

УДК 631.417:502.55

МОРФОЛОГИЯ МИКРОСТРУКТУР НЕФТЯНЫХ КОМПОНЕНТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К БИОЛОГИЧЕСКОМУ РАЗЛОЖЕНИЮ

А.С. Гордеев, А.А. Шинкарев, А.А. Несмелов, Р.А. Галиев

Аннотация

Проведено электронно-микроскопическое исследование почвенных образцов, загрязненных товарной нефтью, фракции с удельной плотностью $< 1.4 \text{ г/см}^3$, выделенной из нефтешлама, прошедшего все этапы технологической схемы фиторемедиации, и пахотного чернозема, систематически загрязняемого поверхностным стоком с территории эксплуатируемых нефтяных скважин. Просвечивающая электронная микроскопия показала присутствие различных по морфологии и линейному размеру пространственно-структурированных микроскопических формирований органических фаз, непроницаемых для электронного луча.

Ключевые слова: нефть, загрязнение, пахотные почвы, нефтешлам, просвечивающая электронная микроскопия.

Введение

В соответствии с общепринятыми представлениями кинетика естественной деградации нефти в почвах складывается из трех последовательно замедляющихся стадий [1]. Самая быстрая стадия (1–1.5 лет) обусловлена протеканием преимущественно абиотических геохимических процессов, тогда как две последующих связаны с деятельностью микроорганизмов. Наиболее медленной и наименее изученной считается стадия, когда после микробной трансформации низкомолекулярных углеводородов нефти в почве остаются высокомолекулярные соединения, характеризующиеся высокой стойкостью к биологическому разложению. Время, за которое может происходить их полная деградация, проблематично конкретизировать, тем более что в условиях микрополевых опытов получены косвенные экспериментальные свидетельства возможности включения нефтяных компонентов или их фрагментов в структуру гумусовых веществ [2].

Поскольку процесс самоочищения почв может быть неопределенно длительным, решение проблемы все больше связывают с применением биологических методов ремедиации [3], среди которых особое внимание исследователей привлекают технологии фиторемедиации, использующие объединенный метаболический потенциал микроорганизмов и растений. Даже для нефтешлама уже разработана технологическая схема фиторемедиации, позволяющая в среднем на 90% уменьшить содержание остаточных нефтяных компонентов с одновременным элиминированием их токсического действия на организмы различного трофического уровня [4].

К наиболее устойчивым к биодegradации высокомолекулярным нефтяным компонентам обычно относят асфальтены, поскольку по мере уменьшения доступности субстратов доля асфальтенов в их составе всегда закономерно увеличивается [5]. Этот экспериментальный факт принято связывать со сложной молекулярной структурой асфальтенов. Действительно, если допустить, что связи асфальтеновых макромолекул полностью доступны атакам ферментов, выделяемых на потенциальный субстрат питания, то эффективным механизмом защиты их от расщепления является сложный характер сочленения субъединиц в макромолекулярной цепи. Тогда асфальтеновые компоненты вполне могут оказаться недостаточно специфическим субстратом для катализаторов. Однако не следует упускать из виду, что полярные молекулы асфальтенов со средней массой 700–800 Да [6–8] способны сорбироваться на гидрофобных и гидрофильных поверхностях [9] и формировать агрегаты различной геометрической формы и размера [10, 11]. Самоорганизация макромолекул в пространственно-структурированные системы подразумевает конформационные ограничения, обусловленные взаимодействиями с ближним макромолекулярным окружением и (или) минеральными поверхностями. При этом даже при наличии в среде ферментного пула, необходимого спектра специфичности, устойчивость высокомолекулярных нефтяных компонентов к биодegradации вполне очевидно может быть обеспечена стерическими затруднениями на пути образования фермент-субстратных комплексов.

Ранее в пахотной почве, систематически загрязняемой поверхностным стоком с территории эксплуатируемых нефтяных скважин, с помощью просвечивающей электронной микроскопии нами было обнаружено присутствие различных по морфологии формирований органических фаз с линейным размером от 100 до 1200 нм, не встречающихся в фоновой почве [12]. Представляет интерес продолжение исследований морфологии микроструктур остаточных нефтяных компонентов, расширив круг объектов образцами нефтешлама, прошедшего все этапы технологической схемы фиторемедиации.

