

На правах рукописи



Беляков Андрей Юрьевич

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ БУРОВЫХ ШЛАМОВ И ЭКОЛОГО-  
ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ НИХ  
МИКРООРГАНИЗМОВ

03.02.08 – экология (биологические науки)

03.02.03 – микробиология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Саратов – 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» на кафедре биохимии и биофизики

Научный руководитель: **Плешакова Екатерина Владимировна**  
доктор биологических наук, доцент  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»,  
профессор кафедры биохимии и биофизики

Официальные оппоненты: **Рогачева Светлана Михайловна**  
доктор биологических наук, профессор  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.»,  
заведующая кафедрой природной и техносферной безопасности»

**Попов Юрий Алексеевич**  
доктор биологических наук, профессор  
Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»»,  
заведующий отделом образовательных программ и подготовки специалистов

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Уфимского научного центра Российской академии наук, г.Уфа

Защита состоится « » 2014 г. в часов на заседании диссертационного совета Д.212.243.13 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, V уч. корпус.  
E-mail: [biosovet@sgu.ru](mailto:biosovet@sgu.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич и на сайте <http://www.sgu.ru/research/dissertation-council/d-212-243-13> ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Автореферат разослан « » \_\_\_\_\_ 20 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



С.А. Невский

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Бурение любой нефтяной и газовой скважины сопровождается применением буровых растворов, состоящих из химических реагентов и материалов различной степени экологической опасности (Герасимова, 2008; Исламов, 2011; Veil, 2013).

В настоящее время в процессе нефтедобычи при бурении, и особенно при заканчивании скважин, широкое распространение получили буровые растворы на углеводородной основе (РУО), в частности, инвертно-эмульсионные растворы (ИЭР) (Соловьев, 2003), в состав которых входит углеводородная дисперсионная среда и водная дисперсионная фаза. Это связано с их уникальными физико-химическими свойствами, высокой эффективностью и рядом преимуществ перед буровыми растворами на водной основе (Сушкова, 2005; Янг, Рамсес, 2006). Более широкому применению РУО препятствуют экологические проблемы, связанные с образованием в ходе бурения высокотоксичных буровых шламов (БШ), пропитанных компонентами, входящими в состав РУО, среди которых основными токсикантами являются углеводороды и поверхностно-активные вещества (ПАВ) (Балаба, 2004; Curtis, 2013). РУО в основном используют на морских проектах, поэтому существуют данные о токсическом действии этих растворов на водные организмы (Рыбина, 2004; Venka-Coker, Olumagin, 1995). Однако в последние годы доля применения РУО при строительстве скважин на суше сильно растет. В этом случае негативное влияние буровые растворы оказывают уже на почву, нарушая ее состав, свойства и плодородие. В то же время, проблема токсического действия РУО и их компонентов на почву недостаточно изучена.

Существующие технологии обезвреживания буровых отходов являются дорогостоящими, энерго- и трудозатратными, не всегда способствуют образованию экологически безопасных соединений (Абалаков и др., 2003; Морозов и др., 2004; Любин и др., 2009; Jerry, 2008). В связи с этим, актуальным является возможность использования микроорганизмов-деструкторов, способных расти и проявлять активную биохимическую деятельность в условиях комплексного загрязнения, в среде с высоким содержанием углеводородов, ПАВ и полимерных добавок, способных к биодеструкции этих веществ. Считается, что данный способ обезвреживания буровых отходов обеспечивает наиболее полное, экологически безопасное и экономически обоснованное восстановление загрязненных буровыми отходами биоценозов (Ягафарова и др., 1998).

В то же время, использование биотехнологического метода для детоксикации БШ ограничивается многокомпонентным составом пропитывающих их буровых растворов (Соловьев, 2003) в связи с известным синергическим действием ряда ксенобиотиков (Терехова, 2010; Тазетдинова и др., 2013), наличием в шламах тяжелых металлов (ТМ), являющихся опасными экотоксикантами, а также экстремальными экологическими условиями для микроорганизмов-деструкторов, которые характерны для такого комплексного загрязнения. Прежде всего, это повышенная щелочность шламов (рН более 8), связанная с присутствием в их составе извести и каустической соды (Рязанов, 2005), и повышенная минерализация (до 15%), обусловленная как использованием солей в составе буровых растворов, так и разбуриванием соленых отложений (Булатов и др., 1999).

В связи с вышесказанным, актуален поиск новых штаммов бактерий для утилизации отходов бурения, устойчивых к условиям комплексного токсического воздействия компонентов БШ и, в тоже время, способных обеспечить значительную степень детоксикации реагентов, входящих в состав РУО.

Цель диссертационной работы – охарактеризовать степень токсического действия на почву буровых растворов на углеводородной основе и их компонентов, оценить деструктивный и адаптационный потенциал микроорганизмов, выделенных из буровых шламов.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Исследовать влияние на почвенную биоту инвертно-эмульсионных буровых растворов, дисперсионных сред и основных компонентов, входящих в их состав, с помощью различных приемов биотестирования.
2. Изучить состав микробиологических сообществ буровых шламов. Идентифицировать выделенные из них бактерии и оценить их способность к деградации нефтяных углеводородов.
3. Исследовать эколого-функциональные свойства у выделенных микроорганизмов, оценивая их поверхностно-активные свойства, алкало- и галотолерантность, устойчивость к действию тяжелых металлов.
4. У отобранных микроорганизмов, наиболее перспективных для утилизации буровых шламов, определить экологическую безопасность, конкурентную способность, сравнить степень деструкции нефти модельными ассоциациями бактерий и составляющими их штаммами в нормальных и экстремальных условиях.

Научная новизна. С помощью комплексного биотестирования впервые показано высокое токсическое воздействие на почву инвертно-эмульсионных буровых растворов и их компонентов, обусловленное комбинированным эффектом. Выявлены реагенты с максимальным (нефть, дизельное топливо, ПАВ, хлориды) и минимальным токсическим действием (минеральное масло, известь, барит).

Установлено доминирование углеводородокисляющей микрофлоры в буровых шламах. Из микробных сообществ, существующих в экстремальных условиях буровых шламов, выделено и изучено 7 новых штаммов бактерий, идентифицированные как: *Halomonas* sp. ОБР 1, *Bacillus firmus* ОБР 1.1, *B. firmus* ОБР 3.1, *Solibacillus silvestris* ОБР 3.2, *B. circulans* ОБР 3.3, *B. circulans* НШ и *Erwinia rhapontici* ОБР 4.1 с уникальным сочетанием эколого-функциональных свойств. Для них характерны: широкий субстратный спектр в отношении нефтяных углеводородов разной степени токсичности, высокая эмульгирующая (экзогенная и эндогенная) и деструктивная активность по отношению к нефти, полирезистентность к тяжелым металлам, алкало- и галотолерантность. Среди исследованных культур обнаружены штаммы, способные к росту в экстремальных условиях: *B. firmus* ОБР 1.1 (рН 7-9), *B. circulans* НШ (рН 7-10; 15% NaCl), *S. silvestris* ОБР 3.2 (15% NaCl; высокие концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  (189 мг/л) и  $\text{Cd}^{2+}$  (61 мг/л)).

Впервые продемонстрировано, что бактерии *B. circulans* НШ и *S. silvestris* ОБР 3.2 эффективно деградируют нефтяные углеводороды не только самостоятельно, но и в ассоциации с нефтеокисляющим микроорганизмом *Dietzia maris* АМЗ.

Эффективность деструкции нефти ассоциацией: *B. circulans* НШ + *D. maris* АМЗ выше, чем монокультурой.

Теоретическая и практическая значимость работы. Апробированный в работе комплекс биотест-организмов, состоящий из высших растений, микроорганизмов и почвенных беспозвоночных, может быть использован для экотоксикологической оценки почв, загрязненных буровыми отходами. Результаты биотестирования позволяют рекомендовать использование минерального масла в качестве углеводородной основы инвертно-эмульсионных буровых растворов как наименее токсичной дисперсионной среды.

Полученные оригинальные данные о микробиологическом составе буровых шламов можно применять при разработке биоремедиационных технологий, используя буровые шламы в качестве источника выделения и селекции микроорганизмов-деструкторов основных компонентов буровых отходов.

Создана коллекция штаммов-деструкторов углеводов: *Halomonas* sp. ОБР 1, *B. firmus* ОБР 1.1, *B. firmus* ОБР 3.1, *S. silvestris* ОБР 3.2, *B. circulans* ОБР 3.3, *B. circulans* НШ. Высокая конкурентоспособность, углеводородокисляющая активность и широкий адаптационный потенциал свидетельствует о возможности использования данных бактерий, а также модельной ассоциации: *B. circulans* НШ + *D. maris* АМЗ в технологиях микробной утилизации буровых шламов.

