

ПРОВ

ПРИБ

ОРДЕНА ЛЕНИНА АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ ИНСТИТУТ
БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ им. А.О.КОВАЛЕВСКОГО

№ 2062 - В 87 от. 23.03.87

УДК 574.586

Э.П.Тархова

Ю.Л.Ковальчук

К ВОПРОСУ ОБ ИЗМЕНЕНИИ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ
В ПРИСУТСТВИИ ОРГАНИЗМОВ ПЕРИФИТОНА

Институт биологии
южных морей АН УССР

БИБЛИОТЕКА

№ 130 деп

Севастополь - 1987

Окисление углеводородов нефти и нефтепродуктов морскими микроорганизмами-факт общеизвестный [3,4]. Однако, в литературе ограничены сведения об изменении нефти в присутствии перифитона.

В связи с этим целью настоящей работы явилось: выявление влияния сообщества перифитонных организмов на изменение углеводородов нефти с анализом гидрохимических характеристик среды, изучение перифитона и микрофлоры воды в экспериментальных емкостях.

Материал и методики

Исследования проводились в экспериментальных емкостях объемом 2 л, в каждой из которых были заданы разные условия: 1 - морская вода с суспензией нефти и перифитоном; 2 - морская вода с перифитоном без нефти; 3 - морская вода с нефтью без перифитона; 4 - условно чистая морская вода (контроль).

Объектом исследования служили: сообщество перифитонных микроорганизмов (СПМ) и некоторые макроорганизмы обрастаний на стеклянной пластине, которая вносились в экспериментальные емкости, а также микроорганизмы различных специфических групп (протеолитические, нефтеокисляющие, амилитические, липолитические), выделенные из экспериментальных емкостей.

Для учета бактерий перифитона применяли методы, изложенные в монографии Ю.А.Горбенко [2]. Видовой состав, а также процент гибели организмов перифитона оценивали под биноклем при увеличении 30^x.

С целью выявления условий, протекающих в исследуемых емкостях, снимали гидрохимические характеристики среды (рН, растворенный кислород, фосфаты, нитраты, нитриты) по обще-

принятым методикам [5].

Количественный учет протеолитических бактерий планктона проводили на пептонной воде. Количество углеводородокисляющих бактерий определяли методом предельных разведений на среде Диановой-Ворошиловой с добавлением нефти [1]. Для определения численности амилотических бактерий использовали морскую воду с добавлением 1% крахмала. Наличие фенолоокисляющих бактерий выявляли на среде Диановой-Ворошиловой с добавлением 300 мг/л фенола. Липолитические бактерии учитывали на минеральной среде Диановой-Ворошиловой с добавлением жира в качестве источника углерода. Численность бактерий в 1 мл воды устанавливали с помощью таблиц Мак-Креди.

Количество нефти определяли на ИК-29. Качественный состав нефти, в частности, масляную фракцию исследовали методом газо-жидкостной хроматографии (использовали хроматограф "Хром-3") с ионизационно-плазменным детектором). Капиллярная колонка длиной 35 м была заполнена 2%-ным Апиэзоном-а в бензоле. Начальная температура 108°C, программирование температуры вели до 240°C со скоростью 2°/мин. Температура камеры инъекции 300°C.

Результаты и обсуждение

Наблюдения за изменением СПМ в емкостях с нефтью и без нефти показало, что первоначально до проведения опыта, на стеклянных пластинах по всей поверхности в обрастании доминировали гидроиды *Obelia*, равномерно распределенные по всей площади. Среди них встречались рачки *Naupastacidae* - 1-2 шт. в поле зрения бинокля 30^x, черви *Nematoda*, *Polidora*. Слизистая пленка практически отсутствовала. Простейшие бы-

ли представлены видами *Vorticella marina*, *Bodo globosus*, *Stylonichia pustulata*, *Lionotus lamella*.

Диатомовые - колониями и отдельными представителями родов *Achnantes*, *Coscinodiscus*, *Melosira* реже *Nitzschia*.

Через 3-и сут. в емкости с нефтью погибло 50% живых организмов, включая рачки *Harpacticidae* и простейшие *L. lamella*, *V. marina*; оставались живыми *Bodo*, *Polydora*, а в емкости без нефти процент гибели гидроидов составил 10%. Через 6 сут погибших организмов в емкости с нефтью было 60%, а без нефти - 25%, к концу экспозиции гидроиды погибли, оставались жизнедеятельными инфузории и диатомовые рода *Achnantes*.

