

УДК 504.06:579.222.2

ОСОБЕННОСТИ ДЕГРАДАЦИИ УГЛЕВОДОРОДОВ БАКТЕРИЯМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ БУРОВЫХ ШЛАМОВ

Е. В. Плешакова, А. Ю. Беляков, Д. В. Деев

Саратовский национальный исследовательский государственный университет
имени Н. Г. Чернышевского

Россия, 410012, Саратов, Астраханская, 83

E-mail: plekat@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.09.16 г.

Особенности деградации углеводородов бактериями, выделенными из буровых шламов. – Плешакова Е. В., Беляков А. Ю., Деев Д. В. – Показано, что выделенные из буровых шламов микроорганизмы – *Bacillus circulans* НШ, *B. firmus* ОБР 1.1, *B. firmus* ОБР 3.1, *Solibacillus silvestris* ОБР 3.2, *B. circulans* ОБР 3.3, *Halomonas* sp. ОБР 1 и *Erwinia rhapontici* ОБР 4.1 – способны к деградации нефти, минерального масла и дизельного топлива. Установлено, что бактерии *B. circulans* НШ и *B. firmus* ОБР 1.1 деградируют нефть в щелочной среде (рН 9) на 62 и 36% за 14 сут., в минерализованной среде (10% NaCl) на 42 и 22%. Продemonстрировано, что бактерии *B. circulans* НШ и *S. silvestris* ОБР 3.2 эффективно деградируют нефтяные углеводороды в условиях повышенной солености и щелочности среды не только самостоятельно, но и в комбинации с нефтеокисляющим микроорганизмом *Dietzia maris* АМЗ. Эффективность деградации нефти ассоциацией *B. circulans* НШ + *D. maris* АМЗ выше, чем монокультурой.

Ключевые слова: буровые шламы, нефтяные углеводороды, микробные штаммы, деградация.

Peculiarities of hydrocarbon degradation by bacteria isolated from drill sludge. – Pleshakova Ye. V., Belyakov A. Yu., and Deev D. V. – Some microorganisms isolated from drill sludge (*Bacillus circulans* NSH, *B. firmus* OBR 1.1, *B. firmus* OBR 3.1, *Solibacillus silvestris* OBR 3.2, *B. circulans* OBR 3.3, *Halomonas* sp. OBR 1, and *Erwinia rhapontici* OBR 4.1) have been shown to be capable of degrading crude oil, mineral oil, and diesel fuel. It has been established that the *B. circulans* NSH and *B. firmus* OBR 1.1 bacteria degrade 62 and 32% of crude oil, respectively, in an alkaline medium (pH 9) for 14 days and degrade 42 and 22%, respectively, in a saline medium (10% NaCl). It was demonstrated that under high salinity and alkalinity conditions the *B. circulans* NSH and *S. silvestris* OBR 3.2 bacteria effectively degraded petroleum hydrocarbons not only solely but also in combination with the crude-oil-oxidizing *Dietzia maris* AM3 microorganism. The efficiency of crude oil degradation by the *B. circulans* NSH + *D. maris* AM3 association was higher than that by each monoculture.

Key words: drill sludge, petroleum hydrocarbons, microbial strains, degradation.

DOI: 10.18500/1684-7318-2017-2-170-182

ВВЕДЕНИЕ

В ходе бурения нефтяных и газовых скважин образуются высокотоксичные буровые шламы, которые состоят из выбуренных пород, пропитанных и содержащих химические реагенты и материалы различной степени экологической опасности (Булатов и др., 1999; Герасимова, 2008; Исламов, 2011; Hickenbottom et al., 2013). В настоящее время широко используются буровые растворы на углеводород-

ОСОБЕННОСТИ ДЕГРАДАЦИИ УГЛЕВОДОДОВ БАКТЕРИЯМИ

ной основе (РУО), в частности, инвертно-эмульсионные растворы, в состав которых входит углеводородная дисперсионная среда и водная дисперсионная фаза.

Образующиеся буровые шламы разнородны по своему составу, но все они создают экологические проблемы, оказывая негативное влияние на почву, нарушая ее состав, свойства и плодородие. Основными токсичными компонентами буровых шламов являются углеводороды (УВ) – составляющие буровых растворов, поверхностно-активные вещества (ПАВ) (Балаба, 2004) и тяжелые металлы I и II класса опасности (Хаустова, Редина, 2006).

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; Jegu, 2008). В связи с этим актуальным является использование 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 буровых шламов ограничивается многокомпонентным составом пропитывающих их буровых растворов в связи с известным синергическим действием ряда ксенобиотиков (Тазетдинова и др., 2013, Терехова, 2010), а также экстремальными экологическими условиями для микроорганизмов-деструкторов, которые характерны для такого комплексного загрязнения. Прежде всего, это повышенная щёлочность 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 бурением солевых 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 буровых шламов и, в то же время, способных обеспечить значительную степень детоксикации реагентов, входящих в состав РУО. Нам представляется перспективным использовать буровые шламы в качестве источника выделения и селекции микроорганизмов-деструкторов основных компонентов буровых отходов.

