

Изобретение относится к микробиологии, экологии и может быть использовано практически в любой экосистеме для очистки воды и почвы от загрязнения нефтью или нефтепродуктами.

В зависимости от состава клеточной стенки, микроорганизмы можно условно разделить на две группы: липофильные и гидрофильные микроорганизмы.

При наличии двухфазной системы типа "вода - углерод" или "вода - нефть" первые (липофильные) концентрируются в углеводородной (нефтяной) фазе, вторые (гидрофильные) - в водной.

Липофильные микроорганизмы могут развиваться непосредственно в нефтяной пленке, что существенно ускоряет процесс очистки от нефтяного загрязнения. Однако, частично компоненты нефти растворяют в воде и это загрязнение ликвидируется липофильной микрофлорой уже существенно медленнее.

В отличие от липофильных, гидрофильные микроорганизмы способны к утилизации только растворенных в воде соединений.

Растворимость нефти в воде низка, поэтому при использовании гидрофильной бактериальной культуры, процесс очистки от нефтяного загрязнения идет лишь в зоне контакта углеводорода с водой. Скорость процесса в этом случае лимитируется скоростью диффузии компонента загрязнителя и площадью контакта. При толщине нефтяной пленки более 1мм время очистки недопустимо возрастает.

Известны биопрепараты "Эколан" (рекламная информация, разработчик НПО "Бурение", ВНИИКРНефть), "БИОПРИН" (ОлеВОРИН; ТУ 11279895-12-22-92), "ПУТИДОЙЛ" (Авт. св. СССР №1076446, 1982, Авт. св. СССР №1428809, 1988), используемые для очистки воды и почвы от нефтяных загрязнений.

Все биопрепараты созданы на основе монокультур бактерий того или иного типа. Соответственно, каждому из этих биопрепаратов в равной степени присущи определенные недостатки.

Во-первых, в их состав входят одни гидрофильные микроорганизмы утилизирующие только растворенные в воде соединения.

Во-вторых, биопрепараты работают в узком диапазоне pH и способны активно окислять углеводороды только в пресной воде.

В-третьих, окислению подвергаются углеводороды с длиной цепи до C₁₂, а более тяжелые нефтяные компоненты остаются неутилизованными.

В основу изобретения поставлена задача создание консорциума микроорганизмов "Devouroil", активно окисляющего нефтепродукты как в зоне контакта с водой, так и непосредственно в нефтяной пленке, способного утилизировать, широкий диапазон углеводородов нефти как в пресной, так и в засоленной экосистеме.

Поставленная задача решается так, что в состав консорциума микроорганизмов "Devouroil" входят как липофильные, так и гидрофильные микроорганизмы.

При использовании "Devouroil" устраняются все указанные недостатки применения при нефтяном загрязнении биопрепаратов на основе монокультур того или иного типа.

В состав консорциума "Devouroil" входят бактериальные и дрожжевые клетки. Бактерии представлены как липофильными (*Rhodococcus* sp., *Rhodococcus maris*, *Rhodococcus erythropolis*), так и гидрофильными (*Pseudomonas stutzeri*) культурами, дрожжевые клетки представлены в нем штаммом *Candida* sp.

Композиция выделена из пластовых вод нефтяного месторождения. Состав консорциума стабилен во времени, т.е. не наблюдается вытеснения (утраты), отдельных его составляющих, поскольку консорциум является устойчивым природным сообществом микроорганизмов, связанных метаболическими взаимоотношениями.

Соотношение различных микроорганизмов в препарате "Devouroil" определяется тем, в каких условиях он будет применяться.

Основная особенность препарата состоит в том, что микроорганизмы, входящие в его состав, могут развиваться в широком диапазоне солености (0,05 - 15%), поэтому с заменой компонентов препарата неизбежно следует снижение эффективности препарата, особенно при применении его в засоленных экосистемах.

Описание штаммов микроорганизмов и дрожжей, входящих в состав консорциума.

Штамм *Pseudomonas stutzeri* BKM-M-1972 D.

Выделен из пластовых вод Бондюжского нефтяного месторождения.

1. Морфологические признаки.

Грам-отрицательные, подвижные палочки. Размер клеток - 1,5 × 0,7 мкм.

2. Культуральные признаки.

