup> и 400 мг препарата. В качестве источника биогенных элементов использовали минеральное удобрение нитроаммофоску (N:P:K = 16:16:16) в таком количестве, чтобы на 1 г нефти приходилось 35 мг азота. опыты проводили в условиях аэрации с использованием микропроцессора AOYUE 852 ("SMD REWORK STATION"),

обеспечивающего подачу воздуха в количестве  $0,5 \text{ дм}^3/\text{дм}^3$  в 1 мин. Контролем служил вариант опыта без внесения препарата, в котором происходили процессы самоочищения загрязненной нефтью воды. Количество повторностей в каждом варианте эксперимента – 3.

Фракционный состав (количественное содержание парафинафтоновых, ароматических углеводов и смолисто-асфальтоновых веществ) исходной сырой нефти изучали методом колончатой жидкостной адсорбционной хроматографии [7] с использованием гранулированного силикагеля марки КСГК (завод "РИАП", г. Киев). Общее количество углеводов в воде определяли методом инфракрасной спектрофотометрии на анализаторе нефтепродуктов АН-1 с предварительной экстракцией углеводов четыреххлористым углеродом [8].

Изменения состава парафинафтоновой фракции нефти под действием ферментативной активности микроорганизмов исследовали с помощью метода хромато-масс-спектрометрии. Анализ гексановых экстрактов парафинафтоновых углеводов (ПНУ) проводили на газовом хроматографе 6890N с масс-селективным детектором 5973inert ("Agilent Technologies"). Капиллярная колонка HP-5 ms,  $30 \text{ м} \times 0,25 \text{ мм} \times 0,25 \text{ мкм}$  ("J&W Scientific"). Газ-носитель гелий, скорость потока через колонку составляла  $1 \text{ см}^3/\text{мин}$ . Температура испарителя –  $250^\circ\text{C}$ , режим инъекции split с коэффициентом 1:100, объем пробы –  $1 \text{ мм}^3$ . Углеводородные компоненты идентифицировали с использованием библиотеки масс-спектров NIST02, интегрированной в программный модуль анализа данных ChemStation, и дополнительно при сравнении со временем удерживания стандартной смеси насыщенных углеводов ( $\text{C}_9 - \text{C}_{24}$ ). При идентификации веществ путем сравнения экспериментальных и библиотечных масс-спектров учитывали только те из них, которые имели коэффициенты подобия  $\geq 0,85$ .

Количество УОМ определяли на жидкой минеральной среде Таусона [9], в которую вносили 0,1% *n*-гексадекана как единственный источник углерода и энергии. Контролем служила указанная среда без источника углерода. В качестве инокулята использовали серийные разведения (от  $10^{-1}$  до  $10^{-10}$ ) соответствующих проб воды. Расчет количества УОМ, содержащихся в  $1 \text{ см}^3$  проб, проводили через 21 сут инкубации при  $28 - 30^\circ\text{C}$  с использованием таблиц Мак-Креди, разработанных на основе методов вариационной статистики [10]. Токсичность контрольных и опытных образцов воды и иловых образований оценивали в острых и хронических экспериментах стандартными методами [11 – 13].

**Результаты и их обсуждение.** Изучение фракционного состава нефти показало, что основными ее компонентами являются ПНУ (62,9%), вдвое меньше она содержит ароматических соединений (30,2%) и незначительное количество смолисто-асфальтеновых веществ (3,9%). Показано, что хроматограмма гексановых экстрактов углеводородов, содержащихся в исходной нефти, представляет собой непрерывный гомологический ряд *n*-алканов с промежуточными пиками *изо*-алканов (рис. 1). В составе ПНУ обнаружены *n*-алканы с длиной углеродной цепи C<sub>9</sub> – C<sub>30</sub>, среди которых преобладают углеводороды C<sub>10</sub> – C<sub>21</sub>, при доминировании C<sub>11</sub> – C<sub>17</sub> (табл. 1). Установлено, что *изо*-алканы ПНУ включают в основном метилированные производные *n*-алканов *изо*-C<sub>8</sub>–*изо*-C<sub>17</sub> (табл. 2). У подножия пиков *изо*-алканов расположен неразделенный комплекс циклоалканов и нафтеноароматических углеводородов (рис. 1), среди которых обнаружены 1-этил-3,5-диметилбензол и 2-бутил-1,1,3-триметилциклогексан.