Цель настоящей работы состояла в оценке способности микроорганизмов, выделенных нами из буровых шламов, к деградации нефтяных углеводородов в нормальных и экстремальных условиях.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали микроорганизмы, выделенные нами из образцов буровых шламов, отобранных в процессе бурения нефтяных скважин Восточной Сибири, особенностями которых являлись низкотемпературные продуктивные пласты,

аномально низкие пластовые давления и высокое содержание NaCl. Образцы характеризовались повышенным значением pH (pH 9) и высокой степенью минерализации (15%). Изолированные из буровых шламов бактерии по совокупности изученных культурально-морфологических, физиолого-биохимических признаков и результатов молекулярного типирования были идентифицированы нами как: *Bacillus circulans* (Jordan, 1890) НШ, *B. firmus* (Werner, 1933) ОБР 1.1, *B. firmus* ОБР 3.1, *Solibacillus silvestris* (Rheims, Frühling, Schumann, Rohde, Stackebrandt, 1999; Krishnamurthi, Chakrabarti, Stackebrandt, 2009) ОБР 3.2, *B. circulans* ОБР 3.3, *Halomonas* sp. (Vreeland et al., 1980) ОБР 1 и *Erwinia rhapontici* (Millard, 1924; Burkholder, 1948) ОБР 4.1. В работе также использовали нефтеокисляющий микроорганизм *Dietzia maris* (Nesterenko et al., 1982; Rainey et al., 1995) АМЗ из коллекции почвенных свободноживущих и ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (г. Саратов).

Бактерии культивировали в жидкой минеральной среде М9 (Миллер, 1976) с нефтью (0.4 и 1% по весу), дизельным топливом или минеральным маслом (0.4%) в качестве единственного источника углерода и энергии при различных значениях pH и содержании NaCl в среде в условиях аэрации на круговой качалке при 160 об./мин и температуре 24°C в течение 10 – 14 сут. Нормальные условия соответствовали: pH 7, 0.5%-ное содержание NaCl, экстремальные условия моделировали повышенной щелочностью (pH 9) и повышенной минерализацией (10 или 15% NaCl).

В качестве контроля использовали минеральную среду с углеводородным субстратом без микроорганизмов и нормальным/повышенным содержанием NaCl и значением pH. В качестве посевного материала использовали смыв суточной культуры бактерий (в случае *D. maris* АМЗ – трехсуточной) с МПА физиологическим раствором. Оптическая плотность посевной дозы составляла 1.0 ед. при длине волны 540 нм. Каждый вариант изучали в трех повторностях.

В экспериментах использовали нефть, полученную с ОАО «Саратовский нефтеперерабатывающий завод», которая представляла собой смесь нефтей различных месторождений: Астраханского, Калмыцкого и др. Соотношение нефтяных фракций в данной нефти было следующим, %: парафины и нафтенy – 68.2; моно- и бициклические ароматические соединения – 11.7; ПАУ – 7.5; спирто-бензолные смолы – 12.6. В работе также использовали коммерческое дизельное топливо марки «Л». Оно было представлено преимущественно углеводородами алканового ряда (65.96%) и нафтенами (32.72%), низкомолекулярные ароматические углеводороды составляли 1.02, ПАУ – 0.3%. Фракционный состав минерального масла марки Luxe standart 15w-40 («LUXE», Россия), применяемого в исследованиях, был также представлен преимущественно углеводородами алканового ряда (62.3%) и нафтенами (17.0%), низкомолекулярные ароматические углеводороды составляли 0.5, ПАУ – 0.2%.

Деструктивную активность бактериальных культур оценивали методом адсорбционной хроматографии с последующим гравиметрическим анализом (Суржко и др., 1995), извлекая сумму неполярных и малополярных углеводородов из культуральной жидкости органическим растворителем (хлороформом) с одновре-

ОСОБЕННОСТИ ДЕГРАДАЦИИ УГЛЕВОДОДОВ БАКТЕРИЯМИ

менной очисткой элюата на окиси алюминия в хроматографической колонке. Элюаты собирали в предварительно взвешенные стеклянные стаканы. После полного испарения растворителя стаканы взвешивали еще раз для определения количества собранных углеводородов. По полученным результатам рассчитывали степень деструкции углеводородов, которую выражали в процентах.

