

БИОПОВРЕЖДЕНИЯ ГОРЮЧЕ-СМАЗОЧНЫХ МАТЕРИАЛОВ В УСЛОВИЯХ СЕВЕРНЫХ РЕГИОНОВ

© 2010 Т.Д. Ямпольская, Т.В. Шахалай

Сургутский государственный университет Ханты-Мансийского автономного округа-Югры, г. Сургут

Поступила в редакцию 05.05.2010

Горюче-смазочные материалы, применяемые в условиях северных регионов, повреждаются преимущественно бактериальной микрофлорой, принадлежащей к родам: *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*. Сильнее всего подвержены бактериальному повреждению смеси гидравлических масел. Выявлены соответствия между семейством/родом бактериальной культуры и видом топлива, используемого микроорганизмами в качестве субстрата. Определено оптимальное время лабораторного эксперимента при изучении повреждения ГСМ бактериальными культурами.

Ключевые слова: *биоповреждения, горюче-смазочные материалы, гетеротрофная микрофлора*

Несмотря на современный уровень развития техники и технологий, проблема биоповреждений авиационных горюче-смазочных материалов не утратила своей актуальности. Наличие воды (0,01-0,02% и даже ее следов), минеральных загрязнений и благоприятная температура (от 3-15 до 35-40⁰С и выше) в нефтяных топливах дают возможность активно развиваться различным группам микроорганизмов [1]. Скорость и глубина микробиологического окисления нефтепродуктов зависят от их углеводородного состава. Известно, что углеводороды, имеющие линейное строение молекул, быстрее разрушаются, чем их разветвленные изомеры. Алифатические (парафиновые) углеводороды чаще менее биостойкие, чем ароматические, поэтому и топлива, содержащие в основном парафиновые углеводороды, могут разрушаться микроорганизмами быстрее, чем содержащие большее количество ароматических соединений. Среди различных видов нефтяных топлив более биостойкие – легкие дистилляционные топлива – бензины, менее стойкие керосины [1, 2].

Способность бактерий и микроскопических грибов усваивать углеводороды нефти является причиной возникновения серьезных проблем при хранении, транспортировке и, особенно, при применении нефтепродуктов в технике. Развитие микроорганизмов в топливе может приводить к нарушению работы датчиков топливоизмерительной и топливорегулирующей аппаратуры, засорению фильтров и других агрегатов топливной системы, повреждению внутренних защитных покрытий и коррозионным поражениям топливных емкостей и систем техники

[1, 3, 4]. В топливах, поврежденных микроорганизмами, образуется осадок или слизь, изменяются кислотность и другие показатели. Смазочные масла, жировые эмульсии приобретают не свойственный им запах, наблюдается снижение их вязкости, повышение кислотного числа, отмечаются случаи вспучивания и расслоения эмульсий. Однако наличие микроорганизмов в топливе не означает, что оно обязательно повреждено, так как его основные физико-химические показатели при этом, как правило, не изменяются [5, 6].

Цель работы – обнаружение микроорганизмов, повреждающих топлива, и изучение их способности использовать различные горюче-смазочные материалы в качестве единственного источника углерода и энергии.

Материалы и методы. В исследованиях использовали 5 видов горюче-смазочных материалов (ГСМ): авиационный бензин (АБ) марки Б-91–115; автомобильный бензин марки АИ–95; смесь гидравлических масел (МГ) состава: 80% марки АМГ-10 (ГОСТ 6794-75) и 20% марки МГ «А» (ГОСТ 17479.3-85); дизельное топливо (ДТ) марки Л-45 (дизельное топливо-1, отобрано в аэропорту «Сургут», дизельное топливо-2 – в аэропорту «Нижневартовск»; авиационный керосин.