Микроскопия капли воды, взятой из смыва со стеклянной пластины показала, что в препарате доминировали бактериальные палочки средней величины, слегка изогнутые, подвижные; реже встречались короткие неподвижные палочковидные формы, спирали, кокковидные бактерии и нитевидные клетки. К концу экспозиции также преобладали палочки средней величины и кокковидные формы бактерий.

В водной среде можно было увидеть мелкие палочковидные клетки с активным движением, встречались средние и крупные палочки, одиночные и парами, значительно реже - спиралевидные бактерии с ветвлениями. К концу опыта в воде преобладали мелкие палочки, реже встречались прямые, средней величины с тупозакругленными концами и неправильной формы с ветвлениями.

В емкости, куда была внесена нефть и стеклянная пластина с перифитоном (рис. I А), на 3-и сут численность нефтеокисляющих и фенолоокисляющих микроорганизмов в воде увеличилась и составила $1,5 \cdot 10^2$ кл/мл, что, по-видимому, объяс-

няется начавшейся деструкцией углеводов. На 6-е сут наблюдалось незначительное снижение численности микробных популяций и лишь на 9-е сут содержание нефтеокисляющих микроорганизмов вновь возросло, в то время как другие физиологические группы снизились на незначительные величины. Такой всплеск нефтеокисляющих бактерий к концу экспозиции, возможно, объясняется адаптацией перифитонных микроорганизмов к углеводородам нефти, отсюда и увеличение численности углеводородокисляющих бактерий в морской воде с суспензией нефти. Число клеток амилолитических, липолитических, фенолоокисляющих микроорганизмов на 9-е сут уменьшилось незначительно и достигло исходной величины. Одновременно проводимые определения численности протеолитических и нефтеокисляющих бактерий перифитона показали, что на 3-и сут идет увеличение как протеолитических, так и нефтеокисляющих бактерий; на 6-е сут протеолитические перифитона практически остались без изменения и на 9-е сут их плотность равнялась первоначальной величине. Относительно количества нефтеокисляющих бактерий перифитона, то после 3-х сут наблюдался незначительный спад их численности. Возможно, что при увеличении срока пребывания нефти идет адаптация одних видов бактерий и гибель других, составляющих наибольшую численность.

Биологические процессы, происходящие в данной емкости в присутствии перифитона и нефти, привели к изменениям гидрохимических характеристик. Так, уже на 3-и сут отмечено снижение растворенного кислорода в 1,4 раза по сравнению с исходными показателями, которое продолжалось на 6-е сут и на 9-е сут достигло 5 мл/л. Количество нит-

ритов постепенно уменьшалось на 3, 6 и 9-е сут с 24 до 17 мкг/л. Что касается нитратов, то в этой емкости количество его увеличивалось на 3, 6 и 9-е сут равномерно с 13 до 26 мкг/л. Количество фосфора минерального к концу экспозиции не уменьшилось, а наоборот увеличилось до 87 мкг/л. Это можно объяснить, очевидно, процессами разложения нестойкого органического вещества в результате гибели организмов перифитона. Активная реакция среды характеризовалась незначительным подщелачиванием и к концу испытаний составила 8,12 единиц pH (табл. I).

Анализ гидрохимических показателей в емкости с перифитоном без нефти показал, что характер изменения растворенного кислорода такой же как и в емкости с нефтью и перифитоном. К концу испытаний его количество было 5,2 мл/л. Фосфора минерального на 3-и сут стало 90, а на 6-е 102 мкг/л и к концу опыта его было почти в 2 раза больше исходной величины; среда в данной емкости была мутной. Количество нитритов в данной емкости на протяжении 6 сут было приблизительно одинаковым с емкостью, содержащей нефть, но в конце его стало в 3 раза меньше исходной величины. Нитраты на 9-е сут несколько увеличились с 13 до 21 мкг/л, количество фосфатов также возросло почти в 2 раза. В этой емкости наблюдалось постепенное повышение pH с 7,45 до 8,26 единиц pH (табл. I).