Деструктивную активность бактериальных культур определяли также методом газовой хроматографии (Другов, Родин, 2007). Пробы анализировали на газовом хроматографе «GC-2010» («Shimadzu», Япония) с кварцевой капиллярной колонкой HP-5 (30 м × 0.32 мм × 0.25 мкм). В качестве газа-носителя использовали гелий. Линейная скорость 34.6 см/с. Температура инжектора и детектора 300°C. Идентификацию хроматографических пиков проводили по временам удерживания. Содержание углеводородов в образце определяли методом нормализации площадей (подсчитывали отношение площадей пика компонента в % к суммарной площади всех идентифицированных пиков на хроматограмме). Процент деструкции углеводородов рассчитывали по формуле:

$$\text{степень деструкции УВ, \%} = \frac{C_{\text{к}} - C_{\text{оп}}}{C_{\text{к}}} \times 100,$$

где $C_{\text{к}}$ – суммарное содержание углеводородов в абиотическом контроле (минеральная среда с нефтью без бактерий); $C_{\text{оп}}$ – суммарное содержание углеводородов в опытном образце.

Статистическая обработка представленных в работе данных осуществлялась с помощью программы Microsoft Office Excel 2003 с использованием распределения Стьюдента. Расчет доверительных интервалов проводился при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Качественный анализ субстратного спектра изолированных из буровых шламов бактерий, проведенный ранее (Беляков, Плешакова, 2013), показал, что данные микроорганизмы обладали способностью к росту на минеральной агаризованной среде, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии: буровой раствор на основе минерального масла, товарную нефть, вазелиновое масло, дизельное топливо. 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.

Нефть, дизельное топливо и минеральное масло – это самые распространенные дисперсионные среды буровых растворов на углеводородной основе (Khodja et al., 2010), они характеризуются высокой токсичностью по отношению к живым организмам (Cunningham, Philp, 2000). В этой связи была изучена деструктивная активность выделенных микроорганизмов по отношению к данным дисперсионным средам (нефтепродуктам) РУО, которые вносили в минеральную среду М9 в качестве единственного источника углерода и энергии в концентрации 0.4% (по весу).

Через 10 сут. в контрольных образцах (без добавления бактерий) наблюдалась небольшая убыль исследуемых дисперсионных сред, которая обусловлена абиотическими физико-химическими процессами, происходящими с течением времени в среде с нефтепродуктами (Иваненко, 2006; Shukla, 1990). Количество нефти при этом снизилось на 7, минерального масла – на 8, дизельного топлива – на 15%. Согласно полученным результатам, у всех изученных микроорганизмов обнару-

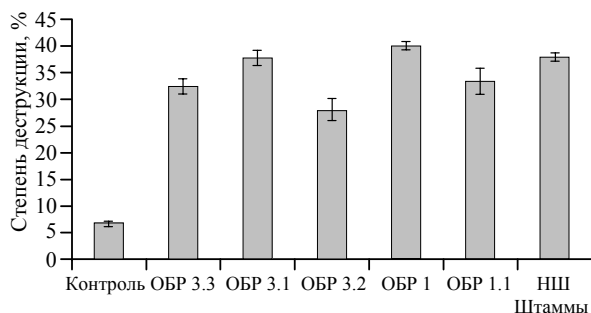


Рис. 1. Деструктивная активность бактерий по отношению к нефти (0.4% по весу) через 10 сут. культивирования (гравиметрический анализ)

живалась деструктивная активность по отношению к нефти (рис. 1). Деструктивная активность бактерий составляла у разных штаммов от 28 до 40%. 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%.

Сравнивая деструктивную активность бактерий, выделенных нами из буровых

шламов, с активностью других культур-нефтедеструкторов, можно отметить следующее. В модельном эксперименте О. Н. Логинова с соавт. (2004) показано, что биопрепарат «Бациспецин» (ЗАО НПП «Биомедхим», Россия) на основе штамма *Bacillus* sp. 739 способен утилизировать нефть на 40 – 60% за 30 сут. в зависимости от степени загрязнения (Логинов и др., 2004). Авторами показано, что штамм *B. firmus* SDS-1, выделенный из нефтезагрязненной почвы, способен утилизировать нефть в жидкой среде до 82% за 10 сут. культивирования (Средство для деструкции..., 2011). Бактериальные штаммы, изолированные исследователями (Puina et al., 2003) из нефтезагрязненных почв, показавшие от 21 до 30.5% деструкции общих нефтяных углеводов за 15 сут. культивирования, были отобраны как лучшие среди других 30 изолятов, на их основе создан биопрепарат «COBE-10». Среди этих штаммов были: *Bacillus* sp., *Rhodococcus* sp., *Providencia* sp., *Citrobacter* sp. Таким образом, способность к деструкции нефтяных углеводов у выделенных нами микроорганизмов сравнима со способностью у описанных бактерий-деструкторов углеводов.

По отношению к дизельному топливу заметную деструктивную активность проявили два штамма – *B. circulans* ОБР 3.3 и *B. circulans* НШ. Общее содержание углеводов при их культивировании снизилось на 35.5 и 25% соответственно. Полученные результаты согласуются с данными Н. Г. Астровой с соавт. (1998) о способности штаммов *Bacillus* sp. в ассоциациях с *Pseudomonas* sp. и *Micrococcus* sp. снижать концентрацию дизельного топлива до 0.01 мг/л и ниже. Однако все остальные исследованные нами бактерии не проявили значимую деструктивную активность по отношению к дизельному топливу. Известно, что в дизельном топ-

ливе преобладают простые неразветвленные *n*-алканы (Heath et al., 1997). И хотя метаболизм *n*-алканов ($C_6 - C_{12}$) возможен, многие из них действуют как растворители, разрушая клетки посредством частичной сольubilизации мембранных фосфолипидов, оказывая, таким образом, токсическое действие на многие микроорганизмы (Khodja et al., 2010). Возможно, исследованные нами бактерии также оказались подвержены токсическому действию низкомолекулярных алканов дизельного топлива.

