

ЭКОЛОГО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БУРОВЫХ ШЛАМОВ

© 2014 А.Ю. Беляков, Е.В. Плешакова, В.А. Амангалиева

Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, г. Саратов

Поступила 30.11.2013

Изучены эколого-функциональные свойства бактерий, изолированных из буровых шламов. Показано, что выделенные бактерии обладают высокой экзогенной и эндогенной эмульгирующей активностью по отношению к нефти, резистентностью по отношению к наиболее распространенным в буровых шламах тяжелым металлам, устойчивы к повышенной щелочности и минерализации среды.

Ключевые слова: микроорганизмы-деструкторы, буровые растворы на углеводородной и водной основе, буровой шлам, эмульгирующая активность, показатель гидрофобности, тяжелые металлы.

Процесс бурения нефтяных и газовых скважин сопровождается образованием больших количеств буровых шламов [1]. Буровой шлам представляет собой продукт, состоящий из твердых и жидких компонентов, поступление которых в окружающую среду приводит к ее загрязнению. Образующийся на забое выбуренный шлам взаимодействует с буровым раствором, в результате чего, частицы горных пород адсорбируют на поверхности различные компоненты бурового раствора и в таком виде остаются длительное время на буровой площадке, в частности, в шламовых амбарах [2]. Токсичность буровых шламов зависит, главным образом, от минералогического состава выбуренной породы, пластовых флюидов и состава используемого бурового раствора [3]. Известно, что по сравнению с буровыми шламами, пропитанными растворами на водной основе, шламы, пропитанные буровыми растворами на углеводородной основе (РУО), более токсичны из-за присутствия в РУО углеводов и поверхностно-активных веществ (ПАВ) [4].

В настоящее время существует ряд технологий обезвреживания таких шламов, однако большинство из них являются дорогостоящими, энерго- и трудозатратными, не образуют экологически безопасные соединения [5]. В связи с этим, актуальным является поиск микроорганизмов-деструкторов, способных расти и проявлять активную биохимическую деятельность в среде с высоким содержанием углеводов и ПАВ, что в дальнейшем приведет к биодеструкции этих веществ. Использование биотехнологического метода для детоксикации буровых шламов основывается не только многокомпонентным составом

пропитывающих их буровых растворов, но и наличием в шламах тяжелых металлов (ТМ), являющихся опасными экотоксикантами, а также экстремальными экологическими условиями для микроорганизмов-деструкторов, которые характерны для такого комплексного загрязнения. Например, высокие значения рН и высокая степень минерализации буровых шламов.

Целью наших исследований явилось изучение эколого-функциональных свойств микроорганизмов, устойчивых к особенностям комплексного загрязнения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящих исследованиях мы изучали изолированные нами ранее бактериальные культуры: *Halomonas* sp. ОБР 1, *Bacillus firmus* ОБР 1.1, *Bacillus firmus* ОБР 3.1, *Solibacillus silvestris* ОБР 3.2, *Bacillus circulans* ОБР 3.3, *Bacillus circulans* НИШ. Данные бактерии были выделены из двух образцов буровых шламов нефтяных скважин Восточной Сибири. Образцы шламов состояли из выбуренной породы, пропитанной раствором на основе дизельного топлива – (БШ 1), и соленасыщенным раствором на водной основе – (БШ 2). Образец БШ 1 был отобран с глубины 1611 м, БШ 2 – с глубины 1508 м. В первом образце выбуренная порода была представлена преимущественно песчаником, во втором – доломитом. Общее содержание нефтяных углеводов в образцах составляло: в БШ 1 – 6, БШ 2 – 1,2%. Данные шламы отличались высоким значением рН (рН=9) и высокой степенью минерализации (15%). Перечисленные выше особенности буровых шламов свидетельствовали об уникальности данных экологических ниш для микробиоты и возможности выделения микроорганизмов с оригинальными эколого-функциональными характеристиками, связанными, например, с устойчивостью бактерий к действию ТМ и др.