В емкости с перифитоном без нефти наблюдалась несколько иная картина распределения микрофлоры (рис. I Б). Численность нефтеокисляющих, фенолоокисляющих, липолитических и амилитических бактерий насчитывала на 3-и сут десятки клеток в I мл, плотность протеолитических уменьшилась на

3-и сут. На 6-е сут зарегистрировано увеличение всех групп изучаемых бактерий; число клеток нефтеокисляющих, липолитических, амилолитических бактерий возросло на I порядок, протеолитических и нефтеокисляющих - на 2 порядка. Обращает внимание более высокие величины численности протеолитических микроорганизмов перифитона. Так, на 6-е сут плотность протеолитических микроорганизмов насчитывала свыше I млн кл/мл. На 9-е сут отмечено небольшое снижение всех групп изучаемых бактерий.

Микробиологические исследования микрофлоры в емкости, содержащей морскую воду и нефть (рис. I B), показали, что на 3 сут идет увеличение численности нефтеокисляющих, липолитических, фенолоокисляющих и амилолитических микроорганизмов на 3-4 порядка, что свидетельствует о процессах, связанных с изменением углеводов в данной экспериментальной емкости. Количество протеолитических бактерий в первые 3-е сут осталось без изменений. Численность других физиологических групп бактерий в этой емкости несколько снизилась и на 9-е сут наметилась тенденция к уменьшению всех групп изучаемых бактерий.

Изучение гидрохимических характеристик показало, что в емкости с морской водой и нефтью без перифитона по мере увеличения времени экспозиции идет снижение количества растворенного кислорода. Так, на 3-и сут его содержание уменьшилось с 10 до 7 мл/л, на 6-е оставалось без изменений, а на 9-е - его стало 6 мл/л. Показатель активной реакции среды по сравнению с исходными данными на 3, 6 и 9-е сут постепенно увеличивался с 7,45 до 8,20 единиц pH. Количество минерального фосфора на 3-и сут возросло с 68 до 74 мкг/л, затем

на 6 и 9-е сут снизилось до 31 мкг/л. Нитриты на 3, 6 и 9-е сут незначительно уменьшились с 24 до 18 мкг/л, количество нитратов практически оставалось без изменений (табл. I).

В условно чистой морской воде изменение гидрохимических параметров характеризовалось незначительным снижением растворенного кислорода на 3-и и 6-е сут, а к концу экспозиции создались условия его дефицита (2,8 мл/л). Количество нитритов в отличие от предыдущих экспериментов на протяжении всего опыта оставалось практически без изменений в пределах 23-24 мкг/л, нитраты - незначительно увеличились до 16 мкг/л. В контроле отмечено более быстрое снижение фосфатов. Так, на 3-и сут их было 48, на 2-е - 25, а на 9-е сут фосфатов стало в 3 раза меньше по сравнению с исходным количеством (табл. I).

В данной емкости было отмечено увеличение на 3-и сут всех групп изучаемых бактерий (рис. I Г) на 2-3 порядка по сравнению с исходными данными. На 6-е сут значительных изменений в количественном содержании микрофлоры не наблюдалось и к концу экспозиции на 9-е сут зарегистрировано незначительное снижение плотности бактериопланктона.

О том, как идет изменение биологических и химических параметров в экспериментальных емкостях свидетельствуют не только качественные характеристики сообщества перифитонных организмов и количественные показатели исследуемой микрофлоры, но и данные о содержании нефти и хроматографического анализа.

Определение количественного содержания нефти в экспериментальных емкостях показало, что на 3-и сут в емкости с морской водой и нефтью без перифитона количество нефти сни-