1. Объекты и методы

В экспериментах использовали образцы целинных лесостепных почв, подвергнутых загрязнению сырой товарной нефтью, образцы пахотной черноземной почвы, систематически загрязняемой поверхностным стоком с территории эксплуатируемых нефтяных скважин, и образцы из ризосферной зоны растений, культивируемых на нефтешламе.

Для модельного загрязнения образцов использована нефть нафтеново-парафинового состава Ромашкинского месторождения. Нефть вносили при помощи пульверизатора в весь объем почвы из расчета на 1 кг воздушно-сухой почвы [13]. Концентрация внесенной нефти составляла 10%. Загрязненные образцы выдерживали в стеклянных банках с герметичными крышками в течение 12 месяцев.

Схема отбора образцов систематически загрязняемой поверхностным стоком пахотной черноземной почвы приведена в ранее опубликованной работе [12].

Образцы из ризосферной зоны растений, культивируемых на нефтешламе ОАО «Нижнекамскнефтехим», отобраны на заключительном этапе фиторемедиации. Для отбора проб извлекали растения мелиоранты, культивируемые

на шлама, встряхиванием удаляли с корней непрочно связанные агрегаты нефтешлама и затем смывали прочно ассоциированные агрегаты, представляющие собой ризосферный слой. Технологическая схема фиторемедиации нефтешлама включала его предобработку с привлечением растительной морт-массы, почвы и удобрений (в течение сезона) и два сезона высева смеси газонных трав с внесением удобрений и почвы, их культивирования до высоты 15–20 см, запашки и повторного культивирования (три цикла за сезон).

Для отделения непрочно связанных с минеральными частицами почвы и нефтешлама остаточных нефтяных компонентов применяли физическое фракционирование в растворе К1 с удельной плотностью $< 1.4 \text{ г/см}^3$. Исходили из того, что основная их часть представлена асфальтовыми компонентами, удельная плотность которых обычно принимается между 1.1 и 1.2 г/см^3 [14]. Предварительное диспергирование образцов в тяжелой жидкости проводили путем механического растирания. Препараты легкой фракции для просвечивающей электронной микроскопии готовили путем нанесения разбавленной суспензии на коллодиевую пленку с медной сеткой-подложкой.

К образцам из верхнего слоя лесостепных почв, загрязненных нефтью в модельном эксперименте, не применяли процедур выделения легкой фракции. Пробоподготовка включала диспергацию представительной пробы в дистиллированной воде на частоте 22 кГц в диспергаторе УЗДН-2, нанесение капли суспензии на коллодиевую пленку на медной сетке-подложке, высушивание микропрепарата при комнатной температуре и съемку в ПЭМ ЭММА-4 при ускоряющем напряжении 75 кВ.

2. Результаты и их обсуждение

Электронно-микроскопический анализ загрязненных товарной нефтью почвенных образцов показал, что для части нефтяных компонентов отчетливо проявляется тенденция к формированию обособленных скоплений. Их изображения приведены на рис. 1 для образца из слоя 4–10 см гор. А₁ темно-серой лесной легкоглинистой почвы. Образец представлен полидисперсными частицами, морфология которых характерна для глинистых минералов, слюд и первичных минералов (рис. 1, а). Глинистые минералы отличаются толщиной и однородностью частиц и характером контура. Регулярно отмечается обособленная органическая фаза – округлые скопления на поверхности глинистых частиц. Микроморфология таких скоплений позволяет судить о гомогенности – край их ровный, не образуются периферии высыхания под воздействием электронного луча (скопления, скорее всего, представлены высокомолекулярными компонентами нефти). Диаметр капель варьирует в диапазоне 10–50 нм. Скопления наименьшего диаметра преимущественно ассоциированы с тонкими и «аморфизованными» частицами глинистых минералов, характеризующимися наиболее развитой поверхностью (рис. 1, б–е), тогда как на поверхности крупных однородных глинистых частиц локализованы капли с наибольшим диаметром (рис. 1, ж–и).