Беляков Андрей Юрьевич, аспирант кафедры биохимии и биофизики, beland89@mail.ru; Плешакова Екатерина Владимировна, доктор биологических наук, доцент, профессор, plekat@rambler.ru; Амангалиева Валентина Алексеевна, студентка, amangalieva.valentina@yandex.ru

Эмульгирующую активность изолированных бактерий по отношению к товарной нефти и дизельному топливу определяли методом Д. Купера с некоторыми модификациями [7]. Бактериальные культуры выращивали в течение нескольких суток в жидкой минеральной среде М9 с добавлением углеводородного субстрата в качестве единственного источника углерода и энергии (20 г/л – глицерина или дизельного топлива марки «Л-0,2-40»). Для оценки экзогенной эмульгирующей активности бактериальные клетки отделяли от культуральной среды с помощью центрифугирования, среду затем дополнительно фильтровали через бумажные фильтры и исследовали супернатант. При измерении эндогенной эмульгирующей активности культуральную среду не центрифугировали. Далее культуральную среду с бактериальными клетками или без них смешивали с углеводородным субстратом (нефть или дизельное топливо) в соотношении 3:2 и интенсивно перемешивали на лабораторном встряхивателе при 1000 об/мин в течение 20 мин для получения стабильной эмульсии. После этого пробирки оставляли в вертикальном положении при комнатной температуре, эмульгирующую активность выражали в процентах, рассчитывая ее как отношение объема эмульсии через 24 (E_{24}) и 48 (E_{48}) часов к общему объему жидкости, умноженное на 100 процентов.

Для оценки показателя гидрофобности (ПГ) бактериальных клеток применяли метод Е.В. Серебряковой с соавт. [8], основанный на адсорбции бактериальных клеток на поверхности капле хлороформа. Бактерии для этого анализа получали двумя способами: 1) выращиванием в течение 2-х суток на твердой агаризованной питательной среде (МПА) в чашках Петри и 2) в жидкой минеральной среде М9 с глицерином в качестве единственного источника углерода и энергии. Затем готовили водные бактериальные суспензии, оптическая плотность которых составляла 0,1-0,2 ед. при длине волны $\lambda=670$ нм. При этом мы ориентировались на результаты Н.Н. Волченко [9], который показал, что такие значения плотности оптимальны для оценки ПГ бактерий по методу Е.В. Серебряковой, т.к. при более высоких значениях при встряхивании образуется стойкая эмульсия. Далее в пробирках с притертыми пробками смешивали бактериальные суспензии и хлороформ в соотношении 4:1 и встряхивали содержимое в течение 15 мин на лабораторном встряхивателе при 1000 об/мин. При этом, чем большей гидрофобностью обладали клетки, тем более полно они экстрагировались в углеводородную фазу (хлороформ). После этого выдерживали пробирки в вертикальном положении в течение 1 ч для разделения фаз. Измерив оптическую плотность бактериальной суспензии после встряхивания, рассчитывали ПГ по формуле:

$$ПГ=100-(ОП_1 \times 100)/ОП_0,$$

где $ОП_0$ – оптическая плотность суспензии до встряхивания,

$ОП_1$ – оптическая плотность суспензии после встряхивания.

В опытах по изучению влияния рН сред для культивирования (в диапазоне рН от 7,0 до 11,0) на рост бактерий применяли жидкую питательную среду (МПБ) с использованием TRIS буфера (рН 8,0-9,0) и буферного раствора на основе карбоната натрия с соляной кислотой (рН 10,0-11,0) [10]. При изучении способности выделенных из буровых шламов бактерий расти в среде с повышенной степенью минерализации микроорганизмы выращивали в МПБ с различным содержанием NaCl: 3,5; 6,5; 10; 12 и 15%.

Устойчивость бактерий к действию ТМ определяли визуально по росту культур на МПА с добавлением диапазона концентраций следующих солей ТМ: $CuCl_2$, $Pb(NO_3)_2$, $CdCl_2$, $ZnSO_4$, $NiSO_4$ и $FeSO_4$. Стерильные растворы солей ТМ вносили в МПА непосредственно перед розливом питательной среды в чашки Петри до конечной концентрации в среде, мг/л: $CuCl_2$ – 40, 70, 100, 300, 400, 500, 600; $Pb(NO_3)_2$ – 40, 140, 240, 600; $CdCl_2$ – 20, 40, 70, 100; $ZnSO_4$ – 40, 140, 240, 440; $NiSO_4$ – 20, 40, 80, 100; $FeSO_4$ – 20, 40, 80, 100. Выбор ТМ и их действующих концентраций был основан на литературных данных о содержании ТМ в буровых шламах [11, 12].