Колонии на МПА светло-серые, круглые, диаметром от 3 до 15мм, почти плоские, в центральной части приподняты. Край волнистый, прозрачный. На картофельном агаре колонии светло-серые, круглые, выпуклые с ровным краем, центральная часть бежевого оттенка, бугристая, диаметр 1 - 3мм. Консистенция мягкая, легко снимаются с поверхности агара, легко размазываются. Флуоресцентный пигмент не образуют.

3. Физиологические признаки.

Катазоположительные, метаболизм дыхательного типа. DL-аргинин не используют.

Хорошо растут на формиате, ацетате, пропионате, бутирате и низкомолекулярных спиртах (исключая метанол), метанол усваивают плохо. Ассимилируют глюкозу, D-мальтозу, D-арабинозу и D-лактозу, но накопление биомассы слабое. Гидролизуют крахмал, галотолерантны, способны к росту на минеральной среде Раймонда (с 1% ацетата и 0,25% дрожжевого экстракта), содержащей до 15% NaCl. Используют n-алканы (C₁₀-C₃₀). Полибутират не накапливается.

Используют аммонийный и нитратный азот, нитрат денитрифицируют, азот не фиксируют.

4. Хранение штамма.

Штамм сохраняется в коллекции в лиофилизированном состоянии. Для сохранения штамма используют метод периодических пересевов (3 - 4 раза в год) на МПА или картофельном агаре с 1% NaCl. Инкубирование после посева ведут при температуре 28°C в течение 3 - 5 дней, затем культуру хранят в холодильнике при температуре 4°C.

Штамм *Rhodococcus* sp. BKM AC-1500 D.

Выделен, из пластовых вод Бондюжского нефтяного месторождения.

1. Морфологические признаки.

Грам-положительные, неподвижные палочки. В односуточной культуре на минеральной среде Раймонда (с 1% NaCl ацетата и 0,25% дрожжевого экстракта) короткие толстые палочки. При делении наблюдается характерное расположение клеток под углом друг к другу. Размер клеток - $2,3 \times 0,6$ мкм, с возрастом наблюдается укорачивание клеток.

2. Культуральные признаки.

Имеют IV тип клеточной стенки, содержат миколовые кислоты и фосфатидилэтаноламин.

Колонии на картофельном агаре ярко-оранжевые, круглые, диаметром 1 - 1,5 мм, выпуклые с ровным краем, блестящие. Консистенция мягкая, легко снимаются с агара, легко размазываются. Хорошо растут на агаризованной среде Раймонда с ацетатом и гексадеканом в качестве органического субстрата. Галотолерантны, способны к росту на минеральной среде Раймонда (с 1% ацетата и 0,25% дрожжевого экстракта), содержащей до 1,5% NaCl. При солёности свыше 5% наблюдается замедленное пигментирование колоний с развитием окраски от слабо- до ярко-оранжевой.

3. Физиологические признаки.

Каталазоположительные, не кислотоустойчивые, желатин не разжижают, казеин не разлагают, крахмал не гидролизуют. Хорошо ассимилируют n-алканы (C_{10} - C_{30}), ацетат, бутират, глюкозу, D-мальтозу. Слабое развитие на пропионате, формиате, этаноле, пропанол, бутаноле. Не ассимилируют D-арабинозу и D-лактозу. Хорошо растут на дрожжевом экстракте. Используют аммонийный и нитратный азот.

4. Хранение штамма.

Штамм сохраняется в коллекции в лиофилизированном состоянии. Для сохранения штамма используют метод периодических пересевов (3 - 4 раза в год) на картофельном агаре с 1% NaCl. Инкубирование после посева ведут при температуре 28°C в течение 7 - 10 дней, затем культуру хранят в холодильнике при температуре 4°C.

Штамм *Rhodococcus maris* BKM AC-1501 D.

Выделен из пластовых вод Бондюжского нефтяного месторождения.

1. Морфологические признаки.

Грам-положительные, неподвижные, очень короткие с закругленными концами палочки. В односуточной культуре на минеральной среде Раймонда (с 1% NaCl, 1% ацетата и 0,25% дрожжевого экстракта) преобладают нераззошедшиеся в ходе деления клетки с характерным расположением под углом друг к другу. Размер клеток - $1,3 \times 0,8$ мкм, с возрастом наблюдается их укорачивание.

2. Культуральные признаки.

Имеют IV тип клеточной стенки, содержат миколовые кислоты и фосфатидилэтаноламин.