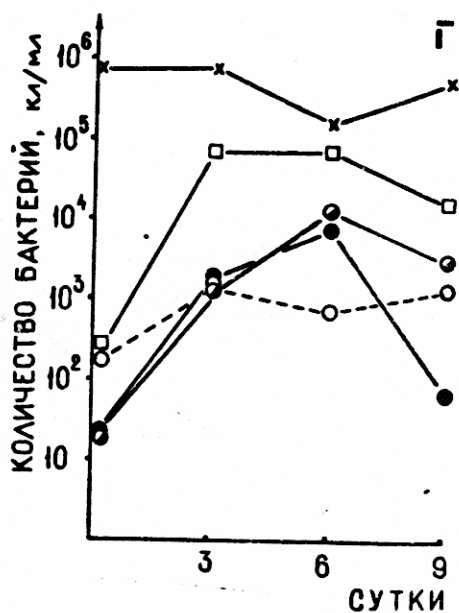
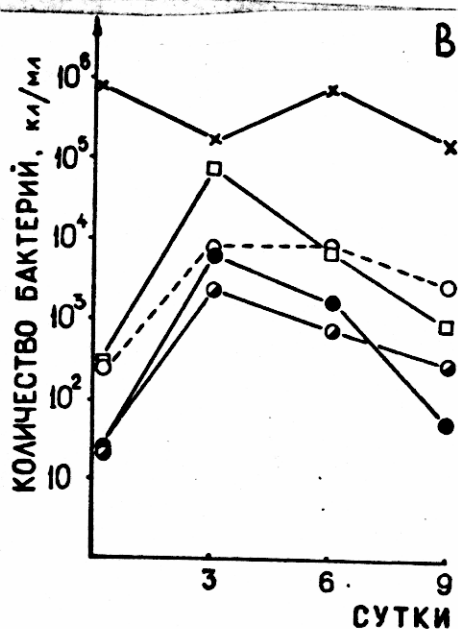
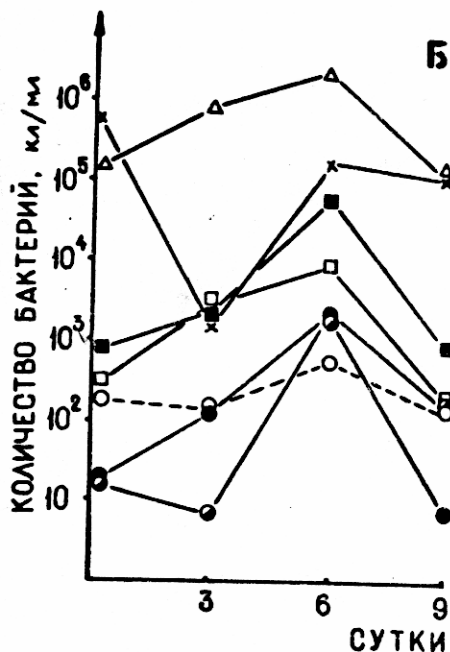
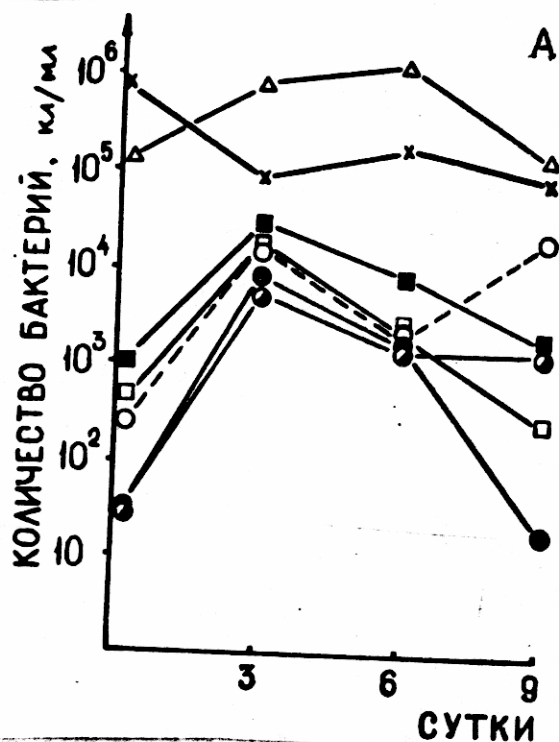


Рис. I. Численность бактерий различных физиологических групп

x-x- протеолитические планктона, Δ-Δ - протеолитические перифитона, O-O - нефтеокисляющие из воды, ■-■ - нефтеокисляющие с пластины, ●-● - липолитические, □-□ - амилаолитические, ○-○ - фенолоокисляющие.