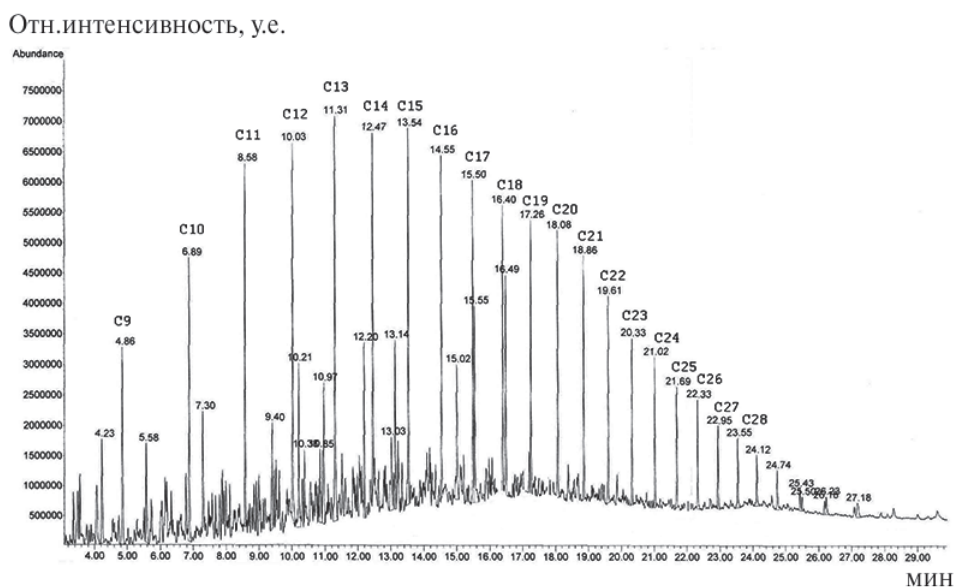


Рис. 1. Хроматограмма гексановых экстрактов парафинонафтеновой фракции нефти, содержащейся в загрязненной воде.

Анализ изменений, которые произошли в составе ПНУ в конце опыта, показал, что в условиях самоочищения (без препарата) они были представлены *n*-алканами C<sub>15</sub> – C<sub>30</sub> (см. табл. 1) и *изо*-алканами C<sub>15</sub> – C<sub>17</sub> (см. табл. 2). При этом количество *n*-алканов C<sub>16</sub> – C<sub>30</sub> уменьшилось по сравнению с исходным в 27 – 72, C<sub>15</sub> – в 175, а *изо*-C<sub>15</sub> – C<sub>17</sub> – в 29 – 61 раза.

Таблица 1. Изменения в составе *n*-алканов парафинонафтенной фракции углеводородов при очистке воды от нефти

Вещество	Исходная вода, загрязненная нефтью		Вода после самоочищения		Вода после очистки препаратом	
	$\tau$ , мин	Площадь пика ( $\times 10^6$ )	$\tau$ , мин	Площадь пика ( $\times 10^6$ )	$\tau$ , мин	Площадь пика ( $\times 10^6$ )
Нонан $C_9H_{20}$	4,86	961,6	—	—	—	—
Декан $C_{10}H_{22}$	6,89	1128,0	—	—	—	—
Ундекан $C_{11}H_{24}$	8,58	1403,2	—	—	—	—
Додекан $C_{12}H_{26}$	10,03	1459,2	—	—	—	—
Тридекан $C_{13}H_{28}$	11,31	1832,0	—	—	—	—
Тетрадекан $C_{14}H_{30}$	12,47	2051,2	—	—	—	—
Пентадекан $C_{15}H_{32}$	13,54	1545,6	13,52	8,8	—	—
Гексадекан $C_{16}H_{34}$	14,55	1208,0	14,53	13,5	—	—
Гептадекан $C_{17}H_{36}$	15,50	1208,0	15,48	16,6	—	—
Октадекан $C_{18}H_{38}$	16,40	1113,6	16,39	23,9	—	—
Нонадекан $C_{19}H_{40}$	17,26	966,4	17,25	16,3	—	—
Эйкозан $C_{20}H_{42}$	18,08	1013,2	18,07	29,8	—	—
Генэйкозан $C_{21}H_{44}$	18,86	856,0	18,85	15,0	—	—
Докозан $C_{22}H_{46}$	19,61	742,4	19,60	13,2	19,60	3,1
Трикозан $C_{23}H_{48}$	20,33	561,6	20,32	10,1	20,32	3,8
Тетракозан $C_{24}H_{50}$	21,02	576,0	21,01	8,2	21,01	3,9
Пентакозан $C_{25}H_{52}$	21,69	499,2	21,68	8,9	21,68	3,3
Гексакозан $C_{26}H_{54}$	22,33	441,6	22,32	7,9	22,32	2,7
Гептакозан $C_{27}H_{56}$	22,95	366,4	22,94	5,4	—	—
Октакозан $C_{28}H_{58}$	23,55	300,8	23,54	4,9	—	—
Нонакозан $C_{29}H_{60}$	24,12	244,9	24,12	6,8	—	—
Триакозан $C_{30}H_{62}$	24,74	164,8	24,73	5,4	—	—