Результаты количественного анализа деградации минерального масла показали, что в образцах с *B. firmus* ОБР 3.1 и *B. circulans* НШ наблюдалась убыль углеводов на 39 и 35% соответственно. Эти результаты совпадали с высокой деструктивной активностью данных культур по отношению к нефти. Культивирование остальных микроорганизмов не приводило к существенной деградации минерального масла. Низкий деструктивный потенциал бактерий-деструкторов по отношению к исследованному минеральному маслу может быть связан с многокомпонентным составом данного нефтепродукта, который помимо высокомолекулярных углеводов включал различные присадки, такие как феноляты, дитиофосфаты и алкилдитиофосфаты различных металлов (Караулов, Худолий, 2000). А. А. Худоркомов с соавт. (2013) показали, что самыми труднопотребляемыми углеводородными субстратами для микроорганизмов оказались минеральные масла вне зависимости от их марки.

Итак, в ходе экспериментов установлено, что все выделенные из буровых шламов бактерии хорошо усваивали нефть в качестве единственного источника углерода и энергии, что может быть связано с источниками их выделения (нефтяные скважины) и, как следствие, многолетней адаптацией к данному субстрату как источнику питания. Деструктивная активность выделенных бактерий по отношению к дизельному топливу и минеральному маслу была значительно ниже, что согласуется с литературными данными, так как известно, что, несмотря на меньшее содержание ароматических углеводородов в своем составе, данные нефтепродукты обладают ограниченной биодоступностью для микроорганизмов-деструкторов (Zanaroli et al., 2010).

При разработке биотехнологического метода обезвреживания отходов бурения следует учитывать многокомпонентный состав буровых шламов, наличие в их составе токсичных соединений, а также высокое значение pH и высокую степень минерализации буровых отходов. В связи с этим мы исследовали изолированные из буровых шламов микроорганизмы на способность к деструкции углеводородов нефти в экстремальных условиях. Для этих исследований нами было выбрано два штамма – *B. circulans* НШ и *B. firmus* ОБР 1.1. Они отличались высокими деструктивными свойствами по отношению к нефтяным углеводородам, алкало- и галотолерантностью (Беляков и др., 2014). В табл. 1 приведены результаты оценки деструктивной активности бактерий.

Степень деструкции углеводов штаммом *B. circulans* НШ составила 56% при культивировании его в нормальных условиях, 62% при выращивании в среде с повышенной щёлочностью (pH 9) и 42% при культивировании в условиях повышенной минерализации. Деструктивная активность *B. firmus* ОБР 1.1 была ниже.

Общее содержание углеводов снизилось при культивировании микроорганизма в нормальных условиях на 32, в условиях повышенной щёлочности – на 36, повышенной минерализации – на 22%.

Таблица 1

Деструкция нефти (1% по весу) бактериями через 14 сут. культивирования
(данные гравиметрического анализа)

Варианты	Условия культивирования		Степень деструкции общих углеводов, %
	Значение pH	Содержание NaCl, %	
Нормальные условия			
<i>B. circulans</i> НШ	7	0.5	56±2.1
<i>B. firmus</i> ОБР 1.1	7	0.5	32±2.5
Контроль	7	0.5	13±3.1
Повышенная щёлочность			
<i>B. circulans</i> НШ	9	0.5	62±2.9
<i>B. firmus</i> ОБР 1.1	9	0.5	36±3.8
Контроль	9	0.5	12±3.5
Повышенная солёность			
<i>B. circulans</i> НШ	7	10	42±3.3
<i>B. firmus</i> ОБР 1.1	7	10	22±3.0
Контроль	7	10	10±3.6

В целом можно отметить, что повышенная щёлочность среды культивирования не способствовала уменьшению степени деструкции нефтяных углеводов исследованными бактериями, значения деструктивной активности штаммов в этих условиях были даже несколько выше. Повышенная степень минерализации снижала деструктивную активность штаммов в отношении нефтяных углеводов на 10 – 14%, однако убыль углеводов при культивировании *B. circulans* НШ и *B. firmus* ОБР 1.1 в минерализованной среде была отчетливой, в 6 и 3 раза выше, чем в аналогичной среде без бактерий.

Обнаруженные свойства бактерий, несомненно, открывают перспективу их практического использования для обезвреживания буровых шламов, которые характеризуются повышенной щёлочностью и повышенной степенью минерализации.