А - емкость № I (морская вода + нефть + перифитон), Б - емкость № 2 (морская вода + перифитон), В - емкость № 3 (морская вода + нефть), Г - емкость № 4 (условно чистая морская вода)

Институт биологии
южных морей АН СССР

БИБЛИОТЕКА

№ 1304 деп

Таблица I

Изменение гидрохимических показателей в экспериментальных емкостях

Наименование показателей	Продолжительность испытаний, сут	Экспериментальные емкости			
		морская вода + нефть + перифитон I	морская вода + перифитон 2	морская вода + нефть 3	условно чистая морская вода 4
Растворенный кислород, мг/л	0	10	10	10	10
	3	7,5	7,2	7,0	7,6
	6	5,2	5,8	7,0	7,0
	9	5,0	5,2	6,0	2,8
рН	0	7,45	7,45	7,45	7,45
	3	7,76	8,00	7,84	7,54
	6	7,81	8,01	7,96	7,61
	9	8,12	8,26	8,20	7,89
Фосфор, PO_4^{3-} мкг/л	0	68	68	68	68
	3	74	90	74	46
	6	77	102	40	25
	9	87	104	31	22
Нитриты, мкг/л	0	24	24	24	24
	3	21	20	21	23
	6	22	17	22	24
	9	17	8	18	24
Нитраты, мкг/л	0	13	13	13	13
	3	16	15	13	14
	6	22	18	14	16
	9	26	21	13	16

зилось на 44%, а в емкости с морской водой, нефтью и перифитоном на 50%, причем 1/4 часть оставшейся нефти адсорбировалась на пластине (табл. 2).

Чтобы полнее охарактеризовать деструкционные процессы, протекающие в емкостях с нефтью, были проанализированы хроматограммы. Сопоставляя данные двух хроматограмм (рис. 2 и 3), можно заметить, что на рис. 3 (морская вода с нефтью и перифитоном) отчетливо видно уменьшение парафиновых углеводородов. Так, если на рис. 2 диапазон нормальных парафинов охватывает ряд с C_{12} до C_{30} , то на хроматограмме, представленной на рис. 3 этот ряд значительно сократился, диапазон нормальных парафинов начинается с C_{14} и заканчивается C_{23} . Отсюда следует, что за 10 сут в эксперименте с перифитоном и нефтью произошло частичное исчезновение нормальных парафинов и по высоте пиков на хроматограмме можно судить о значительном количественном уменьшении п-алканов.

Полученные результаты показали необходимость проведения дальнейших исследований по участию организмов перифитона в деструкции углеводородов нефти. Следует обратить внимание на адсорбцию нефтепродуктов на пластине с организмами обростания.

Проведенные исследования позволяют заключить, что в емкости в присутствии СПМ наблюдались более значительные изменения качественных и количественных характеристик внесенной нефти. Начавшиеся процессы деструкции углеводородов сопровождались увеличением количества специфических групп микроорганизмов - нефтеокисляющих, липолитических, амилолитических, фенолоокисляющих. Уменьшение численности физиологических групп микроорганизмов к концу экспозиции следует объ-

Таблица 2

Содержание нефти в экспериментальных емкостях,
мг/л

Продолжительность экспозиции, сутки	Экспериментальные емкости		
	№ I		№ 3
	в морской воде	на плас- тине	в морской воде
3	8,25	2,75	12,27
6	5,36	3,90	9,97
9	3,87	2,75	9,66