Примечание.  $\tau$  – Время удерживания пика; "—" – вещество не обнаружено.

Следует отметить, что выявленный нами состав *n*-алканов, содержащихся в воде после ее самоочищения, близок к обнаруженному в морской воде Одесского региона в весенне-летний период, когда активно происходят биологические процессы самоочищения воды от нефтяных загрязнений [14].

Таблица 2. Изменения в составе изо- и циклоалканов парафинонафтенной фракции углеводородов при очистке воды от нефти

Вещество	Исходная вода, загрязненная нефтью		Вода после самоочищения		Вода после очистки препаратом	
	$\tau$ , мин	Площадь пика ( $\times 10^6$ )	$\tau$ , мин	Площадь пика ( $\times 10^6$ )	$\tau$ , мин	Площадь пика ( $\times 10^6$ )
3-Метил-октан	4,23	594,6	—	—	—	—
2,6-Метил-октан	5,58	494,6	—	—	—	—
4-Метил-декан	7,30	1059,2	—	—	—	—
1-Этил-3,5-диметил-бензол	9,40	627,2	—	—	—	—
2,6-Диметил-ундекан	10,21	756,8	—	—	—	—
2-Бутил-1,1,3-триметил-циклогексан	10,38	474,8	—	—	—	—
2-Метил-додекан	10,85	421,7	—	—	—	—
2,6-Диметил-октан	10,97	822,1	—	—	—	—
2,6,11-Триметил-додекан	12,20	590,4	—	—	—	—
7-Метил-пентадекан	13,14	918,4	—	—	—	—
2,6,10-Триметил-гептадекан	15,02	860,0	15,00	14,0	—	—
2,6,10,14-Тетраметил - пентадекан	15,55	930,0	15,54	19,5	—	—
2,6,10,14-Тетраметил - гексадекан	16,49	976,0	16,48	33,5	—	—

Использование препарата "Эколан-М" в условиях нашего эксперимента привело к практически полной очистке воды от ПНУ: в ней обнаружены только следовые количества *n*-алканов  $C_{22} - C_{26}$ , содержание которых по сравнению с исходной водой, загрязненной нефтью, снизилось в 150 – 234 раза, и отсутствовали *изо*-алканы (см. табл. 1, 2; рис. 2).

Следует отметить, что в составе углеводородов, содержащихся в воде после ее самоочищения и после очистки препаратом (см. рис. 2), выявлены соединения, которые не содержались в исходной нефти, в частности дибутилфталат (пик со временем удерживания – 17,84 мин). Его появление можно объяснить тем, что при окислении микроорганизмами углеводородов про-

исходят процессы их конденсации с образующимися в качестве промежуточных продуктов ароматическими и алифатическими радикалами.

Отн. интенсивность, у.е.