Колонии на картофельном агаре ярко-оранжевые, круглые, диаметром 1 - 1,5 мм, выпуклые с ровным краем, блестящие. Консистенция мягкая, легко снимается с поверхности агара, легко размазывается. Хорошо растут на агаризованной среде Раймонда с ацетатом и гексадеканом в качестве органического субстрата. Галотолерантны, способны к росту на минеральной среде Раймонда (с 1% ацетата и 0,25% дрожжевого экстракта), содержащей до 20% NaCl. При солёности свыше 5% наблюдается замедленное пигментирование колоний с развитием окраски от слабо- до ярко-оранжевой.

3. Физиологические признаки.

Каталазоположительные, не кислотоустойчивые, желатин не разжижают, казеин не разлагают, крахмал не гидролизуют.

Хорошо ассимилируют n-алканы (C_{10} - C_{30}), ацетат, пропионат, бутират, этанол, бутанол, пропанол, глюкозу. Слабое развитие на формиате и метаноле. Хорошо растут на дрожжевом экстракте. Используют аммонийный и нитратный азот.

4. Хранение штамма.

Штамм сохраняется в коллекции в лиофилизированном состоянии. Для сохранения штамма используют метод периодических пересевов (3 - 4 раза в год) на картофельном агаре с 1% NaCl. Инкубирование после посева ведут при температуре 28°C в течение 7 - 10 дней, затем культуру хранят в холодильнике при температуре 4°C.

Штамм *Rhodococcus erythropolis*, BKM AC-1502 D.

Выделен из пластовых вод Бондюжского нефтяного месторождения.

1. Морфологические признаки.

Грам-положительные, неподвижные. При развитии хорошо заметны изменения вида культуры типа "кокк - палочка - кокк".

В односуточной культуре на минеральной среде Раймонда (с 1% NaCl, 1% ацетата и 0,25% дрожжевого экстракта) прямые с закругленными концами палочки. При делении наблюдается характерное расположение под углом друг к другу. Размер клеток - $2,7 \times 0,7$ мкм, с возрастом наблюдается укорачивание клеток до $0,8 \times 0,6$ мкм.

2. Культуральные признаки.

Имеют IV тип клеточной стенки, содержат миколовые кислоты и фосфатидилэтаноламин.

Колонии на картофельном агаре бежевые, круглые, диаметром до 5 мм, выпуклые с ровным краем, блестящие, слизистые. Консистенция мягкая, легко снимаются с поверхности агара, легко размазываются. Хорошо растут на МПА, сусло-агаре и на агаризованной среде Раймонда с ацетатом и гексадеканом в качестве органического субстрата, в жидких средах образуют обильный слизистый осадок.

3. Физиологические признаки.

Каталазоположительные, не кислотоустойчивые, желатин не разжижают, казеин не разлагают, крахмал не гидролизуют.

Хорошо ассимилируют n-алканы (C_{10} - C_{30}), ацетат, бутират, этанол, бутанол, глюкозу, D-мальтозу, D-

лактозу. Слабое развитие на пропионате, формиате, пропаноле, D-арабинозе. Хорошо растут на дрожжевом экстракте. Галотолерантны, способны к росту на минеральной среде Раймонда (с 1% ацетата и 0,25% дрожжевого экстракта), содержащей до 15% NaCl. Используют аммонийный и нитратный азот.

4. Хранение штамма.

Штамм сохраняется в коллекции в лиофилизированном состоянии. Для сохранения штамма используют метод периодических пересевов (3 - 4 раза в год) на МПА, сусло- или картофельном агаре с 1% NaCl. Инкубирование после пересева ведут при температуре 28°C в течение 3 - 5 дней, затем культуру хранят в холодильнике при температуре 4°C.

Штамм *Candida sp.*, ВКМ Y-2778 D.

Выделен из пластовых вод Бондюжского нефтяного месторождения.

1. Морфологические признаки.

В односуточной культуре на минеральной среде Раймонда (с 1% NaCl, 1% ацетата и 0,25% дрожжевого экстракта) клетки, в основном, одиночные, круглые, реже овальные и удлиненно-овальные, размер 2 - 5 × 3 - 4 мкм.

2. Культуральные признаки.

Половых структур не образуют (ни аскоспор, ни базидиоспор). Хорошо растут на агаризованной среде Раймонда (с 1% ацетата и 0,25% дрожжевого экстракта), содержащей до 8% NaCl.

3. Физиологические признаки. Хорошо ассимилируют n-алканы (C₁₀-C₃₀), ацетат, пропионат. Слабое развитие на этаноле, пропаноле. Глюкозу не сбраживают, инозит не ассимилируют. Используют аммонийный азот, тест на уреазу отрицательный.