Обнаружение и выделение микроорганизмов, содержащихся в ГСМ, проводили с использованием микробиологических сред различного состава: разбавленном в 10 раз питательном бульоне и минеральной среде Таусона. Среды имели следующий состав: 1) питательный бульон (г/л): панкреатический гидролизат рыбной муки – 1,8; NaCl – 0,2; глюкоза – 2,0; 2) Таусона (г/л): Ca(NO₃)₂ × 4H₂O – 1,0; KNO₃ – 0,25; KH₂PO₄ – 0,25; MgSO₄ × 7H₂O – 0,25; FeSO₄ × 7H₂O – 0,005. Среды инокулировали топливами в 4 концентрациях – 1%, 2%, 5%, 10% по объему среды. Культивирование проводили с периодическим взбалтыванием. Количественный учет и

Ямпольская Татьяна Даниловна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии. E-mail: yampolska0105@mail.ru

Шахалай Татьяна Владимировна, студентка. E-mail: tani_86@mail.ru

последующее выделение микроорганизмов проводили чашечным методом на плотных средах того же состава. Идентификацию накопительных культур до рода, выделенных из ГСМ, проводили по культуральным и физиолого-биохимическим свойствам согласно Определителю бактерий Берджи (1997). Способность микроорганизмов использовать авиационные топлива и другие ГСМ в качестве единственного источника углерода выявляли в минеральной среде Таусона в качестве основы с добавкой стерильного топлива в двух концентрациях 0,1% и 0,01% по объему с инокуляцией данной смеси накопительными культурами выделенных изолятов с титром 1 млн.кл/мл, приготовленным по стандартам мутности. Активность роста бактериальных культур оценивалась по оптической плотности суспензии при длине волны 450 нм на фотозлектроколориметре.

Результаты и их обсуждение. Использование различных концентраций топлив и составов сред культивирования позволили определить оптимальный объем топлива для максимального выделения микроорганизмов, способных поражать данные субстраты. При использовании органической среды наиболее пригодными оказались низкие концентрации (1%) добавляемых топлив. Использование минеральной среды Таусона, наоборот, требует большего объема (5-10%) топлива. В этом случае источником углерода выступает исследуемый субстрат.

В исследованиях по обнаружению микроорганизмов в ГСМ выявлено, что максимальная обсемененность характерна для смеси гидравлических масел (ГМ), что свидетельствует о доступности различных источников углерода, содержащихся в ГМ. Численность микроорганизмов при разных концентрациях смеси масел варьировала в пределах 5,0-47,2 млн.кл/мл топлива. Присутствующая микрофлора ГМ представлена, в основном, бактериальными формами.

В итоге различные концентрации топлив позволили выделить гетеротрофные культуры наиболее часто встречающиеся/выделяющиеся

в/из ГСМ, принадлежащие к 6 родам: *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*. В частности, из дизельного топлива выделены изоляты культур: *Rhodococcus* sp.1, *Pseudomonas* sp.1, *Rhodococcus* sp.2, *Pseudomonas* sp.3, *Arthrobacter* sp.1; из гидравлического масла – *Pseudomonas* sp.2, *Nocardia* sp.1, *Enterococcus* sp.1; из бензина марки А-98 – *Pseudomonas* sp.4, *Pseudomonas* sp.5; из бензина марки Б-91/115 (отработки) – *Pseudomonas* sp.6, *Mycobacterium* sp.1; из авиационного керосина – *Arthrobacter* sp.2.

Способность микроорганизмов использовать авиационные топлива и другие ГСМ в качестве единственного источника углерода оценивали в лабораторных экспериментах с разным временем культивирования: 1) от 110 до 190 суток; 2) от 50 до 80 суток; 3) от 10 до 40 суток. Для постановки первого эксперимента использовались 5 образцов ГСМ: бензин отработка, авиационный керосин, дизельное топливо, гидравлическое масло, бензин А-98 и 5 гетеротрофных изолятов бактерий: *Pseudomonas* sp.1, *Pseudomonas* sp.2, *Pseudomonas* sp.3, *Rhodococcus* sp.2, *Nocardia* sp.1.

При добавке дизельного топлива и бензина-отработки выявлено, что динамика численности 2 изолятов *Pseudomonas* sp. 2 и *Pseudomonas* sp. 3 сходна: при концентрации 0,1%, как для дизельного топлива, так и бензина-отработки, пик численности приходится на 121 сутки эксперимента. Концентрация топлив 0,01% сдвигает максимально фиксируемую численность на окончание опыта. Также это характерно для всех изучаемых культур с добавкой дизельного топлива. Угасание активности роста к концу эксперимента наблюдается с добавкой бензина-отработки (0,01%) для изолятов *Pseudomonas* sp.1, *Rhodococcus* sp.2, *Nocardia* sp.1. Добавка авиационного керосина в качестве субстрата позволила выявить явных доминантов по численности среди испытываемых бактериальных культур. Наиболее активно авиационный керосин используется изолятами *Nocardia* sp.1 и *Rhodococcus* sp.2 (рис. 1).