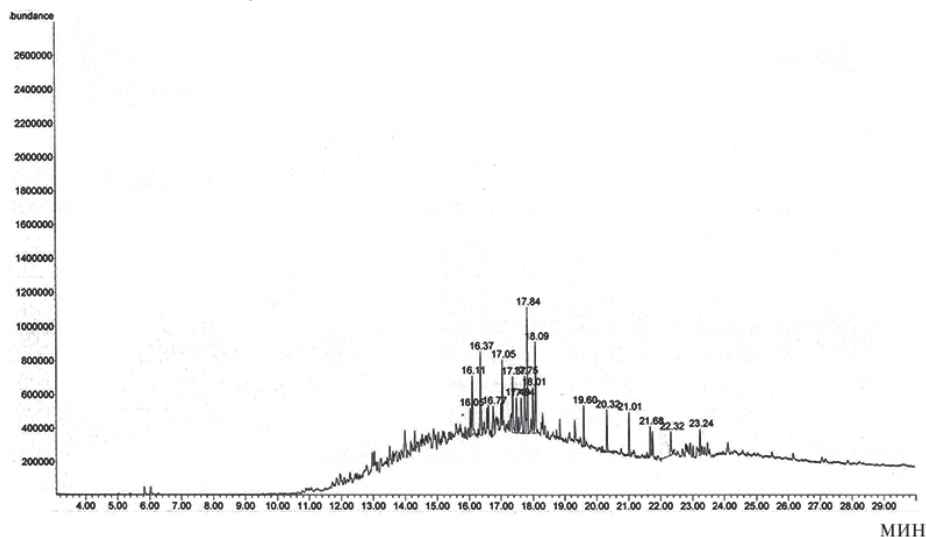


Рис. 2. Хроматограмма гексановых экстрактов парафинонафтенной фракции нефти, содержащейся в воде после ее очистки препаратом.

Показано, что очистка воды от нефти сопровождается увеличением количества УОМ, начальное содержание которых в чистой прудовой воде составляло  $7 \cdot 10^1$  кл/см<sup>3</sup>. При внесении препарата в загрязненную нефтью воду в начале эксперимента содержание УОМ в ней составляло  $4,7 \cdot 10^5$ , на 14-е сут оно повысилось до  $9,5 \cdot 10^6$ , а на 28-е сут снизилось до  $4,0 \cdot 10^6$  кл/см<sup>3</sup>. При этом в условиях самоочищения этот показатель был равен  $2,9 \cdot 10^4$  кл/см<sup>3</sup>. На основании полученных данных можно прогнозировать дальнейшее постепенное уменьшение количества указанных микроорганизмов по мере уменьшения количества остаточных углеводородов в очищаемой воде, исключая тем самым возможность побочного негативного явления интродукции — дополнительного микробного загрязнения окружающей среды.

Установлено, что уровень деструкции нефти препаратом в конце эксперимента достиг 80,5%, что в 1,7 раз превышало этот показатель в условиях самоочищения воды. При этом количество остаточных углеводородов в воде составляло 17,8 мг/дм<sup>3</sup>, что, согласно санитарным нормам [15], позволяет проводить ее безопасный сброс в комплекс сооружений систем водоотведения. Показано, что очищенная препаратом вода и придонный ил не проявляли острой и хронической токсичности по отноше-

нию к стандартным тест-организмам гидробионтов: *Lemna minor* L. (ряска малая), *Chironomus riparius* Meigen (личинки комара-звонца – беспозвоночные организмы донных отложений) и *Poecilia reticulata* Peters (аквариумные рыбки – гуппи). В отличие от этого, вода после самоочищения, где не использовали препарат, была токсичной для гидробионтов.

**Выводы.** Сравнительный анализ состава парафинафтеновых углеводородов в загрязненной нефтью воде до и после очистки препаратом "Эколан-М" показал, что из идентифицированных в загрязненной воде 35 компонентов ПНУ в очищенной воде содержится только незначительное количество *n*-алканов  $C_{22} - C_{26}$ . Высокая эффективность очистки препаратом загрязненной нефтью воды, количество углеводородов в которой снизилось с 4000 до 17,8 мг/дм<sup>3</sup>, позволяет проводить ее безопасный сброс в комплекс сооружений систем водоотведения.