4. Хранение штамма.

Штамм сохраняется в коллекции в лиофилизированном состоянии. Для сохранения штамма используют метод периодических пересевов (3 - 4 раза в год) на МПА, сусло- или картофельном агаре с 1% NaCl. Инкубирование после пересева ведут при температуре 28°C в течение 3 - 5 дней, затем культуру хранят в холодильнике при температуре 4°C.

Пример. Цель испытаний - проверка активности консорциума микроорганизмов "Devougoil" в процессе биоразложения углеводородов нефти.

Методика испытаний: исследование препарата проводят как в статическом режиме в условиях отсутствия массообмена между органической и водной фазами, так и в динамическом режиме с перемешиванием фаз.

Методика испытаний препарата в статическом режиме. Для исследования активности препарата "Devougoil" в процессе биоразложения парафиновых углеводородов нормального строения в качестве субстрата выбирают модельную смесь, состоящую из 1-метилнафталина и n-гексадекана в объемном отношении 1 : 1. При этом предполагают, что активность консорциума по отношению к парафинам значительно превышает его активность по отношению к конденсированным ароматическим углеводородам.

Испытания проводят при комнатной температуре в отсутствие перемешивания и аэрации.

Органический субстрат в количестве 2,506.% помещают в 400мл водной среды с различной степенью минерализации и перемешивают с 25мл биомассы. Исследуют 4 образца с содержанием NaCl, соответственно 0, 10, 50 и 100г/л. Контроль степени биоразложения образцов (по отношению к эталонному образцу, не содержащему биомассу) проводят по относительному содержанию ароматического компонента в субстрате методом ультрафиолетовой спектроскопии на приборе SU-7 HS (Beckman).

Результаты кинетических исследований дублируют с применением газожиждкостной хроматографии на приборе PU 4500 и с помощью инфракрасной спектроскопии на приборе IFS-48 (Bruker) в режиме количественного анализа. Разброс данных, полученных указанными методами, не превышает 5%.

Методика испытаний препарата в динамическом режиме.

В качестве субстрата используют высокопарафинистую нефть Ромашкинского месторождения, в качестве среды - воду с содержанием NaCl от 0,1 до 10мас.%. Биоразложение проводят в термостатируемой стеклянной емкости объемом 0,5л, помещенной на механической качалке (частота колебаний 60об/мин). Исследования проводят при температуре 28°C при массовом соотношении "нефть; минерализованная среда: биомасса" (1 : 99 : 0,0001). Пробы нефти периодически отбирают в течение 20 суток. Анализ проводят методом газожиждкостной хроматографии на приборе PU-4500 по изменению концентрации n-парафинов C₇-C₃₀.

Результаты испытаний.

Методика 1. Данные по биоразложению модельных смесей углеводородов приведены в табл.1.

Как видно из табл.1, максимальная степень биоразложения достигается в интервале солености от 1 до 5%.

Методика 2. Данные по биоразложению образца нефти представлены в табл.2.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ассоциация активно разрушает насыщенные углеводороды нефти в диапазоне минерализации среды от 1 до 10мас.%. Оптимальным для процесса биоразложения парафиновых углеводородов нефти является концентрация NaCl от 1 до 5мас.%, при этом 50% - ное биоразложение достигается на 3 день культивирования, а 100% - на 20 день.

Представленные данные показывают высокую эффективность консорциума микроорганизмов "Devougoil" как деструктора нефтепродуктов в воде различной солености. "Devougoil" может быть использован для очистки почвенных и водных экосистем, загрязненных парафинсодержащими органическими продуктами.

Т а б л и ц а 1

Степень биоразложения гексадекана в % от начальной концентрации

Сутки	1	2	3	6	12
Соленость (% NaCl)					
0	2,2	5,7	6,8	16,3	31,4
1	13,4	19,2	24,4	41,5	67,3
5	13,5	17,0	21,1	35,3	59,4
10	9,0	11,7	15,4	24,4	37,1

Т а б л и ц а 2

Зависимость степени биоразложения парафиновых углеводородов сырой нефти от солености среды и времени воздействия

Сутки	3	5	10	15	20
Соленость (% NaCl)					
0,1	5	7	7	8	10
1	50	80	90	95	95
3	55	80	87	94	100
5	50	80	88	96	100
10	15	45	60	75	80