Все исследования проводили не менее, чем в трех повторностях. Математическую обработку полученных данных выполняли с использованием компьютерной программы Microsoft Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как было установлено на первом этапе исследования изолированных из буровых шламов бактерий, все исследуемые микроорганизмы характеризовались активным ростом на среде с нефтепродуктами (нефть, дизельное топливо, минеральное и вазелиновое масло, буровой раствор на углеводородной основе) и с различной интенсивностью использовали индивидуальные нефтяные углеводороды в качестве единственного источника углерода и энергии (статья находится в печати). В целом, выделенные бактерии отличались широким субстратным спектром в отношении нефтяных углеводородов.

Поэтому далее мы исследовали поверхностно-активные свойства изолированных культур, т.к. известно, что нередко нефтеокисляющие бактерии способны к синтезу биосурфактантов, облегчающих поглощение углеводородов клетками бактерий [13]. В ходе проведенных исследований было показано, что все бактерии проявили высокую эмульгирующую активность по отношению к нефти, образовавшиеся нефтяные эмульсии обладали достаточной стабильностью. Эндогенная

эмульгирующая активность через 24 часа составила у разных культур 55-97%, максимальная активность обнаруживалась у штамма *Bacillus firmus* ОБР 3.1 (рис. 1а).

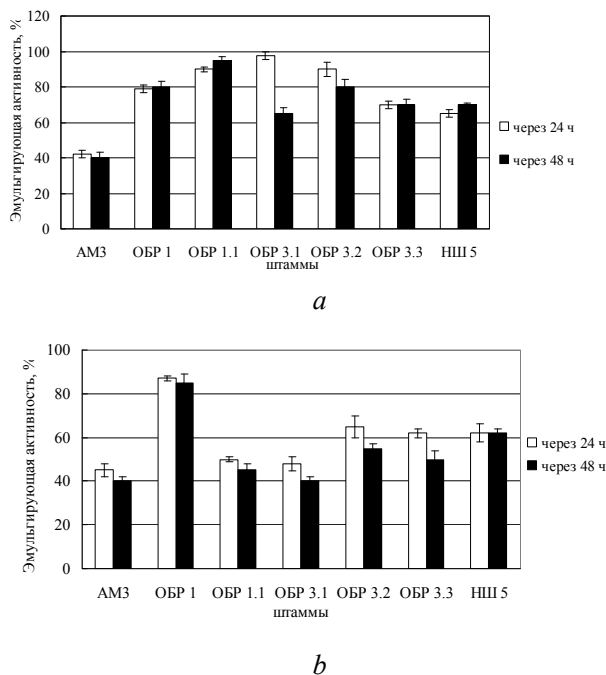


Рис. 1. Эндогенная (а) и экзогенная (b) эмульгирующая активность по отношению к нефти

Через 48 часов активность также была высокой – 56-90%. Экзогенная активность через 24 часа составляла 40-87%, через 48 часов – 40-85% (рис. 1б). Микробный штамм *Halomonas* sp. ОБР 1 отличался высокими показателями как экзогенной, так и эндогенной активности по отношению к нефти. Для сравнения, в данных экспериментах мы использовали нефтеокисляющий микроорганизм *Dietzia maris* AM3, полученный из коллекции непатогенных микроорганизмов ИБФРМ РАН (г. Саратов) [14]. Важно отметить, что эмульгирующая активность *D. maris* AM3 была значительно ниже показателей эмульгирующей активности штаммов, выделенных из буровых шламов. По отношению к дизельному топливу все изучаемые культуры проявили сходную эндогенную и экзогенную эмульгирующую активность, порядка 40% через 24 и 48 ч, что сравнимо

с соответствующими показателями для *D. maris* AM3. Эти результаты свидетельствуют о возможных преимуществах данных микроорганизмов в процессах утилизации нефтяных углеводородов, т.к. биоэмульгирующая активность микроорганизмов в сочетании с биodeградирующей способностью сможет обеспечить большую биодоступность углеводородов в различных условиях, в том числе, в составе буровых шламов.