Апробация работы. Основные результаты и положения работы докладывались на научных конференциях: Международном молодежном научном форуме «ЛОМОНОСОВ-2012» (Москва, 2012); VI Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2012); XIII Всероссийской научной конференции студентов, аспирантов и молодых специалистов «Геологи XXI века» (Саратов, 2012); Международной конференции «Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред» (Москва, 2013); V Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2013); 10 Международном молодежном экологическом форуме стран Балтийского региона «Экобалтика» (Санкт-Петербург, 2013); Всероссийской научно-практической конференции «Геологические науки – 2014» (Саратов, 2014).

Личный вклад автора. Экспериментальные данные, на основе которых сформулированы положения и выводы, представленные к защите, получены лично автором. Соискатель принимал непосредственное участие в постановке задач исследования, подготовке и проведении экспериментальных работ, обработке и обсуждении полученных результатов, подготовке публикаций.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ, из которых 4 в печатных изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 170 страницах машинописного текста; содержит 12 таблиц и 23 рисунка; состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 299 источников, в том числе 87 зарубежных авторов, и приложения на 3-х страницах.

Диссертационная работа выполнена на кафедре биохимии и биофизики СГУ. Идентификация бактерий по последовательности гена 16S рНК выполнена во Всероссийском научно-исследовательском институте сельскохозяйственной биотехнологии (г. Москва).

Благодарности. Выражаю искреннюю благодарность научному руководителю – профессору кафедры биохимии и биофизики СГУ д.б.н., доценту Плешаковой Е.В., всем сотрудникам кафедры биохимии и биофизики СГУ, а также сотруднику ИБФРМ РАН к.б.н. Чернышевой М.П. за помощь в проведении газовой хроматографии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Высокий уровень токсического действия на почву буровых растворов на углеводородной основе обусловлен токсичностью их дисперсионных сред (нефть, дизельное топливо) и компонентов дисперсионной фазы (ПАВ и хлориды), а также комбинированным действием реагентов, входящих в их состав.
2. В микробных сообществах буровых шламов преобладают углеводородокисляющие бактерии. Выделенные из буровых шламов микроорганизмы идентифицированы как: *Bacillus circulans* НШ; *B. firmus* ОБР 1.1; *B. firmus* ОБР 3.1; *Solibacillus silvestris* 3.2, *B. circulans* ОБР 3.3, *Halomonas* sp. ОБР 1 и *Erwinia rhapontici* ОБР 4.1.
3. Для бактерий, выделенных из буровых шламов, характерны оригинальные эколого-функциональные свойства: широкий субстратный спектр в отношении нефтяных углеводородов разной степени токсичности, высокая экзогенная и эндогенная эмульгирующая активность по отношению к нефти, полирезистентность к тяжелым металлам, алкало- и галотолерантность.
4. В экстремальных экологических условиях бактерии *B. circulans* НШ и *S. silvestris* ОБР 3.2 могут эффективно осуществлять деградацию нефтяных углеводородов не только самостоятельно, но и в комбинации с нефтеокисляющим микроорганизмом *D. maris* АМЗ. Эффективность деструкции нефти ассоциацией: *B. circulans* НШ + *D. maris* АМЗ выше, чем монокультурой.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ГЛАВА 1. ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БУРОВЫХ ШЛАМОВ И СПОСОБЫ ИХ ДЕТОКСИКАЦИИ (обзор литературы)

В главе приводится обзор литературы, посвященный проблеме опасности для окружающей среды БШ, образующихся в ходе бурения нефтяных и газовых скважин. Рассмотрен их состав и токсичность отдельных компонентов, основные способы детоксикации БШ. Особое внимание уделено биологическим методам утилизации, выделены их преимущества и перспективы.

### ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроорганизмы выделяли из образцов БШ, отобранных в процессе строительства нефтяных скважин Восточной Сибири, особенностью которых являлась холодная геология продуктивных пластов, аномально низкие пластовые давления и высокое содержание NaCl. Образцы характеризовались повышенным значением pH (pH 9) и высокой степенью минерализации (15%). В работе также использовали нефтеокисляющий микроорганизм *Dietzia maris* АМЗ из коллекции почвенных свободноживущих и ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (г. Саратов).

При анализе микробных сообществ БШ использовали технику прямого посева и метод накопительного культивирования (Нетрусов и др., 2005), где в качестве селективного агента в среду добавляли модельные РУО: на основе минерального масла (БР 1) и на основе дизельного топлива (ДТ) (БР 2). Количество углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) оценивали на минеральной среде М9 с нефтью (Теппер и др., 1993); бактерий, гидролизующих крахмал, – на крахмало-аммиачной среде (Меремкулова и др., 2010); целлюлозоразрушающих микроорганизмов – на среде Гетчинсона (Зенова и др., 2002). Для учета численности бактерий-деструкторов неионогенных ПАВ (НПАВ) использовали метод К.А. Кука (1978), анионоактивных ПАВ (АПАВ) – метод К. Ohwada (Ротмистров и др., 1977).

Идентификацию изолированных из БШ бактерий проводили по результатам сравнительного анализа морфолого-культуральных и физиолого-биохимических признаков в соответствии с критериями, предложенными в руководстве «Определитель бактерий Берджи» (1997), а также согласно принципам молекулярного типирования по последовательности гена 16S рРНК во ВНИИСБ (г. Москва). Визуализацию клеток осуществляли методом сканирующей электронной микроскопии на просвечивающем электронном микроскопе MIRA/LMU (TESCAN, Чехия) с приставкой TEM.

Влияние pH (от 7 до 11) и NaCl (от 3,5 до 15%) на рост бактерий оценивали в МПБ, используя буферные растворы, согласно (Справочник биохимика..., 1991). Устойчивость бактерий к действию ТМ определяли визуально по росту культур на МПА с добавлением диапазона концентраций солей ТМ:  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{NiSO}_4$  и  $\text{FeSO}_4$ . Для оценки уровня индивидуальной металлоустойчивости бактерий рассчитывали минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) ионов каждого металла (Lambert, Pearson, 2000). Определение содержания ТМ в БШ проводили методом атомной абсорбции на спектрофотометре Квант-2АТ.

Экологическую совместимость бактерий изучали методом лунок и перекрестных посевов (Нетрусов и др., 2005). Гемолитическую активность микроорганизмов оценивали на кровяном агаре, лецитиназную – на желточно-солевом агаре (Методы общей бактериологии..., 1984). Определение антибиотикочувствительности бактерий проводили диско-диффузионным методом (Методические указания..., 2004). Вирулентность микроорганизмов изучали методом внутрибрюшинного заражения клинически здоровых беспородных самок белых крыс, оценивая количество летальных случаев в опытных группах (Лабинская и др., 2005).

Способность микроорганизмов использовать для роста РУО и его дисперсионные среды (нефтепродукты) определяли с помощью чашечного метода Мак-Кланга (Теппер и др., 1993); индивидуальные углеводороды – с помощью метода лунок (Егоров, 1983). Эмульгирующую активность микроорганизмов определяли методом Д. Купера с некоторыми модификациями (Cooper, Goldenberg, 1987). Для оценки показателя гидрофобности (ПГ) бактериальных клеток применяли метод Е.В. Серебряковой с соавт. (2002). Деструктивную активность бактерий определяли после 10 сут. культивирования в жидкой минеральной среде М9 с нефтью (0,4 и 1%), ДТ или минеральным маслом (0,4%) в качестве единственного источника углерода и энергии при различных значениях pH и содержании NaCl в

среде гравиметрическим методом (РД 52.18.647-2003; Методические указания..., 2003) и методом газовой хроматографии (Суржко и др., 1995; Другов, Родин, 2007).