Известно, что при применении ассоциаций микроорганизмов биодеградация нефтепродуктов происходит полнее и за меньшие сроки, чем при использовании индивидуальных микроорганизмов (Wenderoth et al., 2003). Этот факт объясняется тем, что, обладая разными ферментативными системами, ассоциации из бактерий-деструкторов способны извлекать нефтепродукты из субстрата с большой эффективностью (Андреева и др., 2006). Кроме того, включение нескольких монокультур в ассоциации обеспечивает расширение спектра окисления, большую вариабельность биоагентов в различных условиях.

Для создания модельной ассоциации микроорганизмов-деструкторов компонентов буровых шламов нами было выбрано два наиболее перспективных из выделенных нами штаммов: *B. circulans* НШ и *S. silvestris* ОБР 3.2. Первый штамм отличался алкало- и галотолерантностью, хорошо рос в интервале pH от 7 до 10 и

ОСОБЕННОСТИ ДЕГРАДАЦИИ УГЛЕВОДОРОДОВ БАКТЕРИЯМИ

солёности среды до 15%, имел широкий спектр устойчивости к тяжелым металлам и высокий деструктивный потенциал по отношению к нефти, дизельному топливу и минеральному маслу (Беляков и др., 2014). Штамм *S. silvestris* ОБР 3.2 был также галотолерантен, хорошо рос при солёности среды 15%, отличался максимально широким спектром устойчивости к тяжелым металлам, обладал высокой деструктивной активностью по отношению к нефти.

Отобранные бактерии использовали в сочетании с активным деструктором углеводородов *D. maris* AM3 (Плешакова и др., 2008), который был также устойчив к условиям комплексного загрязнения и не проявлял антагонистического действия по отношению к этим микроорганизмам. Варианты ассоциаций и условий культивирования отображены в табл. 2. Деструктивную активность опытных образцов рассчитывали в процентах по отношению к абиотическому контролю (минеральная среда с нефтью без бактерий).

Таблица 2

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	0.5	46±3.2
<i>S. silvestris</i> ОБР 3.2	7	0.5	32±4.0
<i>D. maris</i> AM3	7	0.5	40±3.7
<i>S. silvestris</i> ОБР 3.2	7	15	33±1.9
<i>D. maris</i> AM3	7	15	6±0.9
<i>S. silvestris</i> ОБР 3.2 + <i>D. maris</i> AM3	7	15	41±2.8
<i>D. maris</i> AM3	9	15	39±1.3
<i>B. circulans</i> НШ	9	15	47±3.9
<i>B. circulans</i> НШ + <i>D. maris</i> AM3	9	15	59±4.1

Согласно полученным результатам, через 10 сут. культивирования бактерий при нейтральных значениях pH и 0.5%-ном содержании соли в минеральной среде степень деструкции нефти *B. circulans* НШ составила 46, *S. silvestris* ОБР 3.2 – 32, *D. maris* AM3 – 40% (см. табл. 2). Эти данные согласуются с полученными ранее результатами гравиметрического анализа. Таким образом, выделенные нами из буровых шламов бактерии и нефтеокисляющий микроорганизм *D. maris* AM3 сходным образом деградировали нефть в нормальных условиях.

Обнаружено, что исследованные микроорганизмы проявили деструктивную активность по отношению к углеводородам лигроиновой ($C_{12} - C_{14}$), керосиновой ($C_{12} - C_{18}$) и газойлевой ($C_{19} - C_{28}$) фракции нефти. Штамм *S. silvestris* ОБР 3.2 в равной степени осуществлял деструкцию всех вышеназванных углеводородов (на 21 – 39%). Деструктивная активность *B. circulans* НШ и *D. maris* AM3 по отношению к углеводородам несколько отличалась (рис. 2). Штамм *B. circulans* НШ в наибольшей степени проявлял деструктивную активность по отношению к углеводородам газойлевой фракции, разрушая их на 60%, особенно углеводороды $C_{24} - C_{28}$, деструкция углеводородов лигроиновой и керосиновой фракции происходила

на 48 и 45% соответственно. Степень деструкции углеводородов керосиновой и лигроиновой фракции *D. maris* АМЗ составила 41 и 49% соответственно. Углеводороды газойлевой фракции данным микроорганизмом разрушалась меньше по

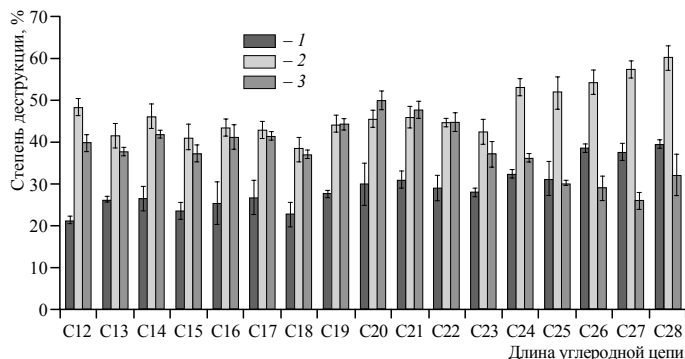


Рис. 2. Деградация нефти бактериями в жидкой среде в течение 10 сут. в нормальных условиях (газовая хроматография): 1 – *Solibacillus silvestris* ОБР 3.2, 2 – *Bacillus circulans* НШ, 3 – *Dietzia maris* АМЗ

сравнению с *B. circulans* НШ.