Известно, что нефтеокисляющие бактерии, взаимодействуя с углеводородным субстратом, способны к непосредственному контакту с углеводородом за счет гидрофобной клеточной поверхности, обусловленной наличием в ней липидных компонентов [15, 16]. При культивировании на углеводородных субстратах нередко происходят изменения в составе липидных комплексов клеточной оболочки нефтеокисляющих бактерий, вследствие чего меняется гидрофобность клеточной поверхности [17]. В связи с этим, мы изучали показатель гидрофобности клеток при культивировании микроорганизмов на полноценной питательной среде и на минеральной среде с глицерином в качестве единственного источника углерода и энергии. Как показали эксперименты, не все культуры характеризовались высокими значениями гидрофобности клеточной поверхности. Исключением явился бактериальный штамм *Bacillus firmus* ОБР 3.1, ПГ которого составил – 70 и 66% при культивировании его на питательной среде и на минеральной среде с глицерином. Данный микроорганизм обнаруживал также самые высокие значения эндогенной эмульгирующей активности. Также, у ряда культур наблюдалось значительное увеличение ПГ после культивирования их на гидрофобном источнике углерода (глицерине), что связано, по всей видимости, с вариациями в составе клеточных стенок бактерий.

В связи с тем, что исследуемые бактериальные штаммы были выделены из среды с высоким значением pH и высокой степенью минерализации, был проведен эксперимент по выявлению устойчивости этих микроорганизмов к щелочной и минерализованной питательной среде. У всех исследуемых бактерий был обнаружен заметный рост в МПБ при pH 8,0 (табл. 1).

Таблица 1. Оценка роста бактерий в МПБ в диапазоне pH и концентраций NaCl

Штаммы	Рост бактерий									
	pH					содержание соли NaCl, % по объему				
	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	3,5	6,5	10,0	12,0	15,0
<i>Halomonas</i> sp. ОБР 1	+++	+	-	-	-	++	++	++	+	-
<i>Bacillus firmus</i> ОБР 1.1	++	++	++	+-	+-	++	++	+	+-	+-
<i>Bacillus firmus</i> ОБР 3.1	+-	+-	-	-	-	++	++	-	-	-
<i>Solibacillus silvestris</i> ОБР 3.2	+-	+	-	-	-	++	++	++	++	++
<i>Bacillus circulans</i> ОБР 3.3	+	+	-	-	-	++	++	+-	-	-
<i>Bacillus 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.

Установлено, что *Bacillus firmus* ОБР 1.1 и *Bacillus circulans* НШ устойчивы к повышенной щелочности среды. Они отличались значительным ростом при pH 9,0, микроорганизм *Bacillus circulans* НШ также хорошо рос при pH 10,0, при pH 11,0 оба микробных штамма проявляли слабый рост. При этом данные бактерии не являлись строгими алкалофилами, т.к. интенсивно росли в МПБ при pH 7,0.

Все исследуемые бактерии хорошо росли в МПБ с 3,5 и 6,5%-ным содержанием NaCl (табл. 1). При 10%-ной концентрации NaCl наблюдался заметный рост у 4 микробных штаммов, не рос при этой концентрации соли *Bacillus firmus* ОБР 3.1. Среди изученных микроорганизмов выделялись *Solibacillus silvestris* ОБР 3.2 и *Bacillus circulans* НШ, которые характеризовались очень интенсивным ростом в питательной среде с 12 и 15%-ной концентрацией NaCl.

Выявленный широкий диапазон роста данных штаммов может свидетельствовать об их адаптации к условиям повышенной щелочности и солености. Способность к росту при высоких значениях pH обеспечивает микроорганизмам опреде-

ленные преимущества в детоксикации буровых шламов, т.к. в таких условиях конкуренция со стороны большинства других организмов невелика.

Токсичность буровых шламов обусловлена не только присутствием компонентов, входящих в состав буровых растворов. К основным токсикантам шламов относятся ТМ, которые поступают в них вместе с выбуренной породой [11]. Поэтому одним из определяющих условий использования микробиологического способа для детоксикации буровых шламов является резистентность микроорганизмов-деструкторов к высоким концентрациям ТМ в окружающей среде. Как было показано, все исследованные микроорганизмы хорошо росли на среде с NiSO₄ (20-100 мг/л), FeSO₄ (20-100 мг/л) и Pb(NO₃)₂ (40-600 мг/л), что свидетельствует о наличии перекрестной устойчивости изученных бактерий к данным ТМ. Для оценки уровня индивидуальной металлоустойчивости бактериальных штаммов была рассчитана минимальная ингибирующая концентрация (МИК) соли каждого металла. Результаты эксперимента представлены в таблице 2.