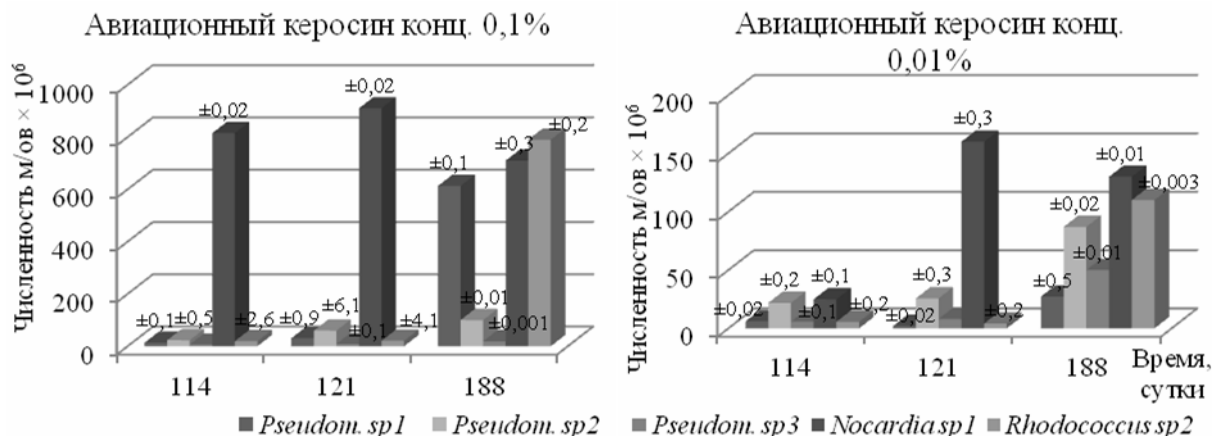


Рис. 1. Численность изолятов бактериальных культур за время длительного эксперимента при культивировании с авиационным керосином

Бензин марки А-98 активно используется изолятом *Rhodococcus* sp.2 и изолятами рода *Pseudomonas*. Пики численности фиксируются с начала снятия результатов. Изолят *Nocardia* sp.1 достигает максимальных значений только к концу. При добавлении гидравлического масла пик активности роста всех культур в обеих концентрациях приходится на 121 сутки эксперимента (рис. 2). Следует отметить, что при добавке гидравлического масла, зафиксированы максимальные значения численности изучаемых бактериальных культур: 2-5 млрд.кл./мл. По

результатам проводимого длительного эксперимента, можно заключить, что в авиационном керосине наиболее активно развиваются культуры родов *Nocardia* sp.1 и *Rhodococcus* sp.2. Наблюдается тенденция: большая численность микроорганизмов фиксируется при более высокой концентрации добавляемых топлив. Выделенные культуры *Pseudomonas* sp.2 и *Pseudomonas* sp.3 обладают сходными свойствами. При этом места их выделения различны: *Pseudomonas* sp.2 выделен из гидравлического масла, а *Pseudomonas* sp.3 – из дизельного топлива.