В экспериментах по оценке влияния буровых растворов на почву (чернозем южный, суглинистый, отобранный в Саратовской области) использовали три модельных ИЭР с объемным соотношением углеводородная фаза/водная фаза (75:25). Дисперсионными средами являлись: минеральное масло И-20 (ИЭР 1), товарная нефть (ИЭР 2) и ДТ «Л» (ИЭР 3). Остальные реагенты, входящие в состав ИЭР, г/л: органобентонит – 4,6; сульфонол НП-3 – 22,8;  $BaSO_4$  – 645;  $Ca(OH)_2$  – 22,8;  $CaCl_2$  – 51,8. В почву вносили ИЭР и дисперсионные среды в концентрации 40 и 25 г/кг, соответственно, или компоненты дисперсионной фазы:  $BaSO_4$  – 25,8;  $Ca(OH)_2$  – 0,9;  $CaCl_2$  – 2,1; сульфонол – 0,9 г/кг. Токсичность почвы определяли через 1 и 30 сут. после загрязнения с помощью дождевых компостных червей «Старатель», анализируя их поведенческие реакции, выживаемость (Международный стандарт..., 1998) через 2 и 7 сут. экспозиции (кратковременное и субхроническое действие), в фитотесте на трехсуточных проростках редиса сорта «Заря», оценивая всхожесть семян в %; среднюю длину побега и корня в мм (Остроумов, 1990), по дегидрогеназной активности *D. maris* AM3 (Плешакова, 2010). Для проведения сравнительного анализа степени токсичности почвы использовали методику расчета индекса токсичности оцениваемого фактора (ИТФ) по Р.Р. Кабирову и др. (1997).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы Microsoft Excel 2010. Достоверность различий полученных результатов оценивали с использованием коэффициента Стьюдента ( $P > 0,95$ ).

### ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НА ПОЧВУ ИНВЕРТНО-ЭМУЛЬСИОННЫХ БУРОВЫХ РАСТВОРОВ, ДИСПЕРСИОННЫХ СРЕД И ОСНОВНЫХ КОМПОНЕНТОВ, ВХОДЯЩИХ В ИХ СОСТАВ

Для исследования мы выбрали наиболее опасные составляющие БШ, это ИЭР и их компоненты. Результаты биотестирования на дождевых червях «Старатель», проведенного сразу после внесения загрязнителей в почву, показали, что в почве с минеральным маслом выживаемость дождевых червей через 2 сут. экспозиции составила 100%, свидетельствуя об отсутствии острой токсичности почвы. В варианте с ИЭР 1, основой которого было минеральное масло, выживаемость червей «Старатель» составила 25%, с ДТ, нефтью и ИЭР с соответствующими дисперсионными средами от 0 до 10% (рисунок 1а), что указывало на острое токсическое воздействие данных реагентов. Такое ингибирующее действие наблюдалось и через 7 сут. инкубирования дождевых червей в почве. Среди исследованных компонентов дисперсионной фазы буровых растворов максимальное снижение выживаемости тест-организмов наблюдалось при загрязнении почвы сульфонолом, которая составила 70% (рисунок 1б). Через 7 сут. экспозиции выживаемость червей в почве с реагентами снизилась на 10-40%, доказывая усиление токсического эффекта исследованных веществ при более длительном воздействии.

Краткосрочное биотестирование (2 сут. экспозиции), осуществленное через 30 сут. после внесения поллютантов в почву, показало 100%-ную выживаемость тест-организмов в вариантах с минеральным маслом и ИЭР на его основе (рисунок 1а). В остальных образцах с ИЭР и их дисперсионными средами показатели выживаемости



не изменились по сравнению с тестированием, выполненным сразу после загрязнения почвы. В почве, загрязненной компонентами ИЭР выживаемость дождевых червей через 2 и 7 сут. экспозиции с известью и баритом составила 100%, сульфенолом – 80%,  $\text{CaCl}_2$  – была ниже, чем при первоначальном внесении (рисунок 1б). В образце с  $\text{CaCl}_2$  отмечено отсутствие у червей инстинкта переработки почвы, они обезвоживались, а затем погибали.

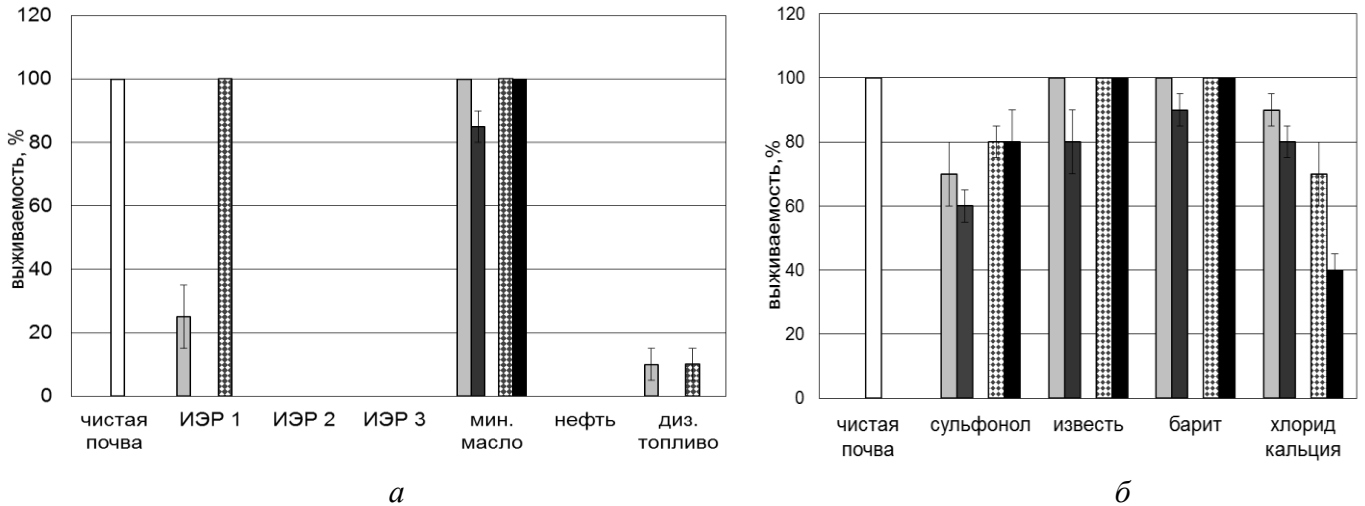


Рисунок 1 – Результаты вермитестирования почвы через 1 сут. после внесения загрязнителей (□ – 2 сут. экспозиции; ■ – 7 сут. экспозиции) и 30 сут. после внесения загрязнителей (▨ – 2 сут. экспозиции; ▩ – 7 сут. экспозиции): а – ИЭР и их дисперсионных сред; б – отдельных реагентов, входящих в состав ИЭР

Результаты фитотестирования показали, что всхожесть семян редиса после внесения в почву загрязнителей снизилась во всех вариантах, за исключением варианта с минеральным маслом. Всхожесть семян под влиянием ИЭР с нефтью в качестве дисперсионной среды, составляла всего 16% от контроля. В почве с сульфенолом через 1 сут. всхожесть была на 32% ниже, чем в контрольной почве, через 30 сут. разница с контролем составила 12%. В вариантах с остальными компонентами ИЭР через 30 сут. всхожесть семян редиса была ниже, чем в контрольном образце на 22-48%. Все исследованные дисперсионные среды и ИЭР после добавления их в почву в равной степени угнетали рост корней у проростков редиса: на 50-76%. Минимальное ингибирование корней наблюдалась в почве с ИЭР на основе минерального масла, максимальное – в почве с нефтью. Через 30 сут. в образцах почвы с ДТ и соответствующим ИЭР угнетение корней у проростков усилилось. Средняя длина корня заметно снизилась при внесении в почву отдельных компонентов ИЭР, этот показатель составлял 50 и 57% от контроля в почве с сульфенолом и  $\text{CaCl}_2$ . Показатели средней длины побега у проростков редиса в почве с ИЭР были в 2-3,6 раза ниже, чем в контрольной почве через 1 сут. после загрязнения. Максимальное ингибирование развития побегов отмечено в вариантах с ИЭР на основе нефти и минерального масла. Через 30 сут. ингибирующее воздействие на надземную часть проростков снизилось. Развитие побега в почве с отдельными компонентами ИЭР не угнеталось через 1 сут. эксперимента, через 30 сут. отмечено увеличение токсического эффекта в 1,5-3,8 раза.

