

Л. ОСНИЦКАЯ

## ОКИСЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ НАФТЕНОВЫХ КИСЛОТ И НАФТЕНОВЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ

(Представлено академиком Б. Л. Исаченко 18 III 1947)

Установлена, как известно, возможность бактериального окисления самых разнообразных углеводов парафинового и ароматического рядов (3,4). Но в течение длительного времени оставались безуспешными попытки вызвать бактериальное разрушение нафтеновых кислот и нафтеновых углеводов, являющихся неперменной и весьма значительной по удельному весу составной частью нефтей и смазочных масел и по своему строению и свойствам относящихся к соединениям, наиболее устойчивым к химическим и биохимическим превращениям.

В течение некоторого времени существовала теория „ядовитости“ нафтенных и их кислородных производных для животных и микроорганизмов (6,7). Вместе с тем удавалось наблюдать развитие бактерий на средах, содержащих, наряду с другими углеводородами, нафтеновые углеводороды (4,5,8,9) и нафтеновые кислоты (1). В 1940 г. впервые на синтетической среде с нафтеновой кислотой в качестве единственного источника углерода было получено развитие смешанной культуры микроорганизмов (2). Позднее были проведены более обстоятельные исследования по этому вопросу, результаты которых приводятся ниже.

Для выявления культур микроорганизмов, способных использовать нафтеновые углеводороды и нафтеновые кислоты, исследовались образцы, полученные из следующих источников:

- 1) породы, взятые с разных глубин Краснокамского, Ставропольского и Бакинского нефтяных месторождений;
- 2) нафталанская нефть;
- 3) сточные воды и активный ил Люблинской очистительной станции;
- 4) почвы, взятые вблизи Люберецкого нефтехранилища и крекингового завода и из оранжерей.

Выбранная в результате сравнительных опытов минеральная среда имела следующий состав: 1000 см<sup>3</sup> воды дистиллированной, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 г, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0 г, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 г, MgSO<sub>4</sub> 0,2 г, CaCl<sub>2</sub> 0,02 г, FeCl<sub>3</sub> и MnSO<sub>4</sub> следы.

Среда разливалась по колбам Эрленмейера так, чтобы толщина слоя была 1,5—2 см, и стерилизовалась при 1 атм. В качестве единственного источника углерода и энергии в минеральную среду добавлялись следующие нафтеновые кислоты и нафтеновые углеводороды:

- 1) очищенные нафтеновые кислоты, т. кип. 195° С/12 мм, кислотное число 174,24,  $n_D^{20}=1,4735$ ;
- 2) сырые нафтеновые кислоты, кислотное число 224,  $n_D^{20}=1,4545$ ;
- 3) циклогексан, т. кип. 81° С,  $d_4^{20}=0,778$ ;

4) диметилциклогексан, т. кип. 120—124° С,  $d_4^{20}=0,8827$ ,  $n_D^{20}=1,4285$ ;  
 5) этилциклогексан, т. кип. 129,5—130° С/738 мм,  $d_4^{20}=0,7841$ ,  
 $n_D^{20}=1,4343$ .

6) дициклогексил, т. кип. 143—144° С/26 мм,  $d_4^{20}=0,8827$ ,  $n_D^{20}=1,4800$ .

Нафтеновые кислоты вносились или непосредственно на поверхность минеральной среды или в виде водно-растворимых солей. Нафтеновые углеводороды вводились под стеклянный колпак, плотно притертый к нижней поверхности для предохранения от улетучивания углеводородов. Опытные колбы выдерживались в атмосфере, насыщененной парами того или иного углеводорода.