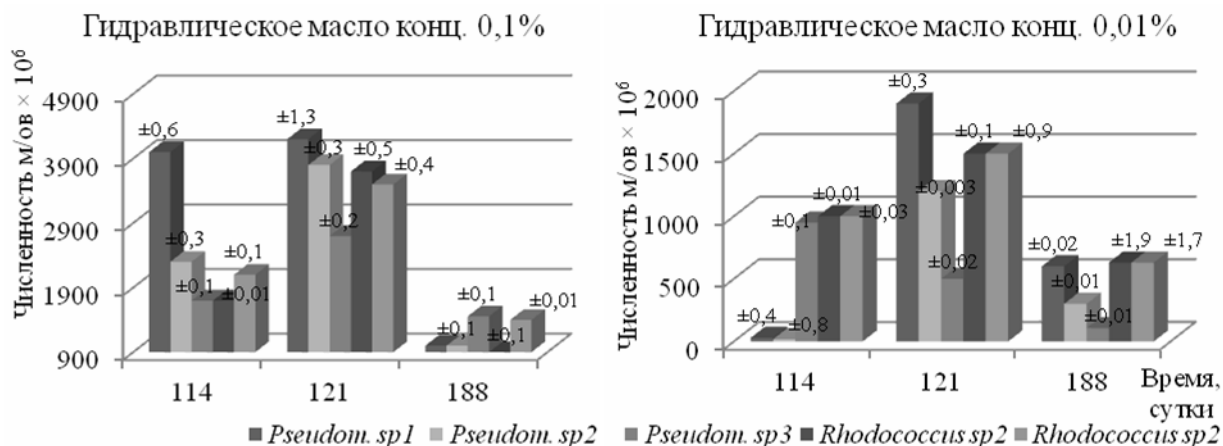


Рис. 2. Численность изолятов бактериальных культур за время длительного эксперимента при культивировании с гидравлическим маслом

Для постановки эксперимента №2 использованы четыре образца ГСМ: дизельное топливо-2, авиационный керосин, гидравлическое масло, бензин А-98 и 4 гетеротрофных изолята бактерий, принадлежащие к разным родам *Mycobacterium* sp.1, *Rhodococcus* sp.1, *Enterococcus* sp.1, *Pseudomonas* sp.4. Численность бактерий рода *Mycobacterium* sp.1 при культивировании с дизельным топливом-2 остается минимальной по сравнению с другими культурами на протяжении всего времени эксперимента. Наибольшую активность в лабораторном культивировании показали культуры родов *Enterococcus* sp.1 и *Rhodococcus* sp.1. Здесь значения численности составляют 800-950 млн.кл/мл. Внесение в среду культивирования авиационного керосина изменило картину численности бактериальных культур относительно изучаемых родов. Максимальная численность выявлена для *Rhodococcus* sp.1 и для *Pseudomonas* sp.4 в обеих концентрациях добавляемого топлива. Отмечено, что почти для всех родов наблюдается постепенное увеличение численности, достигая пиковых значений к окончанию эксперимента. Исключение составляет культура рода *Enterococcus* sp.1 при концентрации 0,01%, когда пик активности приходится уже на 65 сутки эксперимента, что может свидетельствовать о более быстрой адаптации к субстрату. Активность изолята *Mycobacterium*

sp.1 немного возрастает, но остается минимальной по сравнению с другими культурами. Гидравлическое масло, как субстрат для культивирования микроорганизмов, нарушает ранее выявленную тенденцию, что при большей концентрации добавляемого топлива фиксируется большая численность бактерий. Здесь наблюдается обратная взаимосвязь: меньшая концентрация – большая численность. В предыдущих 2 случаях (дизельное топливо-2 и авиационный керосин) тенденция сохраняется. Добавление гидравлического масла в среду культивирования выступило стимулирующим фактором для бактерий рода *Mycobacterium* sp.1: зафиксированы одни из наибольших значений по численности, которые характерны и для изолятов *Pseudomonas* sp.4 и *Rhodococcus* sp.1 (рис. 3).

При добавлении в среду культивирования бензина марки А-98 максимальная численность изучаемых изолятов достигается на 77-е сутки эксперимента, причем в обеих добавляемых концентрациях. Стабильные результаты, с постепенным нарастанием численности во времени, показывают культуры родов *Mycobacterium* sp.1 и *Enterococcus* sp.1. Также можно отметить, что численность изучаемых бактериальных культур в обеих концентрациях добавляемого бензина приблизительно одинаковые и достигают значений 580-940 млн.кл/мл.