Во фракции с удельной плотностью $< 1.4 \text{ г/см}^3$, выделенной из нефтешлама, прошедшего полный цикл технологической схемы фиторемедиации, просвечивающая электронная микроскопия показала присутствие различных по морфологии микроструктур как вязких, так и весьма текучих органических фаз (рис. 2).

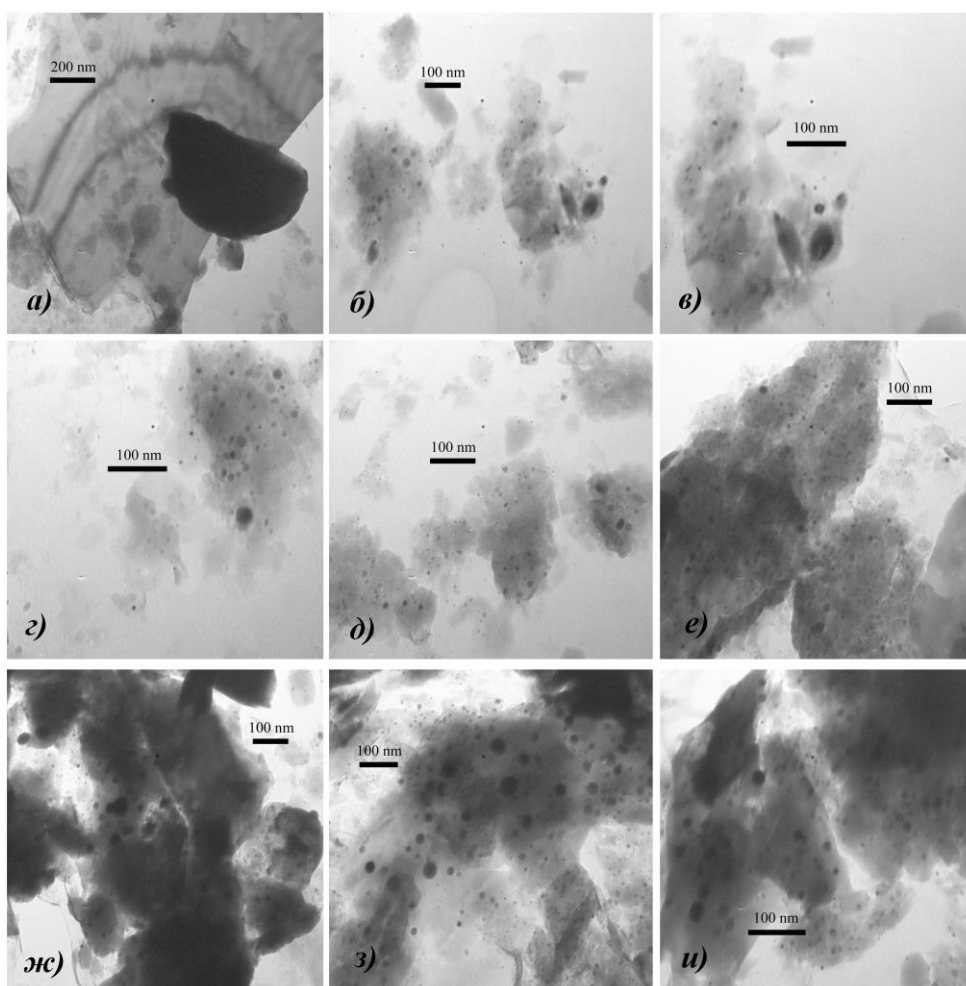


Рис. 1. Изображения формирований органических фаз в почве, загрязненной товарной нефтью

Вязкая органическая фаза может быть представлена монообъемными каплями разнообразной формы с неоднородной плотностью, что объясняется высыханием под действием нагрева от электронного луча (рис. 2, *a*). Локально встречаются наноразмерные округлые формирования на глинистых частицах (рис. 2, *б*). Примеры морфологии формирований весьма текучих органических фаз представлены на рис. 2, *в*, *г*. Встречаются формирования монообъемных полупрозрачных образований весьма текучих органических фаз сложной формы (рис. 2, *д*, *е*). Подобные разветвленные объекты достигают 2–3 мкм в длину при небольшой (50–300 нм) толщине отдельных звеньев. Отмечается изменение прозрачности объектов под лучом микроскопа, что объясняется потерей низкокипящих компонентов. При испарении части летучих соединений внутри контура остаются либо агрегированные узловатые скопления (рис. 2, *ж*), либо непрозрачные устойчивые округлые капли, сохраняющие четкий контур и непрозрачность и не стекающие воедино (рис. 2, *з*, *и*).