Примечание: Исходное количество нефти в емкостях
составило 21,98 мг/л

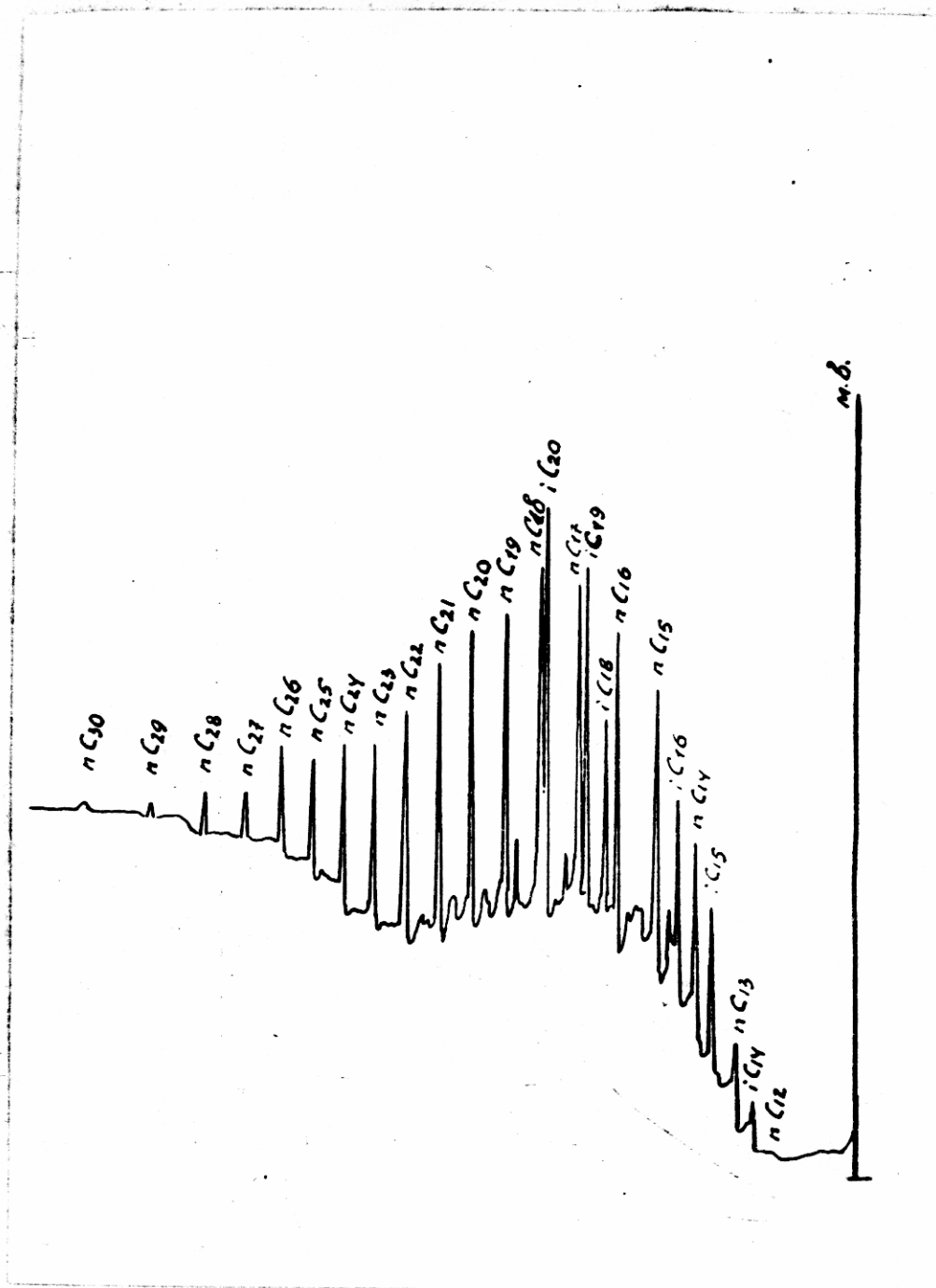


Рис. 2. Хроматограмма нефти из емкости
с морской водой

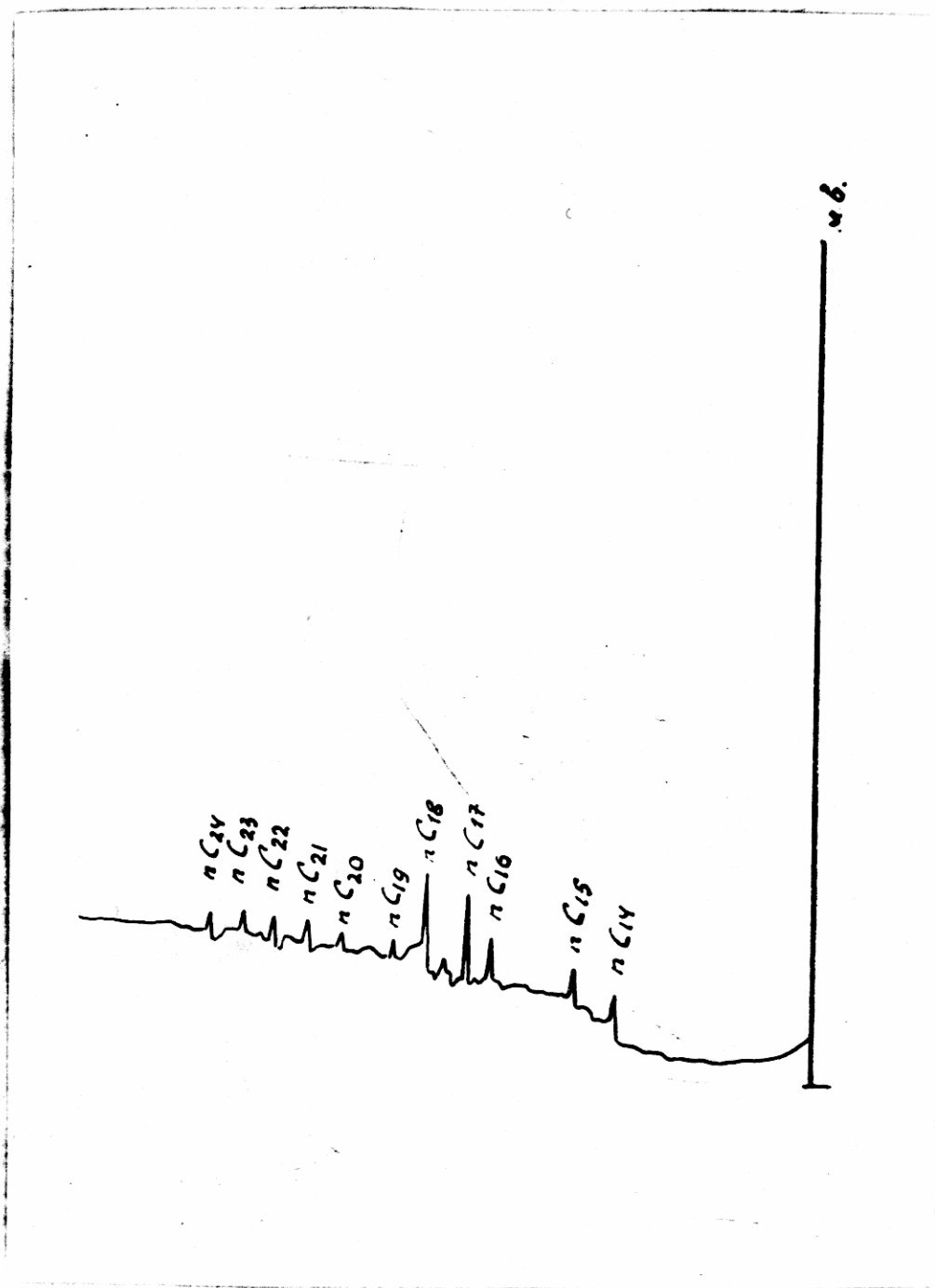


Рис. 3. Хроматограмма нефти из емкости с морской водой в присутствии перифитона

яснить накоплением продуктов их жизнедеятельности, тормозящих их рост. Отмечено, что в этой емкости изменение гидрохимических параметров было более контрастным, так к концу экспозиции отмечено снижение растворенного кислорода, уменьшение на $1/2$ нитритов, на столько же увеличились нитраты и возросли показатели минерального фосфора, что, по-видимому, могло произойти за счет гибели организмов перифитона. Данные гидрохимических характеристик дают также основание предположить, что в присутствии организмов перифитона процессы трансформации органических веществ идут более интенсивно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ворошилова А.А., Дианова Е.В. Окисляющие нефть бактерии - показатели интенсивности биологического окисления нефти в природных условиях. - Микробиология, 1952, т.20, вып. 4, с. 408-409.
2. Горбенко Ю.А. Экология морских микроорганизмов перифитона. - Киев: Наук.думка, 1977. - 252 с.
3. Миронов О.Г. Биологические ресурсы моря и нефтяное загрязнение. - М.: Пищевая промышленность, 1972.- 104 с.
4. Миронов О.Г., Кирюхина Л.Н., Кучеренко М.И., Тархова Э. П. Самоочищение в прибрежной акватории Черного моря. - Киев: Наук.думка, 1975. - 141 с.
5. Руководство по методам химического анализа морских вод./ под ред. С.Г.Орадовского. - Л.: Гидрометеиздат, 1977. - 208 с.

Печатается в соответствии с разрешением Ученого совета
Института биологии южных морей им. А.О.Ковалевского АН
УССР от 1 августа 1986г.

печатать 24/II-87г.

. 1

Цена 1 руб. 70 коп.

Зак. 32792

Производственно-издательский комбинат ВИНТИ
Львовцы, Октябрьский пр., 403