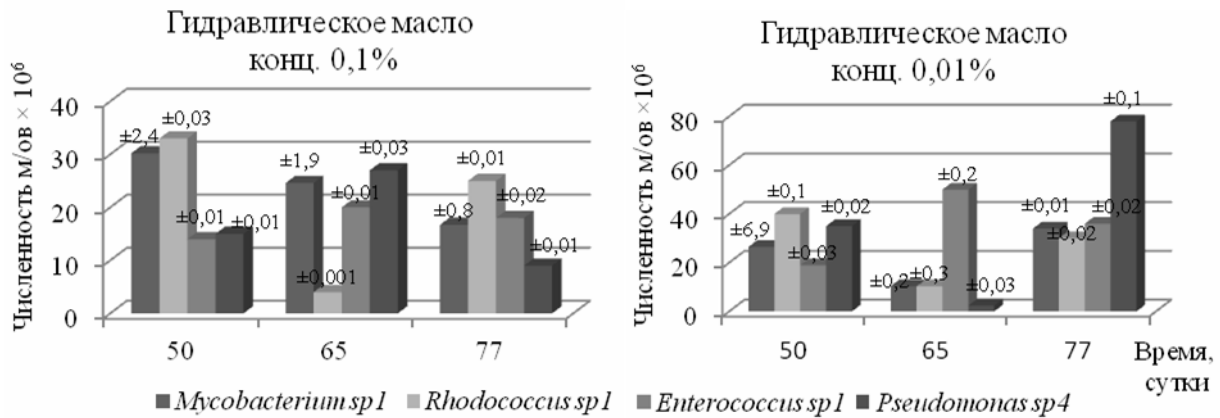


Рис. 3. Численность изолятов бактериальных культур за время эксперимента №2 при культивировании с гидравлическим маслом

Таким образом, выявлены определенные зависимости между семейством/родом бактериальной культуры и видом топлива, используемого микроорганизмами в качестве субстрата. Данные представлены в табл.1., где изоляты бактерий указаны в порядке уменьшения их активности. Следовательно, для культуры *Enterococcus*

sp.1 наиболее выгодным субстратом является дизельное топливо-2; для *Pseudomonas sp.4* – авиационный керосин. В гидравлическом масле наиболее активно развиваются микроорганизмы сем. *Mycobacteriaceae* (*Mycobacterium sp.1*) и в бензине марки А-98, – бактерии сем. *Nocardiaceae* (*Rhodococcus sp.1*).

Таблица 1. Активность бактериальных культур по отношению к видам топлив

Ряд	Дизельное топливо-2	Авиационный керосин	Гидравлическое масло	Бензин А-98
1.	<i>Enterococcus sp.1</i>	<i>Pseudomonas sp.4</i>	<i>Mycobacterium sp.1</i>	<i>Rhodococcus sp.1</i>
2.	<i>Rhodococcus sp.1</i>	<i>Rhodococcus sp.1</i>	<i>Pseudomonas sp.4</i>	<i>Mycobacterium sp.1</i>
3.	<i>Pseudomonas sp.4</i>	<i>Enterococcus sp.1</i>	<i>Rhodococcus sp.1</i>	<i>Enterococcus sp.1</i>
4.	<i>Mycobacterium sp.1</i>	<i>Mycobacterium sp.1</i>	<i>Enterococcus sp.1</i>	<i>Pseudomonas sp.4</i>

Для постановки третьего эксперимента использовались 5 образцов ГСМ: авиационный керосин, дизельное топливо-1, дизельное топливо-2, гидравлическое масло, бензин А-98 и выбрано 4 гетеротрофных изолята бактерий двух родов: *Arthrobacter sp.1*, *Arthrobacter sp.2* и *Pseudomonas sp.5*, *Pseudomonas sp.6*. Дизельное топливо-1 в концентрации 0,1% стимулирует рост изолята *Arthrobacter sp.2*, – численность резко повышается на 21-е сутки эксперимента. Другая культура этого же рода, *Arthrobacter sp.1*, показывает стабильные результаты в течение эксперимента и значения численности к окончанию эксперимента повышаются только в 2 раза. При концентрации 0,01%, наоборот, более активна культура *Arthrobacter sp.1*, чем *Arthrobacter sp.2*. Пик численности *Arthrobacter sp.1* наблюдается уже на 11-е сутки эксперимента. Для *Arthrobacter sp.2* зафиксированы стабильные результаты во времени. Сходная ситуация наблюдается и в изолятах рода *Pseudomonas*. Для *Pseudomonas sp.5* характерно постепенное повышение численности во времени в обеих концентрациях топлива. Для культуры *Pseudomonas sp.6* при концентрации 0,1% пик численности приходится на 38-сутки, а при 0,01% - на начало эксперимента (11 сутки). Численность всех культур при лабораторном культивировании с добавлением дизельного топлива-2

высокая, причем значения приблизительно одинаковые в обеих добавляемых концентрациях. Это свидетельствует о доступности микроорганизмам данного топлива как субстрата.