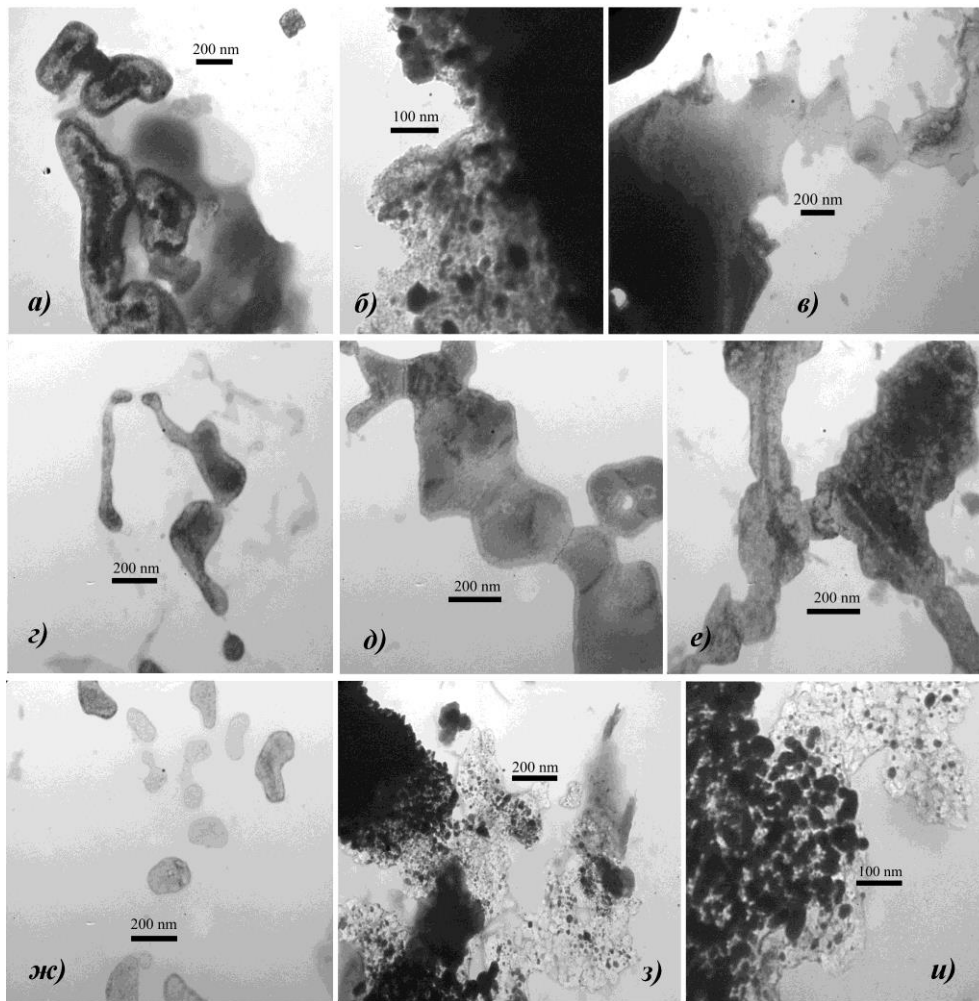


Рис. 2. Изображения формирований органических фаз фракции плотностью $< 1.4 \text{ г/см}^3$, выделенной из нефтешлама, прошедшего все этапы технологической схемы фиторемедиации

Изображения микроструктур органических фаз легкой фракции, выделенной из почв, подвергавшихся систематическому загрязнению, частично приводились в ранее опубликованной работе [12]. Для более полной характеристики разнообразия морфологии этих формирований имеет смысл привести дополнительные результаты просвечивающей электронной микроскопии.