В ходе оценки токсичности почвы, загрязненной ИЭР и их дисперсионными средами, по суммарной дегидрогеназной активности *D. maris* AM3 показано, что дисперсионные среды, внесенные в почву, не влияли на активность дегидрогеназ

тест-микроорганизма, а ИЭР снижали данный показатель на 18-30% по сравнению с чистой почвой (рисунок 2а). Наибольшее снижение наблюдалось в почве с ИЭР на основе ДТ, что соответствует известным данным о токсичности ДТ (Sikkema et al., 1995; Cunningham, Philp, 2000). Через 30 сут. активность дегидрогеназ *D. maris* AM3, снизилась во всех вариантах, особенно в почве с нефтью и ИЭР на ее основе: на 51 и 63% по сравнению с чистой почвой. Через 1 сут. после загрязнения почвы сульфенолом активность дегидрогеназ *D. maris* AM3 снизилась на 42% по сравнению с чистой почвой (рисунок 2б); через 30 сут. – в 2,6 раза, свидетельствуя об усилении токсичности. Все остальные реагенты, внесенные в почву, наоборот, оказывали стимулирующее действие на суммарную активность дегидрогеназ тест-организма через 1 сут. после загрязнения. Через 30 сут. данный показатель в вариантах с известью и баритом был сопоставим со значением в чистой почве, в образце с  $\text{CaCl}_2$  активность дегидрогеназ снизилась на 32%.

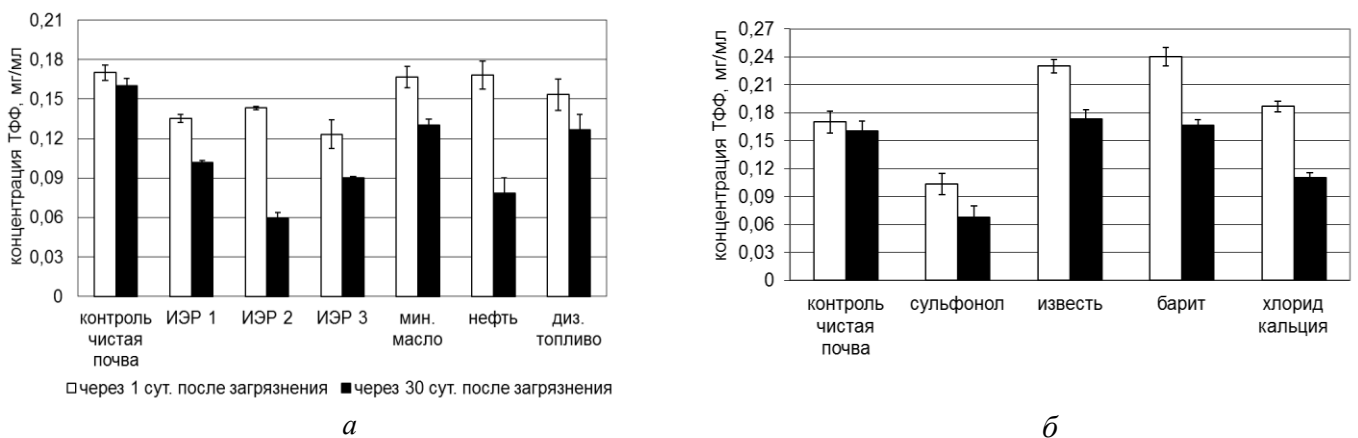


Рисунок 2 – Оценка токсичности почвы по дегидрогеназной активности *D. maris* AM3: а – с ИЭР и дисперсионными средами; б – с отдельными реагентами, входящими в состав ИЭР

Сравнение результатов, полученных с помощью трех приемов биотестирования, позволило рассчитать ИТФ. Были установлены сходные тенденции (таблица 1). Из исследованных дисперсионных сред минеральное масло оказалось наименее токсичным, загрязненная им почва не была токсичной для дождевых червей и оказывала слабое токсическое воздействие на ферменты бактерий. Исключением явилось значительное ингибирование корней проростков редиса в почве с минеральным маслом, что, скорее всего, связано с нарушением под влиянием этого загрязнителя агрофизических свойств почвы. Все исследованные буровые растворы, внесенные в почву, по всем показателям биотестов обладали высокой токсичностью, которая незначительно уменьшалась через 30 сут. ИЭР на основе нефти и ДТ были более токсичны по отношению к тест-организмам по сравнению с ИЭР на основе минерального масла. Полученные данные позволяют рекомендовать использование минерального масла как наименее токсичной дисперсионной среды ИЭР. Из компонентов дисперсионной фазы наименьшим токсическим действием при внесении их в почву обладали известь и барит. В первом случае, предположительно, из-за низкой концентрации извести, во втором, из-за достаточно низкой химической активности барита. Выраженный токсический эффект наблюдался при добавлении в почву  $\text{CaCl}_2$  и сульфенола.

Таблица 1 – Индексы токсичности проб почвы с различными загрязнителями, рассчитанные по результатам биотестов

Варианты почвы с загрязнителями	Экспозиция почвы после внесения загрязнителей, сут.	ИТФ по показателям тест-организмов					
		растений <i>Raphanus sativus</i>			бактерий <i>Dietzia maris</i> AM3	дождевых компостных червей «Старатель»	
		всхожесть	средняя длина корня	средняя длина побега	активность дегидрогеназ	выживаемость	
						через 2 сут.	через 7 сут.
ИЭР 1	1	0,85(4)	0,50(3)	0,27(2)	0,79(4)	0,2(2)	0,0(1)
	30	0,84(4)	0,55(3)	0,30(2)	0,58(3)	1,0(5)	0,0(1)
Минеральное масло	1	0,98(5)	0,33(2)	0,73(4)	0,97(5)	1,0(5)	0,83(4)
	30	0,91(5)	0,37(2)	0,93(4)	0,76(4)	1,0(5)	1,0(5)
ИЭР 2	1	0,15(2)	0,28(2)	0,32(2)	0,84(4)	0,0(1)	0,0(1)
	30	0,49(3)	0,40(2)	0,34(2)	0,34(2)	0,0(1)	0,0(1)
нефть	1	0,63(3)	0,23(2)	0,30(2)	0,98(5)	0,0(1)	0,0(1)
	30	0,68(3)	0,40(2)	0,38(2)	0,45(2)	0,0(1)	0,0(1)
ИЭР 3	1	0,52(3)	0,32(2)	0,48(2)	0,72(4)	0,0(1)	0,0(1)
	30	0,80(4)	0,10(2)	0,09(2)	0,52(3)	0,0(1)	0,0(1)
Дизельное топливо	1	0,78(4)	0,33(2)	0,84(4)	0,90(4)	0,10(2)	0,0(1)
	30	0,75(4)	0,41(2)	0,33(2)	0,76(4)	0,10(2)	0,0(1)
сульфонол	1	0,68(3)	0,50(3)	0,97(5)	0,60(3)	0,70(3)	0,60(3)
	30	0,87(3)	0,54(3)	0,42(2)	0,39(2)	0,80(4)	0,80(4)
CaCl <sub>2</sub>	1	0,84(4)	0,57(3)	0,82(4)	1,09(5)	0,90(4)	0,80(4)
	30	0,48(2)	0,37(2)	0,21(2)	0,64(3)	0,70(3)	0,40(2)
Ca(OH) <sub>2</sub>	1	0,84(4)	0,85(4)	0,98(5)	1,35(6)	1,0(5)	0,80(4)
	30	0,61(3)	0,56(3)	0,48(2)	1,01(5)	1,0(5)	1,0(5)
BaSO <sub>4</sub>	1	0,85(4)	0,81(4)	0,97(5)	1,41(6)	1,0(5)	0,9(4)
	30	0,76(4)	0,60(3)	0,64(3)	0,97(5)	1,0(5)	1,0(5)

Примечания: В скобках приведены значения степени токсичности почвы, соответствующие шкале токсичности: 6 – стимуляция: ИТФ >1,1; 5 – норма: ИТФ=0,91-1,10; 4 – низкая токсичность: ИТФ=0,71-0,90; 3 – средняя токсичность: ИТФ=0,5-0,7; 2 – высокая токсичность: ИТФ<0,5; 1 – сверхвысокая: ИТФ=0.

Как показало комплексное биотестирование, токсичность всех исследованных ИЭР была значительно выше, чем токсичность отдельных компонентов, входящих в их состав. Тремя способами биотестирования было доказано негативное влияние на почву исследованных ИЭР и их компонентов, а именно: нефтяных углеводородов, ПАВ и хлоридов, что требует разработки современных технологий обезвреживания БШ, а также технологий ремедиации почвы при загрязнении ее отходами бурения.

#### ГЛАВА 4. ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ ИЗ БУРОВЫХ ШЛАМОВ, ИХ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОЦЕНКА ДЕСТРУКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА

Для выявления микроорганизмов-деструкторов химических реагентов, входящих в состав буровых растворов, мы изучили микробные сообщества двух образцов БШ с высоким значением рН (рН 9) и степенью минерализации (15% NaCl). При прямом высеве бактерий общая численность гетеротрофных микроорганизмов в образцах БШ 1 и БШ 2 составила  $1,0 \times 10^3$  и  $8,9 \times 10^3$  кл/г (таблица 2).