В среде с авиационным керосином (0,1%) изоляты родов *Arthrobacter* к концу эксперимента показали резкий подъем активности. Для изолятов рода *Pseudomonas* численность незначительно изменилась на протяжении эксперимента (рис. 4). При концентрации 0,01% прослеживается постепенное увеличение численности с течением времени. Также, следует обратить внимание на численность при разных концентрациях авиационного керосина: при большей концентрации значения численности микроорганизмов выше.

В гидравлическом масле активность бактериальных культур увеличивается с течением времени, достигая максимальной численности в обеих концентрациях топлива на 38 сутки эксперимента (рис. 5). При этом численность микроорганизмов при концентрации гидравлического масла 0,01% не уступает таковой при его более высокой концентрации. Следует отметить значительно превышающую активность культур рода *Arthrobacter* при культивировании с гидравлическим маслом по сравнению с культурами рода *Pseudomonas*.

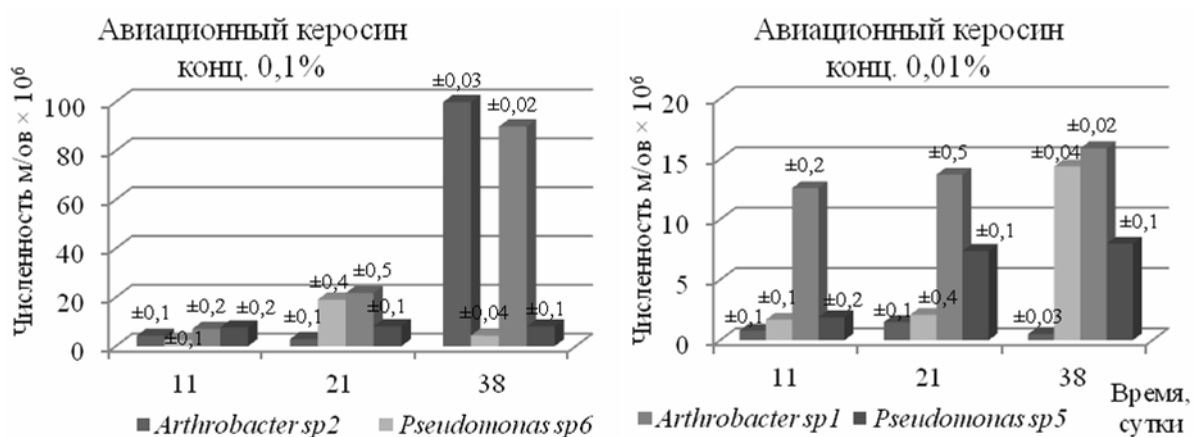


Рис. 4. Численность изолятов бактериальных культур за время эксперимента №3 при культивировании с авиационным керосином

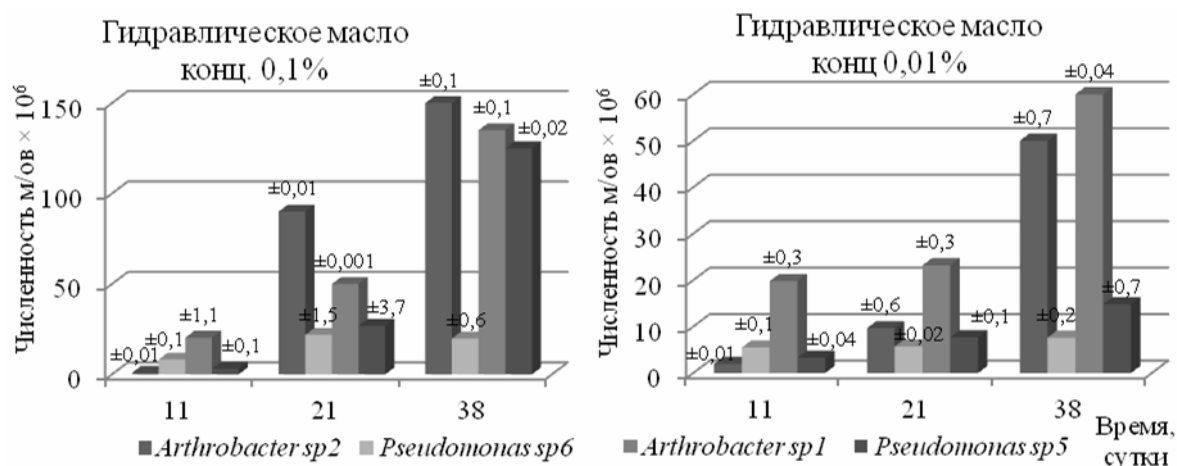


Рис. 5. Численность изолятов бактериальных культур за время эксперимента №3 при культивировании с гидравлическим маслом