Культивирование *B. circulans* НШ и *S. silvestris* ОБР 3.2 с нефтью в экстремальных условиях показало, что их деструктивная активность была сравнима с активностью, проявленной данными бактериями в нормальных условиях, что свидетельствует об устойчивости исследованных микро-

организмов к повышенной щёлочности и солёности среды. Изменение экологических условий никак не повлияло на деструктивную активность штаммов по отношению к различным углеводородам. Она была такой же, как и в случае культивирования бактерий в обычных условиях.

В то же время, как показали исследования, в условиях повышенного содержания NaCl в среде наблюдалась незначительная деструкция нефти (6%) в образце с *D. maris* АМЗ, что может свидетельствовать об ингибирующем влиянии соли на жизнедеятельность и метаболическую активность данного микроорганизма. Однако в условиях повышенной солёности и щёлочности среды деструктивная активность данного штамма составила 39% и была сопоставима с активностью *D. maris* АМЗ при культивировании в обычных условиях (см. табл. 2). Возможно, это связано с тем, что рН-гомеостаз у данной бактерии обеспечивается Na^+/H^+ -антипортом, поэтому в щелочных условиях для нормальной жизнедеятельности *D. maris* АМЗ необходимы ионы Na^+ .

Несмотря на то, что *D. maris* АМЗ проявил низкую деструктивную активность в условиях солёности среды, в ассоциации с *S. silvestris* ОБР 3.2 деструктивная активность в минерализованной среде выросла на 8% по сравнению с культивированием *S. silvestris* ОБР 3.2 отдельно в тех же условиях. Это свидетельствует об участии *D. maris* АМЗ в деструкции нефти, несмотря на лимитирующие условия для жизнедеятельности данного штамма. Возможно, галофильный спутник оказывает защитное действие против осмотического шока на входящий с ним в общую ассоциацию нефтеокислитель.

Максимальная степень деструкции нефти в условиях повышенной солёности и щёлочности среды обнаруживалась у ассоциации бактерий *B. circulans* НШ и

D. maris AM3 (рис. 3). Так, через 10 сут. культивирования общее содержание углеводородов снизилось на 59% по сравнению с контролем (см. табл. 2). Деструктивная активность ассоциации была на 20 и 12% выше, чем активность индивидуальных штаммов *D. maris* AM3 и *B. circulans* НШ, выращенных в аналогичных условиях.

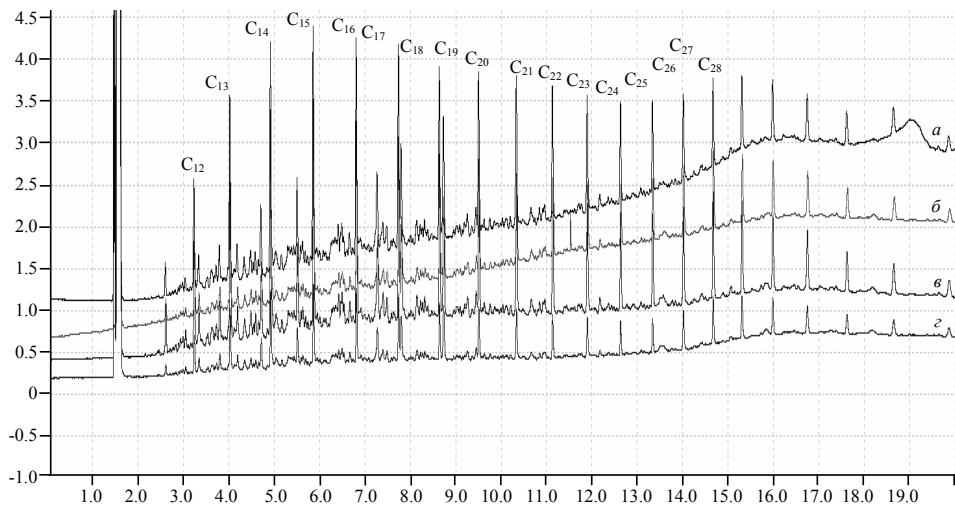


Рис. 3. Газовая хроматография экстрактов нефти: *а* – контроль без добавления бактерий после культивирования бактерий при pH 9 и 15%-ном содержании NaCl; *б* – *D. maris* AM3; *в* – *B. circulans* НШ; *г* – ассоциация *B. circulans* НШ + *D. maris* AM3

Сравнивая характер изменения в содержании углеводородов нефти в результате биодеструкции монокультурами и микробной ассоциацией *B. circulans* НШ + *D. maris* AM3 в экстремальных условиях, следует отметить, что деградации в случае действия смешанной культуры подвергались в большей степени углеводороды лигроиновой ($C_{12} - C_{14}$) и керосиновой фракций ($C_{15} - C_{18}$), а также частично газойлевой фракции группы $C_{21} - C_{23}$. В связи с этим убыль общего содержания углеводородов нефти при культивировании микробной ассоциации была выше по сравнению с монокультурами.