На рис. 3, *a* локально встречаются каплевидные структуры органического происхождения. Отдельные частицы ассоциированы с глинистыми минералами, о чем свидетельствует размытый контур крупной частицы ($> 100 \text{ нм}$). На рис. 3, *б* представлена система агрегированных органических частиц, наиболее непрозрачных по сравнению со всеми наблюдаемыми включениями в препаратах, что объясняется высокой плотностью, отсутствием текучести, вероятно, наличием близкой к упорядоченной структуре. На рис. 3, *в* и *г* изображена хлопьевидная частица глинистого минерала с ассоциированной органической фазой. Непрозрачное органическое вещество заполняет все неровности развитой

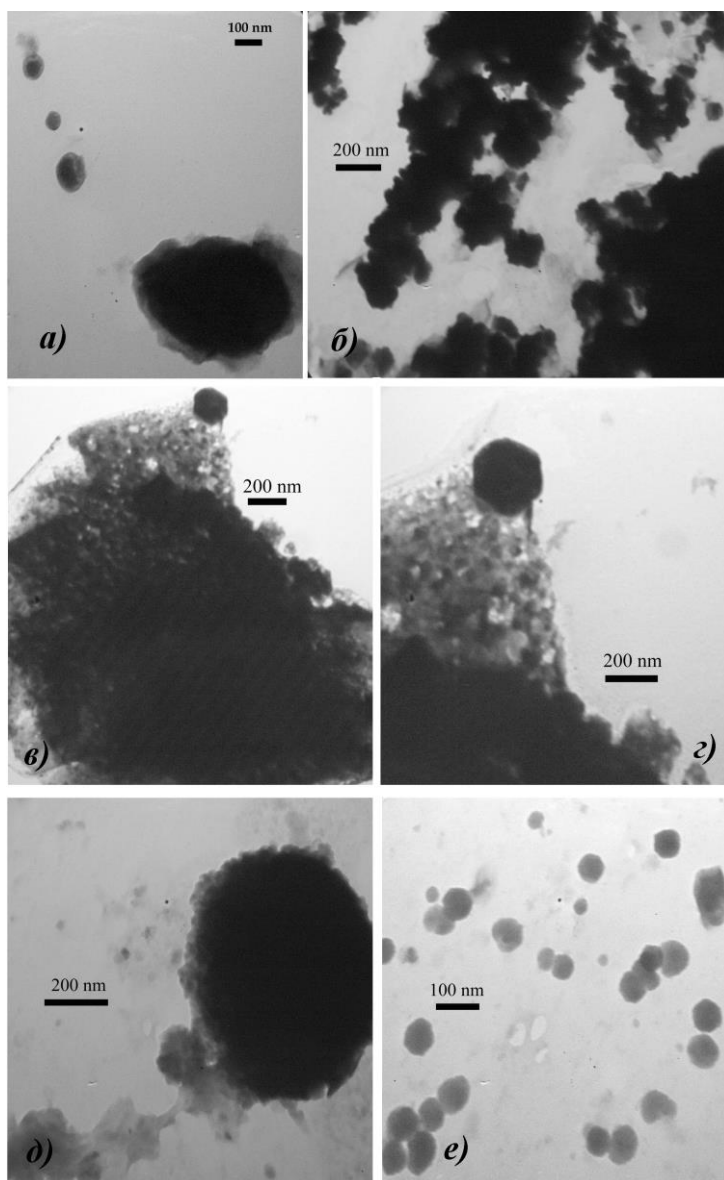


Рис. 3. Изображения формирований органических фаз фракции плотностью $< 1.4 \text{ г/см}^3$, выделенной из почв, подвергавшихся систематическому загрязнению

поверхности частицы, отдельный хорошо выполненный фрагмент органики локализован на периферии частицы. Резкий контур и равномерная непрозрачность свидетельствуют о высокой плотности и об отсутствии текучести. Встречаются мицеллярные формирования органической фазы. Контур объектов неровный, прозрачность неоднородная, отмечается рельефность и перепад толщины, что позволяет судить об агрегированности (рис. 3, *д*). Подобные мицеллы из отдельных единиц – наноглобул – имеют тенденцию к агрегации с высокодисперсными глинистыми минералами. Встречается и неагрегированная органическая фаза в виде отдельных полупрозрачных округлых частиц диаметром 70–80 нм (рис. 3, *е*).