Таблица 2 – Содержание микроорганизмов различных физиологических групп в буровых шламах

Образцы	Методы выделения микроорганизмов	Численность бактерий, кл/г(мл)		
		гетеротрофных	УОМ	гидролизующих крахмал
БШ 1	1. Прямой высев	$1,0 \times 10^3 \pm 0,30$	$<50 \pm 0,44$	$<50 \pm 0,00$
	2. Накопительное культивирование (+БР 1)	$2,8 \times 10^5 \pm 0,58$	$4,4 \times 10^4 \pm 0,22$	$<50 \pm 0,00$
	3. Накопительное культивирование (+БР 2)	$2,0 \times 10^4 \pm 0,22$	$1,1 \times 10^4 \pm 0,44$	$4,3 \times 10^2 \pm 0,42$
БШ 2	1. Прямой высев	$8,9 \times 10^3 \pm 0,38$	$6,1 \times 10^3 \pm 0,34$	$8,8 \times 10^2 \pm 0,46$
	2. Накопительное культивирование (+БР 1)	$1,4 \times 10^5 \pm 0,38$	$4,3 \times 10^4 \pm 0,45$	$6,9 \times 10^3 \pm 0,58$
	3. Накопительное культивирование (+БР 2)	$1,8 \times 10^5 \pm 0,40$	$1,6 \times 10^4 \pm 0,28$	$4,2 \times 10^3 \pm 0,52$

Примечание: «<50» означает, что при высеве бактерий из разведения 1:5 микроорганизмы соответствующих групп не обнаруживались.

В шламе БШ 2 содержалось: УОМ –  $6,1 \times 10^3$  кл/г и  $8,8 \times 10^2$  кл/г микроорганизмов, гидролизующих крахмал. При этом не обнаруживались микроорганизмы-деструкторы синтанола АЦСЭ-12, сульфонола НП-3 и карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ). Микробное сообщество БШ 1 не отличалось разнообразием, т.к. здесь не выявлялись в заметном количестве УОМ, деструкторы синтанола, сульфонола, КМЦ и крахмала. При выделении бактерий методом накопительного культивирования было показано, что добавление в среду селективных источников питания увеличило количество бактерий ряда вышеперечисленных групп по сравнению с прямым высевом микроорганизмов. В шламе БШ 1 общее содержание гетеротрофных бактерий возросло в 20 раз при культивировании его с буровым раствором на основе ДТ (БР 2) и значительно выше – на два порядка – с раствором на основе минерального масла (БР 1). Культивирование данного БШ с модельным раствором на основе ДТ способствовало увеличению

численности микроорганизмов, гидролизующих крахмал, при этом, добавление РУО на основе минерального масла не влияло на количество данной группы бактерий.

В образце БШ 2 общая численность гетеротрофных микроорганизмов, достигала значений  $10^5$  кл/мл при культивировании шлама с растворами БР 1 и БР 2; численность УОМ –  $10^4$  кл/мл, примерно в 10 раз увеличилось количество бактерий, гидролизующих крахмал. Оба РУО, использованных нами в качестве селективных агентов, в равной степени способствовали развитию разных групп микроорганизмов, содержащихся в шламе БШ 2, в отличие от образца БШ 1, где буровой раствор на основе минерального масла в большей степени стимулировал рост гетеротрофных бактерий и УОМ. Добавки в среду культивирования РУО не стимулировали развитие бактерий-деструкторов НПАВ, АПАВ и КМЦ в обоих образцах БШ, что может быть связано с достаточно низкой концентрацией этих реагентов в составе растворов или их токсичностью.

Из буровых шламов БШ 1 и БШ 2 изолировано 7 чистых микробных культур, которые по совокупности изученных культурально-морфологических, физиолого-биохимических признаков и результатов молекулярного типирования были идентифицированы нами, как: *B. circulans* НШ; *B. firmus* ОБР 1.1; *B. firmus* ОБР 3.1; *S. silvestris* ОБР 3.2, *B. circulans* ОБР 3.3, *Halomonas* sp. ОБР 1 и *E. rhapontici* ОБР 4.1.

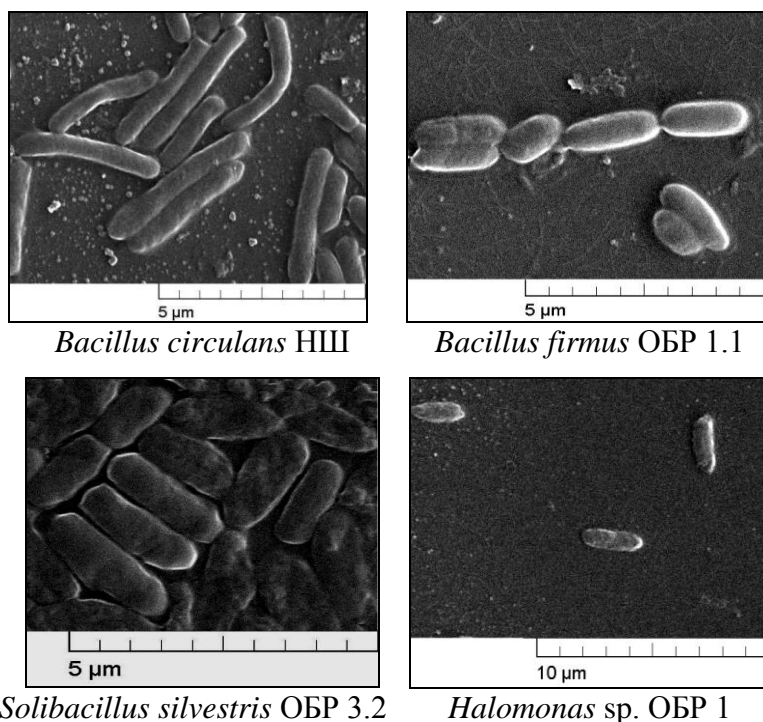


Рисунок 3 – Изображения клеток выделенных культур в возрасте 24 ч, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии

При изучении деструктивного потенциала выделенных микроорганизмов было показано, что большинство штаммов обладали способностью к росту на минеральной агаризованной среде, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии: буровой раствор на основе минерального масла, сырую нефть, вазелиновое масло, ДТ. На среде с *n*-алканами (гексан, гептан,

октан, декан, гексадекан) и ароматическими углеводородами (бензол, толуол, ксилол, кумол, нитробензол) микроорганизмы росли с различной интенсивностью. Несколько культур (*B. firmus* ОБР 1.1, *B. firmus* ОБР 3.1, *B. circulans* ОБР 3.3 и *B. circulans* НШ) активно использовали для роста все тестируемые нами нефтепродукты и индивидуальные углеводороды.

Было показано, что степень деструкции нефти (0,4%) бактериями составила 28-40% за 10 сут. культивирования в жидкой минеральной среде М9 (рисунок 4). Максимальная деструктивная активность по отношению к нефти наблюдалась у бактерий *B. firmus* ОБР 3.1 и *B. circulans* НШ (38%), а также у *Halomonas* sp. ОБР 1 –

40%. Деструктивная активность бактерий в отношении ДТ и минерального масла была меньше, предположительно, из-за ограниченной биодоступности этих нефтепродуктов для бактерий (Cunningham, Philp, 2000; Zanaroli et al., 2010). По отношению к ДТ деструктивную активность проявили *B. circulans* ОБР 3.3 и *B. circulans* НШ, которая составила 35,5 и 25%. Степень деградации минерального масла *B. firmus* ОБР 3.1 и *B. circulans* НШ составила 39 и 35%.

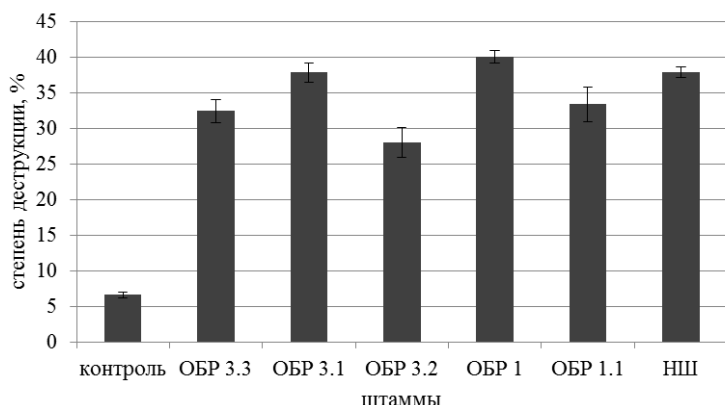


Рисунок 4 – Деструктивная активность бактерий по отношению к нефти через 10 сут. культивирования в жидкой среде (гравиметрический метод)

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что БШ представляют собой источник специализированных микроорганизмов, способных к разложению различных ксенобиотиков. При этом в микробных сообществах БШ доминируют УОМ. Широкий субстратный спектр в отношении нефтяных углеводородов, а также дисперсионных сред РУО, обнаруженный у выделенных бактерий, свидетельствует о перспективности использования таких микроорганизмов в технологиях микробной утилизации БШ.