Опыты проводились при температуре 28—30° С. Показателями роста служили помутнение среды, образование пленки, исчезновение или изменение внешнего вида нафтенового углеводорода. В результате проведенных качественных опытов из образцов нафталанской нефти, активного ила и сточных вод Люблинской очистительной станции и почвы, взятой около крекинг-завода, были получены смешанные культуры, развивающиеся на нафтеновых кислотах, диметилциклогексане и циклогексане. Из обогащенных многократными пересевами культуры производилось выделение чистых культур. Несмотря на все попытки, выделить чистую культуру бактерий, разрушающих диметилциклогексан и циклогексан, пока не удалось. После большого числа пересевов с жидкой среды на твердую (МПА, гель) и

Таблица 1

	Количество нафт. кислоты				Анализ нафт. кислоты			Анализ среды		
	дано в опыт, г	осталось, г	разрушено		кисл. число	иодн. число	показ. преломления	кислоты	альдегиды	спирты
			в г	в %						
Опыт № 1, 15 дней	0,6422	0,0518	0,5904	91	170	10	1,4748	—	—	—
Опыт № 3, 15 дней	0,4474	0,1580	0,2894	64	166	0	1,4825	—	—	—
Не зараж. контроль, 15 дней	0,4728	0,4630	0,0098	2,0	178	0	1,4790	—	—	—
Исходная нафт. кислота . . . . .	—	—	—	—	174	0	1,4735	—	—	—

обратно удалось, однако, выделить чистую культуру микроорганизмов, окислявших нафтеную кислоту.

В чистой культуре развивалась маленькая бесспорная палочка с закругленными концами, грам-отрицательная; культурные особенности ее изучены. В отличие от смешанной культуры чистая культура почти не образует мути в среде и бактерии развиваются в основном вокруг капелек нафтенной кислоты на поверхности, образуя хлопья, видимые простым глазом.

С чистой культурой были проведены количественные опыты. Извлечение непрореагировавшей нафтенной кислоты производилось многократным экстрагированием бензолом; экстракт очищался с помощью насыщенного раствора  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; бензол отгонялся в вакууме, а нафтенная кислота сушилась в вакууме над  $\text{H}_2\text{SO}_4$  до постоянного веса. В нафтенной кислоте определялись кислотное и иодное числа, показатель преломления. В среде производились поиски кислот, альдегидов и спиртов.

Из табл. 1 видно, что до 90% нафтенной кислоты может быть разрушено бактериями за 15 дней. При этом извлеченная остаточная

нафтеновая кислота весьма слабо отличается по своим показателям от исходной нафтеновой кислоты и от контрольного опыта. Судя по незначительному снижению кислотного числа с 174 до 162, можно говорить лишь об едва заметной примеси декарбоксилированных продуктов. То же можно сказать о непредельных соединениях, которые, по всей видимости, не успевали накапливаться и давать колебания в иодных числах. В среде не было обнаружено ни кислот, ни спиртов, ни альдегидов.

Таким образом, можно высказать предположение, что процесс разрушения нафтеновых кислот протекает энергично с быстрым окислением промежуточных продуктов до углекислого газа и воды.

Институт микробиологии  
Академии Наук СССР

Поступило  
18 III 1947

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Б. Л. Исаченко, Сб., посвящ. В. Л. Комарову, 1939. <sup>2</sup> Л. Осницкая Микробиология, 11, 3 (1942). <sup>3</sup> Л. Осницкая, Микробиология, 15, 3 (1946).  
<sup>4</sup> В. О. Таусон, Нефт. хоз-во, № 2, 220 (1928). <sup>5</sup> L. Bushnell and H. Haas, J. Bact., 41, 653 (1941). <sup>6</sup> R. Charitschkow, Z. angew. Chem., 31, 737 (1899).  
<sup>7</sup> J. Kupz is, Pharm. Centralb., No. 16, 13 (1902). <sup>8</sup> R. W. Stone, M. K. Fenske and A. G. G. White, J. Bact., 44, No. 2 (1942). <sup>9</sup> Cl. E. Zobell, C. Grant and H. Haas, Bull. Amer. Petr. Geol., 27, No. 9 (1943).