Присутствие микроструктур нефтяных компонентов в продуктах фиторемедиации нефтешлама и систематически загрязняемых пахотных почвах уже само по себе предполагает повышенную устойчивость их к биодegradации. С высокой степенью уверенности можно утверждать, что действие каталитически активных глобулярных белков, выделяемых микроорганизмами на потенциальный субстрат питания, ограничено поверхностью таких пространственно-структурированных систем. Соответственно, условием максимального использования метаболического потенциала деструкторов является диспергирование формируемых нефтяных компонентов до развернутых в растворе макромолекул, не взаимодействующих друг с другом. Следует также заметить, что обнаруженные микроскопические формирования, почти наверняка, будут функционировать как среда сорбционного удерживания молекул гидрофобных соединений меньшего размера по механизму распределения («растворения») в органической фазе, биохимически стабилизированной путем структурирования макромолекул нефтяных компонентов.

Вызывает некоторое удивление то, что вполне очевидная возможность самоорганизации части нефтяных компонентов в пространственно-структурированные системы не вызвала особенного практического интереса у специалистов в области биоремедиации нефтезагрязненных почв и шламов. Произошло это, скорее всего, из-за того, что эффективность применения тех или иных биологических методов ремедиации принято оценивать тестами на токсичность, а высокомолекулярные нефтяные компоненты, в частности асфальтены, сравнительно малотоксичны для организмов разного таксономического уровня [15, 16].

Заключение

В почвенных образцах, загрязненных товарной нефтью, продуктах фиторемедиации нефтешлама и пахотных почвах, систематически загрязняемых поверхностным склоновым стоком с территории эксплуатируемых кустовых нефтяных скважин, присутствуют пространственно-структурированные микроскопические формирования органических фаз, непроницаемые для электронного луча. Морфология высоко текучих, вязких и плотных микроструктур нефтяных компонентов весьма разнообразна, а линейные размеры варьируют от 10–50 до 2000–3000 нм.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности.

Использовано оборудование Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки РФ (ID RFMEFI59414X0003).

Литература

1. Солнцева Н.П. Добыча нефти и геохимия природных ландшафтов. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 2001. – 376 с.