Бензин марки А-98 оказался вполне пригодным для микроорганизмов субстратом. Наблюдается определенная динамика роста бактериальных культур, но численность остается одной из самых низких. Изоляты *Pseudomonas* sp.6 и *Arthrobacter* sp.2 в обеих концентрациях добавляемого топлива проявили пик своей активности на 38 сутки. Наиболее низкие значения численности при культивировании с бензином марки А-98 выявлены для культуры *Pseudomonas* sp.5.

Выводы:

1. В краткосрочном эксперименте на всех видах топлив наибольшая активность выявлена для культур *Arthrobacter* sp.1 и *Pseudomonas* sp.6; наименьшая, – для культуры *Pseudomonas* sp.5. Сопоставляя результаты трех временных экспериментов, мы сделали вывод, что краткосрочный эксперимент в пределах 50-60 суток культивирования при постановке исследований с горюче-смазочными материалами, является наиболее оптимальным. Проведя данные исследования можно заключить, что различные ГСМ, применяемые в условиях северных регионах,

чаще всего повреждаются бактериальной микрофлорой, принадлежащей к родам: *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*.

2. Показано, что все использованные хемогетеротрофные культуры имеют тенденцию роста (увеличение численности) в течение эксперимента, причём большая концентрация (0,1%) добавляемого топлива является причиной более высокой численности бактерий, т.е., исследованные культуры способны активно усваивать углерод топлив.

3. Учитывая активность культур и доступность для микроорганизмов углерода, ГСМ расположились в ряд (по убыванию): гидравлическое масло – дизельное топливо-2 – дизельное топливо-1 – бензин марки А-98 – авиационный керосин. Таким образом, гетеротрофные бактериальные культуры наиболее активно используют углеводороды/углерод гидравлического масла и наименее, – авиационного керосина, что может быть связано с более высокой степенью очистки керосина и применяемых в нем присадок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Ильчев, В.Д.* Биоповреждения: учеб. пособие для биолог. спец. / отв. ред. *В. Д. Ильчев*. – М.: Высш. шк., 1987. – 352 с.
2. Бициды [Электронный ресурс] / М., 2007. – Режим доступа: <http://biocides.ru/page/604898>. – Загл. с экрана.
3. *Авакян, З.А.* Защита нефтепродуктов от биологического разрушения // Прикладная биохимия и микробиология. –1975.–Т. 11, № 4.– С. 526-534.
4. *Михайлова, Л.К.* Биозасорение нефтяных дистиллятных топлив в условиях их хранения и применения на технике: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.24 / Л.К. Михайлова; МГУ им. М.В. Ломоносова, 1989. – 27 с.
5. *Михайлова, Л.К.* Биоповреждения нефтяных топлив в эксплуатационных условиях / *Л.К. Михайлова* и др. // Биохимические основы защиты промышленных материалов от биоповреждений: межвуз. сб. – Горький: Горьк. Гос. Ун-т, 1987. – С. 57–63.
6. *Скрибаличин, В.Б.* О биоповреждениях топлив / *В.Б. Скрибаличин* и др. // Химия и технология топлив и масел. – 1983. – № 12. – С. 29-30.

**BIODAMAGES OF COMBUSTIVE-LUBRICATING MATERIALS
IN THE CONDITIONS OF NORTHERN REGIONS**

© 2010 T.D. Yampolskaya, T.V. Shakhlay

Surgut State University of Khanty-Mansi Autonomous Okrug-Ugra, Surgut

Fuels and lubricants which used in northern regions, are damaged by mainly bacterial microflora belonging to the genera: *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*. Are most strongly subject to bacterial damage of a mix of hydraulic oils. The dependence between the family/genus of bacterial culture and the type of fuel used by microorganisms as a substrate. The optimal time of the laboratory experiment to study damage fuel bacterial cultures.

Key words: *biodamage, lubricants, heterotrophic microflora*