**Резюме.** Досліджено зміни у складі парафіноафтенових вуглеводнів (ПНВ) в процесі очищення препаратом "Еколан-М" води від сирової нафти, основними компонентами ПНВ якої були *n*-алкани  $C_9 - C_{30}$  і *ізо*-алкани  $C_8 - C_{17}$ . Відсутність в очищеній воді *ізо*-алканів і наявність в них незначної кількості *n*-алканів  $C_{22} - C_{26}$ , вміст яких зменшився, порівняно з початковим, в 150 – 234 рази свідчить про практично повну утилізацію мікроорганізмами препарату цих фракції вуглеводнів.

*V.S. Podgorskiy, T.M. Nogina, T.U. Dumanskaya, A.N. Ostapchuk*

## THE CHANGE OF THE COMPOSITION OF THE PARAFFIN– NAPHTHENIC HYDROCARBON FRACTION IN THE PROCESS OF BIOLOGICAL PURIFICATION OF WATER FROM OIL

### Summary

The changes in the composition of paraffin–naphthenic hydrocarbons (PNH) in the process of cleaning by the preparation "Ekolan-M" of water contaminated with raw oil with main components being PNH *n*-alkanes  $C_9 - C_{30}$  and *ізо*-alkanes  $C_8 - C_{17}$  were investigated. The absence of *ізо*-alkanes purified water and the presence there of minor amount of *n*-alkanes  $C_{22} - C_{26}$  150 – 234 times decreased to their initial content indicated almost complete utilization of this hydrocarbon fractions by the preparation microorganism.



## Список использованной литературы

- [1] *Globa L.I., Gvozdiak P.I., Podorvan N.I., Kostiuk V.A.* // J. Water Sci. and Technol. – 2004. – **26**, №1. – P. 95 – 104.
- [2] *Гулиев И.С., Фейзуллаев А.А., Эфендиева М.А.* Все о нефти / Под ред. Ф.Р. Бабаева. – Баку: Nafta-Press, 2010. – 102 с.
- [3] *Van der Geize R., Dijkhuizen L.* // Current Opinion in Microbiol. – 2004. – **7**, N3. – P. 255 – 261.
- [4] *Hamamura N., Olson S.H., Ward D.M., Inskip W.P.* // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – **72**. – P. 6316 – 6324.
- [5] *Курукина М., Ivshina I., Krivoruchko A. et al.* // J. Biotechnol. – 2007. – **131**. – P. 99 – 100.
- [6] *Кобызева Н.В., Гатауллин А.Г., Силищев Н.Н., Логинов О.Н.* // Вест. ОГУ. – 2009. – №1. – С. 104 – 107.
- [7] *Соколова В.И., Колбин М.А.* Жидкостная хроматография нефтепродуктов. – М.: Химия, 1984. – 144 с.
- [8] *ОСТ 38.01378-85.* Охрана природы. Гидросфера, определение нефтепродуктов в сточных водах методом инфракрасной спектрофотометрии. – М.: Изд-во стандартов, 1985. – 8 с.
- [9] *Романенко В.И., Кузнецов С.И.* Экология микроорганизмов пресных водоемов. – Л.: Наука, 1974. – 194 с.
- [10] *Руководство к практическим занятиям по микробиологии* / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во МГУ, 1983. – 221 с.
- [11] *Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод* / ІГБ НАН України. – К.: ЛОГОС, 2006. – С. 332 – 340.
- [12] *КНД 211.1.4.057-97.* Методика визначення гострої летальної токсичності води на рибах / Мін-во охорони навколишнього природного середовища та яд. безпеки України. – К., 1997.
- [13] *Романенко В.Д., Гончарова М.Т., Коновец И.Н., Кипнис Л.С., Крот Ю.Г.* // Гидробиол. журн. – 2011. – **47**, № 6. – С. 32 – 42.
- [14] *Подплетная Н.Ф.* // Матеріали до 4-го Міжнар. симп. "Екол. пробл. Чорного моря" (Одеса, 31 жовтня – 1 листопада 2002 р.). – Одеса: ОЦЕГШ, 2002. – С. 161 – 165.
- [15] *Наказ Держбуду України від 19 лютого 2002 року N 37.* Правила приймання стічних вод підприємств у комунальні та відомчі системи каналізації населених пунктів України. – Режим доступу: <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=z0403-02>.

Поступила в редакцію 05.06.2014 г.