2. *Маячкина Н.В., Чугунова М.В., Бакина Л.Г.* Особенности биодegradации нефти в почвах Северо-Запада России // Вестн. Нижегород. гос. ун-та. – 2011. – № 5. – Р. 110–116.
3. *Кураков А.В., Ильинский В.В., Котелевцев С.В., Садчиков А.П.* Биоиндикация и реабилитация экосистем при нефтяных загрязнениях. – М.: Графикон, 2006. – 336 с.
4. Пат. 2329200 РФ, МПК7 C02F 11/16. Способ переработки шламов очистных сооружений нефтехимических и нефтеперерабатывающих производств / О.И. Якушева, Р.П. Наумова, А.А. Самольянов, В.П. Кичигин, И.И. Аскарлов, В.А. Галухин, В.Н. Никонорова, Р.А. Галиев. – № 2006115820/15; заявл. 30.11.05. опублик. 20.07.2008. Бюл. № 20.
5. *Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P.* Recent advances in petroleum microbiology // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2003. – V. 67, No 4. – P. 503–549. – doi: 10.1128/MMBR.67.4.503-549.2003
6. *Qian K., Edwards K.E., Siskin M., Olmstead W.N., Mennito A.S., Dechert G.J., Hoosain N.E.* Desorption and ionization of heavy petroleum molecules and measurement of molecular weight distributions // Energy Fuels. – 2007. – V. 21, No 2. – P. 1042–1047. – doi: 10.1021/ef060360t.
7. *Schneider M.H., Andrews B., Mitra-Kirtley S., Mullins O.C.* Asphaltene molecular size by fluorescence correlation spectroscopy // Energy Fuels. – 2007. – V. 21, No 5. – P. 2875–2882. – doi: 10.1021/ef700216r.
8. *Hsu C.S., Hendrickson C.L., Rodgers R.P., McKenna A.M., Marshall A.G.* Petroleomics: advanced molecular probe for petroleum heavy ends // J. Mass Spectrom. – 2011. – V. 46, No 4. – P. 337–343. – doi: 10.1002/jms.1893.
9. *Saraji S., Goual L., Piri M.* Adsorption of asphaltenes in porous media under flow conditions // Energy Fuels. – 2010. – V. 24, No 11. – P. 6009–6017. – doi: 10.1021/ef100881k.
10. *Vasquez D., Mansoori G.A.* Identification and measurement of petroleum precipitates // J. Petrol. Sci. Eng. – 2000. – V. 26, No 1–4. – P. 49–56. – doi: 10.1016/S0920-4105(00)00020-6.
11. *Priyanto S., Mansoori G.A., Suwono A.* Measurement of property relationships of nanostructure micelles and coacervates of asphaltene in a pure solvent // Chem. Eng. Sci. – 2001. – V. 56, No 24. – P. 6933–6939. – doi: 10.1016/S0009-2509(01)00337-2.
12. *Гордеев А.С., Гайнуллина Л.А., Шинкарев А.А.* Липиды пахотных почв, систематически загрязняемых поверхностным склоновым стоком с территории объектов нефтедобычи // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2014. – Т. 156, кн. 3. – С. 76–86.
13. Методические рекомендации по гигиеническому обоснованию ПДК химических веществ в почве (утв. МЗ СССР 5 авг. 1982 г., № 2609-82). – М., 1982.
14. *Speight J.S.* The chemistry and technology of petroleum. – Boca Raton: CRC Press, 2006. – 945 p.
15. *Uraizee F.A., Venosa A.D., Suidan M.T.* A model for diffusion controlled bioavailability of crude oil components // Biodegradation. – 1998. – V. 8, No 5. – P. 287–296.
16. *Pineda-Flores G., Boll-Arguello G., Lira-Galeana C., Mesta-Howard A.M.* A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source // Biodegradation. – 2004. – V. 15, No 3. – P.145–151.

Поступила в редакцию
14.07.15

Гордеев Александр Сергеевич – аспирант кафедры почвоведения, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.
E-mail: Drgor@mail.ru

Шинкарев Александр Александрович – доктор биологических наук, профессор кафедры почвоведения, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: *Ashinkar@mail.ru*

Несмелов Александр Александрович – кандидат биологических наук, научный сотрудник кафедры микробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: *Nesmelov@gmail.com*

Галиев Ринат Александрович – кандидат биологических наук, лаборант, ОАО «Казаньоргсинтез», г. Казань, Россия.

E-mail: *Galievr@mail.ru*

* * *

MORPHOLOGY OF MICROSTRUCTURES OF OIL COMPONENTS WITH INCREASED STABILITY AGAINST BIOLOGICAL DECOMPOSITION

A.S. Gordeev, A.A. Shinkarev, A.A. Nesmelov, R.A. Galiev

Abstract

The electron microscopy study of various types of oil-containing samples (soil polluted by stock-tank oil, low-density fraction ($< 1.4 \text{ g/cm}^3$) of the oily sludge after all stages of the technological scheme of phytoremediation, and arable chernozem exposed to regular pollution by overland runoff from the sites of operational oil wells) has been performed. The transmission electron microscopy has shown the presence of electron-opaque spatially structured organic formations with different morphologies and linear sizes.

Keywords: oil, pollution, arable soils, oily sludge, transmission electron microscopy.