Таким образом, полученные данные показали, что 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* AM3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным результатам, у всех микроорганизмов, выделенных нами из буровых шламов, была обнаружена способность к деструкции нефти (0.4% по весу). Максимальная деструктивная активность в отношении нефти и нефте-

продуктов отмечена у бактерий: *Halomonas* sp. ОБР 1 (степень деградации нефти за 10 сут. культивирования составила 40%); *B. circulans* НШ деградировал 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%.

Было показано, что в условиях повышенной солёности и щёлочности среды бактерии *B. circulans* НШ и *B. firmus* ОБР 1.1 также способны к деградации нефти. При культивировании *B. circulans* НШ и *B. firmus* ОБР 1.1 в течение 14 сут. в среде с pH 9 степень деградации нефти (1% по весу) составила 62 и 36%; в среде с 10% NaCl – 42 и 22%.

Максимальная степень деградации нефти в условиях повышенной солёности (15%) и щёлочности среды (pH 9) обнаружена у модельной ассоциации: *B. circulans* НШ + *D. maris* AM3 – 59% за 10 сут. культивирования, что на 20 и 12% выше активности индивидуальных штаммов *D. maris* AM3 и *B. circulans* НШ в аналогичных условиях. Установлено, что под действием ассоциации в большей степени разрушаются углеводороды лигроиновой, керосиновой и частично газойлевой фракции.

Тот факт, что исследованные бактерии были выделены из образцов буровых шламов, предопределил наличие у микроорганизмов обнаруженных оригинальных свойств, которые явились, по-видимому, следствием адаптации к сложному химическому составу буровых шламов. Выявленные характеристики бактерий позволяют рассматривать их как потенциальных интродуцентов (как отдельно, так и в ассоциациях) для использования в технологиях очистки отходов бурения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абалаков Д. А., Половкин В. П., Вахромеев А. Г. Геоэкология кустового безамбарного бурения нефтегазовых месторождений. Иркутск : Изд-во «Арт-Пресс», 2003. 334 с.
- Андреева И. С., Емельянова И. К., Загребельный С. Н. Психротолерантные штаммы нефтедеструкторы для биоремедиации почв и водной среды // Биотехнология. 2006. № 1. С. 46 – 48.
- Астрова Н. Г., Мойсеева Л. В., Астров В. В. Разработка биоконверсионной очистки нефтесодержащих сточных вод по системе Каскад-Стар // Вода и здоровье-98 : материалы междунар. науч.-практ. конф. Одесса : Изд-во Одес. гос. ун-та, 1998. С. 213 – 217.
- Балаба В. И. Обеспечение экологической безопасности строительства скважин на море // Бурение и нефть. 2004. № 1. С. 18 – 21.
- Беляков А. Ю., Плешакова Е. В. Скрининг микроорганизмов-деструкторов компонентов буровых растворов // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2013. Т. 13, вып. 4. С. 37 – 43.
- Беляков А. Ю., Плешакова Е. В., Амангалиева В. А. Эколого-функциональные особенности бактерий, выделенных из буровых шламов // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2014. Т. 16, № 1. С. 294 – 298.
- Булатов А. И., Макаренко П. П., Проселков Ю. М. Буровые промывочные и тампонажные растворы : учеб. пособие для вузов. М. : Недра, 1999. 424 с.
- Герасимова М. С. Выбор технологии обезвреживания и утилизации отработанных буровых растворов // Охрана окружающей среды и экология : материалы II междунар. науч. студ. конф. Ставрополь : Изд-во Сев.-Кавказ. гос. техн. ун-та, 2008. С. 180.

ОСОБЕННОСТИ ДЕГРАДАЦИИ УГЛЕВОДОРОДОВ БАКТЕРИЯМИ

Другов Ю. С., Родин А. А. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов, практическое руководство. М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. 270 с.

Иваненко Н. В. Экологическая токсикология : учеб. пособие. Владивосток : Изд-во Владивост. гос. ун-та экономики и сервиса, 2006. 90 с.

Исламов Х. М. Геоэкологическая безопасность применения химических реагентов для обработки буровых растворов // Геология, география и глобальная экология. 2011. № 3. С. 174 – 179.

Караулов А. К., Худолый Н. Н. Автомобильные масла. Моторные и трансмиссионные. Ассортимент и применение. Курск : Радуга, 2000. 436 с.

Логинов О. Н., Нуртдинова Л. А., Бойко Т. Ф., Четвериков С. Л., Силищев Н. Н. Оценка эффективности нового биопрепарата Ленойл для ремедиации нефтезагрязненных почв // Биотехнология. 2004. № 1. С. 77 – 82.

Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М. : Мир, 1976. 440 с.

Морозов В. И., Федоров А. В., Гейшерик Г. М. Экологические проблемы освоения нефтегазового потенциала Восточной Сибири и Дальнего Востока // Минеральные ресурсы России. Экономика и управление. 2004. № 1. С. 64 – 73.

Средство для деструкции нефтяных углеводородов в среде, содержащей NaCl до 24.0% : пат. 2422505 Рос. Федерация : МПК C2, C12N 1/00 / Сопрунова О. Б., Гальперина А. Р., Ключанова М. А. ; заявитель и патентообладатель Астраханский государственный технический университет. – № 2009107427/10 ; заявл. 02.03.09 ; опубл. 27.06.11, Бюл. № 18. – 8 с.

Плешакова Е. В., Дубровская Е. В., Турковская О. В. Сравнение эффективности интродукции нефтеокисляющего штамма *Dietzia maris* и стимуляции естественных микробных сообществ для ремедиации загрязненной почвы // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. Т. 44, № 4. С. 430 – 437.

Рязанов Я. А. Энциклопедия по буровым растворам. Оренбург : Изд-во «Летопись», 2005. 664 с.

Суржко Л. Ф., Финкельштейн З. И., Баскунов Б. П. Утилизация нефти в почве и воде микробными клетками // Микробиология. 1995. Т. 64, № 3. С. 393 – 399.

Тазетдинова Д. И., Антонов В. В., Газизов И. С., Алимова Ф. К. Ферментативная активность выщелоченных черноземов Восточного Закарья Волжско-Камской степи при синергетическом загрязнении тяжелыми металлами и углеводородами // Фундаментальные исследования. 2013. № 8-2. С. 364 – 369.

Терехова В. А. Проверка безопасности искусственных почвогрунтов из органосодержащих отходов // Экология производства. 2010. № 2. С. 56 – 60.

Хаустова А. П., Редина М. М. Охрана окружающей среды при добыче нефти. М. : Дело, 2006. 552 с.

Худоркомов А. А., Карасева Э. В., Самков А. А., Волченко Н. Н., Козицын А. Е. Деструкция углеводородов различными морфотипами нефтеокисляющих актинобактерий // Науч. журн. Кубанск. гос. аграрн. ун-та [Электронный ресурс]. 2013. № 92 (8). URL: <http://ej.kubagro.ru/2013/08/pdf/51.pdf> (дата обращения: 02.08.2016).

Ягафарова Г. Г., Мавлютов М. Р., Барахнина В. Б. Биотехнологический способ утилизации нефтешламов и буровых отходов // Горный вестн. 1998. № 4. С. 43 – 46.

Cunningham C. J., Philp J. C. Comparison of bioaugmentation and biostimulation in *ex situ* treatment of diesel contaminated soil // Contamination and Reclamation. 2000. Vol. 8, № 4. P. 261 – 269.

Heath D. J., Lewis C. A., Rowland S. J. The use of high temperature gas chromatography to study the biodegradation of high molecular weight hydrocarbons // Organic Geochemistry. 1997. Vol. 26, iss. 12. P. 769 – 785.

Hickenbottom K. L., Hancock N. T., Hutchings N. R., Appleton E. W., Beaudry E. G., Xu P., Cath T. Y. Forward osmosis treatment of drilling mud and fracturing wastewater from oil and gas operations // *Desalination*. 2013. Vol. 312. P. 60 – 66.

Ilyina A., Castillo Sanchez M. I., Villarreal Sanchez J. A., Ramirez Esquivel G., Candelas Ramirez J. Isolation of soil bacteria for bioremediation of hydrocarbon contamination // *Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия*. 2003. Т. 44, № 1. С. 88 – 91.

Jerry M. Estimation of bioavailability of metals from drilling mud barite // *Integrated Environmental Assessment and Management*. 2008. Vol. 4, № 2. P. 184 – 193.

Khodja M., Khodja-Saber M., Canselier J. P., Cohaut N., Bergaya F. Drilling fluid technology : performances and environmental considerations // *Products and services; from R&D to final solutions* / ed. I. Fuerstner. Rijeka : InTech., 2010. P. 227 – 256.

Shukla O. P. Biodegradation for environmental management // *Everyman's Science*. 1990. Vol. 25, № 2. P. 46 – 50.

Wenderoth D. F., Rosenbrock P., Abraham W-R., Pieper D. H., Hofle M. G. Bacterial community dynamics during biostimulation and bioaugmentation experiments aiming at chlorobenzene degradation in groundwater // *Microbial Ecology*. 2003. Vol. 46, № 2. P. 161 – 176.

Zanaroli G., Toro S. D., Todaro D., Varese G. C., Bertolotto A., Fava F. Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated, complex source of microorganisms // *Microbial Cell Factories*. 2010. Vol. 9, № 10. P. 35 – 38.