## ГЛАВА 5. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БУРОВЫХ ШЛАМОВ

При разработке и применении биотехнологического метода обезвреживания отходов бурения следует учитывать многокомпонентный состав БШ, наличие в шламе ТМ – опасных экотоксикантов, а также высокое значение рН и высокую степень минерализации буровых отходов. В связи с этим, мы исследовали изолированные из БШ микроорганизмы не только на способность к деструкции компонентов БШ, но также на устойчивость к экстремальным условиям такого комплексного загрязнения.

Был изучен ПГ клеточной поверхности микроорганизмов при культивировании их на МПА и в жидкой минеральной среде с глицерином в качестве единственного источника углерода и энергии, учитывая, что данный показатель может изменяться при росте бактерий на углеводородных субстратах (Коломынцева и др., 2005; Волченко, 2006). ПГ клеточной поверхности у бактерий, относящихся к роду *Bacillus*, при культивировании их на МПА составлял от 23,7 до 36,8%, при выращивании их в среде с глицерином ПГ был значительно выше – 57,3-65,5% (таблица 3). ПГ у штамма *S. silvestris* ОБР 3.2 составил 18,7 и 66,2% при культивировании на МПА и в среде с глицерином. Низкие значения ПГ наблюдались у культур *Halomonas* sp. ОБР 1 и *E. rhapontici* ОБР 4.1.

Было показано, что все исследованные бактерии проявили высокую эмульгирующую активность по отношению к нефти (таблица 3). Эндогенная

активность через 24 ч составила у разных культур 55-97%, максимальная активность обнаруживалась у *B. firmus* ОБР 3.1, через 48 ч эмульгирующая активность составляла 56-90%. Экзогенная эмульгирующая активность через 24 ч составила 48-87%, через 48 ч – 40-85%.

Таблица 3 – Поверхностно-активные свойства бактерий, выделенных из буровых шламов

Бактерии	Показатель гидрофобности, %		Эмульгирующая активность по отношению к нефти, %			
	при росте на МПА	при росте в М9 с глицерином	эндогенная активность		экзогенная активность	
			Е <sub>24</sub>	Е <sub>48</sub>	Е <sub>24</sub>	Е <sub>48</sub>
<i>Halomonas</i> sp. ОБР 1	<1,0	<1,0	87±2,0	80±3,1	87±3,0	85±2,1
<i>B. firmus</i> ОБР 1.1	36,8±0,5	64,5±0,1	95±1,2	90±1,9	50±1,2	45±2,9
<i>B. firmus</i> ОБР 3.1	23,7±0,7	57,3±0,3	97±2,1	85±3,2	48±2,8	40±2,2
<i>S. silvestris</i> ОБР 3.2	18,7±0,7	66,2±0,3	90±2,8	80±3,2	65±3,5	55±2,2
<i>B. circulans</i> ОБР 3.3	33,3±0,1	65,5±0,3	70±2,1	70±2,9	62±2,1	50±3,9
<i>E. rhapontici</i> ОБР 4.1	<1,0	14,7±0,2	55±3,0	56±2,8	60±3,3	45±2,0
<i>B. circulans</i> НШ	34,5±0,2	61,3±0,3	70±2,3	65±1,1	62±1,4	62±2,1
<i>D. maris</i> АМЗ – контроль	84,2±0,1	85,5±0,1	42±2,8	40±0,7	45±3,5	40±1,7

Микробный штамм *Halomonas* sp. ОБР 1 отличался высокими показателями как экзогенной, так и эндогенной эмульгирующей активности по отношению к нефти. Эмульгирующая активность контрольного микроорганизма *D. maris* АМЗ была значительно ниже показателей эмульгирующей активности бактерий, выделенных из БШ. По отношению к ДТ все изученные культуры обнаружили сходную эндогенную и экзогенную эмульгирующую активность, порядка 40% через 24 и 48 ч, что было сравнимо с соответствующими показателями для *D. maris* АМЗ.

Проявленная бактериями высокая эмульгирующая активность в отношении нефтепродуктов, а также ПГ клеток бактерий, значительно увеличивающиеся при культивировании бактерий на гидрофобном источнике углерода, свидетельствуют о возможном синтезе ими биоПАВ. Уровень эмульгирующей активности супернатанта *Halomonas* sp. ОБР 1, *B. circulans* ОБР 3.3 и *B. circulans* НШ был близок к уровню эмульгирующей активности жидкой культуры, позволяет предположить, что данное свойство этих бактерий обеспечивается и внеклеточными биоПАВ.

Одним из определяющих условий использования микробиологического способа для детоксикации БШ является резистентность микроорганизмов-деструкторов к высоким концентрациям ТМ. Содержание ТМ в шламах, из которых были изолированы бактерии, было в пределах ПДК в почве и выше.

Обнаружено, что все исследованные микроорганизмы хорошо росли на среде с Ni<sup>2+</sup> (8-38 мг/л), Fe<sup>2+</sup> (7-37 мг/л) и Pb<sup>2+</sup> (25-375 мг/л), что свидетельствует о наличии перекрестной устойчивости бактерий к данным ТМ. При оценке уровня индивидуальной металлоустойчивости бактерий была определена МИК ионов каждого металла (таблица 4). Высокая концентрация Zn<sup>2+</sup> в среде (178 мг/л) ингибировала рост бактерий: *Halomonas* sp. ОБР 1 и *B. circulans* НШ, при этом низкие и средние концентрации Zn<sup>2+</sup> не угнетали рост этих микроорганизмов. Остальные бактерии хорошо росли при всех концентрациях Zn<sup>2+</sup> в среде. *S. silvestris* ОБР 3.2 отличался от других микроорганизмов отчетливым ростом на среде с повышенным

содержанием  $\text{Cu}^{2+}$  (142 и 189 мг/л) и  $\text{Cd}^{2+}$  (43 и 61 мг/л). Рост всех остальных бактерий при содержании в среде  $\text{Cu}^{2+}$  в количестве 94 и 142 мг/л ингибировался. Низкие концентрации  $\text{Cd}^{2+}$  в среде (12 и 24 мг/л) не влияли на рост изученных бактерий, а более высокие (43 и 61 мг/л) подавляли их рост, за исключением *S. silvestris* ОБР 3.2, *B. circulans* 3.1 и *B. circulans* НШ, которые были устойчивы к действию данного металла в различных дозах. Обнаруженная у исследованных бактерий полирезистентность к ТМ является их отличительным признаком, благодаря которому эти микроорганизмы смогут проявлять деструктивную активность в отношении нефтяных углеводородов в условиях повышенных концентраций комплекса ТМ, содержащихся в БШ.

Таблица 4 – Уровень металлоустойчивости бактерий

Штаммы	МИК ионов металлов, мг/л					
	$\text{Cu}^{2+}$	$\text{Pb}^{2+}$	$\text{Cd}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$	$\text{Ni}^{2+}$	$\text{Fe}^{2+}$
<i>Halomonas</i> sp. ОБР 1	142	>375	43	178	>38	>37
<i>B. firmus</i> ОБР 1.1	94	>375	43	>178	>38	>37
<i>B. firmus</i> ОБР 3.1	94	>375	>61	>178	>38	>37
<i>S. silvestris</i> ОБР 3.2	236	>375	>61	>178	>38	>37
<i>B. circulans</i> ОБР 3.3	94	>375	43	>178	>38	>37
<i>B. circulans</i> НШ	142	>375	>61	178	>38	>37
<i>D. maris</i> АМЗ	94	>375	43	178	>38	>37

У всех исследованных бактерий был обнаружен заметный рост в МПБ при рН 8 (таблица 5). Микробный штамм *B. circulans* НШ хорошо рос при рН 9 и 10, при рН 11 рост штамма был слабым. Штамм *B. firmus* ОБР 1.1 отличался значительным ростом при рН 9, при рН 10 и 11 его рост был слабым. Другие бактерии не обнаруживали способность к росту при значениях рН выше 8.