References

1. Solntseva N.P. Oil Extraction and Geochemistry of Natural Landscapes. Moscow, Izd. Mosk. Univ., 1998. 376 p. (In Russian)
2. Mayachkina N.V., Chugunova M.V., Bakina L.G. Characteristics of oil biodegradation in soils of the Northwest of Russia. *Vestn. Nizhegorodskogo Gos. Univ.*, 2011, no. 5, pp. 110–116. (In Russian)
3. Kurakov A.V., Il'inskii V.V., Kotelevtsev S.V., Sadchikov A.P. Bioindication and Rehabilitation of Ecosystems Polluted by Oil. Moscow, Grafikon, 2006. 336 p. (In Russian)
4. Yakusheva O.I., Naumova R.P., Samol'yanov A.A., Kichigin V.N., Askarov I.I., Galukhin V.A., Nikonorova V.N., Galiev R.A. The method of oily sludge treatment from wastewater facilities of petrochemical plants and oil refineries. Patent RF no. 2329200, 2008. (In Russian)
5. Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2003, vol. 67, no. 4, pp. 503–549. doi: 10.1128/MMBR.67.4.503-549.2003.
6. Qian K., Edwards K.E., Siskin M., Olmstead W.N., Mennito A.S., Dechert G.J., Hoosain N.E. Desorption and ionization of heavy petroleum molecules and measurement of molecular weight distributions. *Energy Fuels*, 2007, vol. 21, no. 2, pp. 1042–1047. doi: 10.1021/ef060360t.
7. Schneider M.H., Andrews B., Mitra-Kirtley S., Mullins O.C. Asphaltene molecular size by fluorescence correlation spectroscopy. *Energy Fuels*, 2007, vol. 21, no. 5, pp. 2875–2882. doi: 10.1021/ef700216r.
8. Hsu C.S., Hendrickson C.L., Rodgers R.P., McKenna A.M., Marshall A.G. Petroleomics: advanced molecular probe for petroleum heavy ends. *J. Mass Spectrom.*, 2011, vol. 46, no. 4, pp. 337–343. doi: 10.1002/jms.1893.
9. Saraji S., Goual L., Piri M. Adsorption of asphaltenes in porous media under flow conditions. *Energy Fuels*, 2010, vol. 24, no. 11, pp. 6009–6017. doi: 10.1021/ef100881k.
10. Vasquez D., Mansoori G.A. Identification and measurement of petroleum precipitates. *J. Petrol. Sci. Eng.*, 2000, vol. 26, nos. 1–4, pp. 49–56. doi: 10.1016/S0920-4105(00)00020-6.

11. Priyanto S., Mansoori G.A., Suwono A. Measurement of property relationships of nano-structure micelles and coacervates of asphaltene in a pure solvent. *Chem. Eng. Sci.*, 2001, vol. 56, no. 26, pp. 6933–6939. doi: 10.1016/S0009-2509(01)00337-2.
12. Gordeev A.S., Gainullina L.A., Shinkarev A.A. Lipids in arable soils exposed to regular pollution by overland runoff from oil-production sites. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2014, vol. 156, no. 3, pp. 76–86. (In Russian)
13. Methodical Recommendations on Hygienic Substantiation of MPCs for Chemical Substances in Soil (Approved by the HM of the USSR on August 5, 1982, No. 2609-82). Moscow, 1982. (in Russian)
14. Speight J.S. The Chemistry and Technology of Petroleum. Boca Raton, CRC Press, 2006. 945 p.
15. Uraizee F.A., Venosa A.D., Suidan M.T. A model for diffusion controlled bioavailability of crude oil components. *Biodegradation*, 1998, vol. 8, no. 5, pp. 287–296.
16. Pineda-Flores G., Boll-Arguello G., Lira-Galeana C., Mesta-Howard A.M. A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source. *Biodegradation*, 2004, vol. 15, no. 3, pp. 145–151.

Received
July 14, 2015

Gordeev Aleksandr Sergeevich – PhD Student, Department of Soil Science, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: *Drgor@mail.ru*

Shinkarev Aleksandr Aleksandrovich – Doctor of Biology, Professor, Department of Soil Science, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: *Ashinkar@mail.ru*

Nesmelov Aleksandr Aleksandrovich – PhD in Biology, Research Fellow, Department of Microbiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: *Nesmelov@gmail.com*

Galiev Rinat Aleksandrovich – PhD in Biology, Laboratory Assistant, JSC Kazanorgsintez, Kazan, Russia.

E-mail: *Galievr@mail.ru*