Таблица 5 – Оценка роста бактерий в МПБ при различных значениях рН и содержании NaCl

Микроорганизмы	Рост бактерий									
	рН					содержание NaCl, % по объему				
	7	8	9	10	11	3,5	6,5	10	12	15
<i>Halomonas</i> sp. ОБР 1	+++	+	-	-	-	++	++	++	+-	-
<i>B. firmus</i> ОБР 1.1	++	++	++	+-	+-	++	++	+	+-	+-
<i>B. firmus</i> ОБР 3.1	++	++	-	-	-	++	++	-	-	-
<i>S. silvestris</i> ОБР 3.2	++	+	-	-	-	++	++	++	++	++
<i>B. circulans</i> ОБР 3.3	+	+	-	-	-	++	++	+-	-	-
<i>B. circulans</i> НШ	+++	+++	++	++	+-	+++	+++	+++	+++	+++

Примечания: «-» – отсутствие роста; «+-» – небольшой осадок на дне; «+» – заметный осадок на дне; «++» – рост с помутнением среды и осадком на дне; «+++» – рост с помутнением среды, обильным осадком на дне и пленкой на поверхности.

Таким образом, микроорганизмы *B. firmus* ОБР 1.1 и *B. circulans* НШ устойчивы к повышенной щелочности среды. Данные микроорганизмы не являются строгими алкалофилами, т.к. при рН 7 наблюдался значительный прирост биомассы: у *B. firmus* ОБР 1.1 и *B. circulans* НШ в 2,5 раза. При значениях рН среды от 8 до 10 прироста биомассы у *B. circulans* НШ не обнаруживалось, однако концентрация бактериальных клеток сохранялась на повышенном уровне, только при рН 11 наблюдался лизис



клеток, у *B. firmus* ОБР 1.1 продолжался рост при pH 9, дальнейшее повышение pH негативно отражалось на жизнеспособности бактерии.

Установлено, что все исследованные микроорганизмы хорошо росли в МПБ с 3,5 и 6,5%-ным содержанием NaCl (таблица 5). При 10%-ной концентрации NaCl наблюдался заметный рост у 4-х микробных штаммов. *S. silvestris* ОБР 3.2 и *B. circulans* НШ характеризовались интенсивным ростом в питательной среде с 12 и 15%-ной концентрацией NaCl.

Таким образом, показано, что все выделенные нами из БШ бактерии обладают оригинальными эколого-функциональными свойствами, они характеризуются высокой эмульгирующей и деструктивной активностью по отношению к нефтепродуктам, полирезистентны к действию ТМ, а также адаптированы к условиям повышенной минерализации и щелочности среды.

Учитывая возможность использования выделенных нами бактерий для утилизации БШ, были проведены исследования, показавшие, что микроорганизмы *B. circulans* НШ, *B. firmus* ОБР 1.1, *B. firmus* ОБР 3.1, *S. silvestris* 3.2, *B. circulans* ОБР 3.3 и *Halomonas* sp. ОБР 1 не обладали лецитиназной и гемолитической активностью, что косвенно свидетельствовало об отсутствии патогенности у бактерий (Лабинская и др., 2005). Наблюдение за клиническим состоянием подопытных беспородных белых крыс показало, что все протестированные шесть культур не оказывали летального действия на животных. Обнаружено, что бактерии проявили высокую и среднюю степень чувствительности к антибиотикам разных групп (ампициллину, бензилпенициллину, стрептомицину, мономицину, эритромицину и тетрациклину).

С целью создания эффективных ассоциаций бактерий-деструкторов компонентов БШ была изучена конкурентная способность бактерий по отношению друг к другу и к нефтеокисляющему штамму *D. maris* АМЗ. Результаты свидетельствовали об отсутствии антагонистических взаимоотношений между бактериями. Одним из подходов к повышению эффективности биопрепаратов-нефтедеструкторов является переход от монокультур к полибактериальным препаратам (Карасева и др., 2012; Wenderoth et al., 2003). Поэтому мы сравнили степень деструкции нефти (1%) монокультурами в обычных (pH 7; 0,5% NaCl) и экстремальных условиях (pH 9; 15% NaCl) с эффективностью деструкции нефти смешанными культурами. Степень деструкции нефти *B. circulans* НШ и *S. silvestris* ОБР 3.2 в экстремальных условиях составила 47 и 33%, соответственно (таблица 6), что сравнимо с деструктивной активностью, проявленной данными бактериями в обычных условиях (46 и 32%).

Все штаммы деградировали лигроиновую ( $C_{12}-C_{14}$ ), керосиновую ( $C_{12}-C_{18}$ ) и газойлевою ( $C_{19}-C_{28}$ ) фракцию нефти (рисунок 5). *S. silvestris* ОБР 3.2 в равной степени осуществлял деструкцию всех оцениваемых фракций нефти (21-39%). *B. circulans* НШ в наибольшей степени проявлял деструктивную активность по отношению к газойлевой фракции, разрушая углеводороды на 60%, особенно, углеводороды  $C_{24}-C_{28}$ , деструкция лигроиновой и керосиновой фракции происходила на 48 и 45%. Деструктивная активность *D. maris* АМЗ в отношении керосиновой и лигроиновой фракции составила 41 и 49% соответственно. Газойлевая фракция данным микроорганизмом разрушалась меньше, чем *B. circulans* НШ.

Таблица 6 – Деструкция нефти бактериями и модельными ассоциациями через 10 сут. культивирования в жидкой среде (по данным газовой хроматографии)

Варианты	Значение pH	Содержание NaCl, %	Степень деструкции общих углеводородов, %
<i>B. circulans</i> НШ	7,0	0,5	46±3,2
<i>S. silvestris</i> ОБР 3.2	7,0	0,5	32±4,0
<i>D. maris</i> АМ3	7,0	0,5	40±3,7
<i>S. silvestris</i> ОБР 3.2	7,0	15	33±1,9
<i>D. maris</i> АМ3	7,0	15	6±0,9
<i>S. silvestris</i> ОБР 3.2 + <i>D. maris</i> АМ3	7,0	15	41±2,8
<i>D. maris</i> АМ3	9,0	15	39±1,3
<i>B. circulans</i> НШ	9,0	15	47±3,9
<i>B. circulans</i> НШ + <i>D. maris</i> АМ3	9,0	15	59±4,1

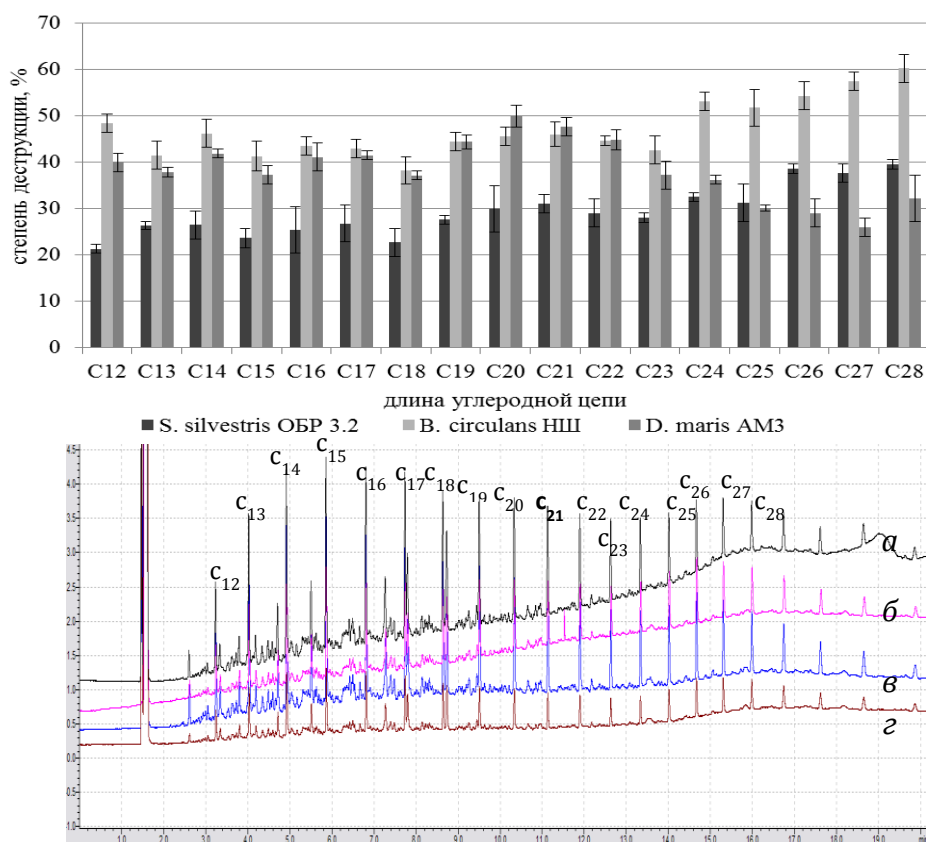


Рисунок 5 – Деградикация нефти бактериями в жидкой среде в течение 10 сут. в обычных условиях (pH 7,0; 0,5% NaCl) (газовая хроматография)

Рисунок 6 – Газовая хроматография экстрактов нефти: а – контроль без добавления бактерий, б – *B. circulans* НШ, в – *D. maris* АМ3, г – ассоциация *B. circulans* НШ + *D. maris* АМ3 (pH 9; 15% NaCl)

Максимальная степень деструкции нефти в условиях повышенной солености и щелочности среды наблюдалась у ассоциации бактерий: *B. circulans* НШ + *D. maris* АМ3 (рисунок 6). Через 10 сут. культивирования общее содержание углеводородов снизилось на 59% по сравнению с контролем (таблица 6). Деструктивная активность ассоциации была на 20 и 12% выше, чем активность индивидуальных штаммов *D. maris* АМ3 и *B. circulans* НШ, выращенных в аналогичных условиях. При этом деградации подвергались в большей степени углеводороды лигроиновой (C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>) и керосиновой фракций (C<sub>15</sub>-C<sub>18</sub>), а также частично газойлевой фракции группы C<sub>21</sub>-C<sub>23</sub>. Итак, полученные данные показали, что в экстремальных экологических условиях бактерии *B. circulans* НШ и *S. silvestris* ОБР 3.2 могут эффективно осуществлять деградикацию нефтяных углеводородов не только самостоятельно, но и в комбинации с нефтеокисляющим штаммом *D. maris* АМ3.

## ВЫВОДЫ

1. Обнаружено высокое токсическое воздействие на почвенную биоту инвертно-эмульсионных буровых растворов, обусловленное сочетанием их компонентов. Установлено, что максимальным токсическим действием обладают дисперсионные среды (нефть, дизельное топливо) и реагенты дисперсионной фазы (сульфонол, хлорид кальция), минимальным – известь, барит, минеральное масло и буровой раствор на его основе.
2. Среди гетеротрофных микроорганизмов, содержащихся в буровых шламах в количестве от 1 до  $9 \times 10^3$  кл/г, преобладают бактерии, окисляющие углеводороды и гидролизующие крахмал, численность которых можно увеличить методом накопительного культивирования. Выделено семь микробных штаммов с широким субстратным спектром в отношении нефтяных углеводородов и нефтепродуктов, идентифицированные как: *Bacillus circulans* НШ; *B. firmus* ОБР 1.1; *B. firmus* ОБР 3.1; *Solibacillus silvestris* 3.2, *B. circulans* ОБР 3.3, *Halomonas* sp. ОБР 1 и *Erwinia rhapontici* ОБР 4.1.
3. У бактерий обнаружена высокая эндогенная ( $E_{24}=55-97\%$ ;  $E_{48}=56-90\%$ ) и экзогенная ( $E_{24}=40-87\%$ ;  $E_{48}=40-85\%$ ) эмульгирующая активность по отношению к нефти. *Halomonas* sp. ОБР 1 деградирует нефть на 40%; *B. circulans* НШ – нефть, дизельное топливо и минеральное масло на 38, 25 и 35%; *B. firmus* ОБР 3.1 – нефть и минеральное масло – на 38 и 39%; *B. circulans* ОБР 3.3 – дизельное топливо – на 36%. Показатель гидрофобности клеточной поверхности у *B. firmus* ОБР 1.1 и 3.1, *B. circulans* ОБР 3.3 и НШ, *S. silvestris* ОБР 3.2 при культивировании их на МПА составляет 19-37%, в минеральной среде с глицерином – 57-66%.
4. Для шести бактерий показана полирезистентность к действию:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$ , для четырех штаммов – галотолерантность, двух – алкалотолерантность. Микроорганизмы способны расти в экстремальных условиях: *B. firmus* ОБР 1.1 (рН 7-9), *B. circulans* НШ (рН 7-10; 15% NaCl), *S. silvestris* ОБР 3.2 (15% NaCl; высокие концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  (189 мг/л) и  $\text{Cd}^{2+}$  (61 мг/л)). Все бактерии обладают конкурентной способностью и экологической безопасностью.
5. В условиях повышенной солености (15%) и щелочности среды (рН 9) максимальная степень деструкции нефти обнаружена у модельной ассоциации: *B. circulans* НШ + *D. maris* АМЗ – 59% за 10 сут. культивирования, что на 20 и 12% выше активности индивидуальных штаммов *D. maris* АМЗ и *B. circulans* НШ в аналогичных условиях. Под действием ассоциации в большей степени разрушаются углеводороды лигроиновой, керосиновой и частично газойлевой фракции.

## ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

\* - публикации в печатных изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК РФ

1. Беляков, А.Ю. Комплексное биотестирование почвы, загрязненной буровым раствором на углеводородной основе / А.Ю. Беляков // «ЛОМОНОСОВ-2012»: Мат. междунар. молодежного научного форума. – М.: МАКС Пресс, 2012. – С. 217-218.
2. Беляков, А.Ю. Деструктивный потенциал микроорганизмов, выделенных из буровых шламов / А.Ю. Беляков, В.А. Амангалиева, Е.В. Плешакова // «Стратегия

- взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой»: Мат. VI Всерос. конф. молодых ученых. – Саратов: Научная книга, 2012. – С. 57.
3. Беляков, А.Ю. Оценка токсического воздействия на почву инвертно-эмульсионных буровых растворов и дисперсионных сред, входящих в их состав / А.Ю. Беляков, Е.В. Плешакова // «Геологи XXI века»: Мат. XIII Всерос. науч. конф. студентов, аспирантов и молодых специалистов. – Саратов: Изд-во СГУ, 2012. – С. 69-70.
  - 4.\*Беляков, А.Ю. Определение токсического воздействия на почву бурового раствора на углеводородной основе с помощью различных приемов биотестирования / А.Ю. Беляков, Д.С. Головкин, Е.В. Плешакова // Известия СГУ. Серия Химия. Биология. Экология. – 2012. – Т. 12. – Вып. 3. – С. 106-113.
  - 5.\*Беляков, А.Ю. Скрининг микроорганизмов-деструкторов компонентов буровых растворов / А. Ю. Беляков, Е.В. Плешакова // Известия СГУ. Серия Химия. Биология. Экология. – 2013. – Т. 13. – Вып. 4. – С. 37-43.
  6. Плешакова, Е.В. Использование различных приемов биотестирования для оценки токсического действия на почву инвертно-эмульсионных буровых растворов и их дисперсионных сред / Е.В. Плешакова, А.Ю. Беляков // «Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред»: Тез. докл. междунар. конф. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. – С. 167.
  7. Deev, D.V. Adaptable properties of bacteria isolated from drill cuttings / D.V. Deev, A.Yu. Belyakov, Ye.V. Pleshakova // Сб. трудов 10 междунар. молодежного экологического форума стран балтийского региона «Экобалтика 2013». – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2013. – С. 24-28.
  8. Плешакова, Е.В. Эколого-функциональные особенности бактерий, выделенных из буровых шламов / Е.В. Плешакова, А.Ю. Беляков, В.А. Амангалиева // «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины»: Мат. V Междунар. науч. практ. конф. – Ростов-на-Дону: Изд-во Южного федерального ун-та, – С. 404-405.
  - 9.\*Плешакова, Е.В. Использование различных приемов биотестирования для оценки токсического действия на почву инвертно-эмульсионных буровых растворов и их дисперсионных сред / Е.В. Плешакова, А.Ю. Беляков // Вестник МГУ. Почвоведение. – 2014. – № 1. – Р. 38-43.
  - 10.\*Беляков, А.Ю. Эколого-функциональные особенности бактерий, выделенных из буровых шламов / А.Ю. Беляков, Е.В. Плешакова, В.А. Амангалиева // Известия Самарского научного центра РАН. Проблемы прикладной экологии. – 2014. – Т. 16, № 1. – С. 294-298.