Таблица 2. Уровень металлоустойчивости бактерий

Штаммы	МИК солей металлов, мг/л					
	Cu	Pb	Cd	Zn	Ni	Fe
<i>Halomonas</i> sp. ОБР 1	400	600	70	440	100	100
<i>Bacillus firmus</i> ОБР 1.1	300	600	70	440	100	100
<i>Bacillus firmus</i> ОБР 3.1	300	600	100	440	100	100
<i>Solibacillus silvestris</i> ОБР 3.2	600	600	100	440	100	100
<i>Bacillus circulans</i> ОБР 3.3	300	600	70	440	100	100
<i>Bacillus circulans</i> НШ	400	600	100	440	100	100

Высокая концентрация Zn (II) в среде (440 мг/л) ингибировала рост бактерий: *Halomonas* sp. ОБР 1, *Bacillus circulans* НШ, при этом низкие и средние концентрации соли цинка не угнетали рост этих микроорганизмов. Остальные бактерии хорошо росли при всех концентрациях цинка в среде. Бактериальный штамм *Solibacillus silvestris* ОБР 3.2 отличался от других изученных микроорганизмов отчетливым ростом на среде с повышенным содержанием CuCl₂ (400, 500 мг/л) и CdCl₂ (70, 100 мг/л). Рост всех остальных бактерий при содержании в среде CuCl₂ в количестве 300 и 400 мг/л ингибировался. Низкие концентрации соли кадмия в среде (20 и 40 мг/л) не влияли на рост всех изученных бактерий, а более высокие (70 и 100 мг/л) подавляли их рост, за исключением *Solibacillus silvestris* ОБР 3.2, *Bacillus circulans* 3.1 и *Bacillus circulans* НШ, которые были устойчивы к действию данного металла в различных дозах.

В целом, проведенные исследования показали, что все протестированные нами микроорганизмы обладают устойчивостью по отношению ко всем исследованным ТМ, наиболее распространенным в буровых шламах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что все выделенные нами из буровых шламов микроорганизмы обладают уникальными эколого-функциональными особенностями, они не только характеризуются высокой эмульгирующей и деструктивной активностью по отношению к нефтепродуктам, но и полирезистентны к действию тяжелых металлов, а также устойчивы к повышенной минерализации и щелочности среды. Эти свойства бактерий-деструкторов открывают перспективу практического использования изолированных микроорганизмов в биотехнологиях детоксикации буровых отходов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Быков И.Ю. Техника экологической защиты Крайнего Севера при строительстве скважин. Л.: Издательство Ленинградского университета, 1991. С. 210–220.
2. Рязанов Я.А. Энциклопедия по буровым растворам. Оренбург: Изд-во «Летопись», 2005. С. 644–646.
3. Ягафарова Г.Г., Барахнина В.Б. Утилизация экологически опасных буровых отходов // Нефтегазовое дело. 2006. № 2. С. 48–61.

4. Балаба В.И. Обеспечение экологической безопасности строительства скважин на море // Бурение и нефть. 2004. № 1. С. 18–21.
5. Герасимова М.С. Выбор технологии обезвреживания и утилизации отработанных буровых растворов // Материалы II Международной научной студенческой конференции «Научный потенциал студенчества – будущему России». Т. 3. Охрана окружающей среды и экология. Ставрополь: СевКавГТУ, 2008. С. 101–102.
6. Булатов А.И. Технология промывки скважин. М.: Изд-во «Недра», 1981. С. 234–241.
7. Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surface active agents from two *Vacillus species* // Appl. Environ. Microbiol. 1987. Vol. 53, № 2. P. 224–229.
8. Серебрякова Е.В., Дармов И.В., Медведев Н.П., Алексеев С.А., Рыбак С.И. Оценка гидрофобных свойств бактериальных клеток по адсорбции на поверхности капель хлороформа // Микробиология. 2002. Т. 71, № 2. С. 237–239.
9. Волченко Н.Н. Влияние условий культивирования на поверхностно-активные свойства углеводородокисляющих актинобактерий: Автореф. дис...канд. биол. наук. Ставрополь, 2006. 20 с.
10. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. С. 242–246.
11. Бранулоу А.Х. Геохимия. М.: Недра, 1984. С. 154–159.
12. Хаустова, А.П. Редина М.М. Охрана окружающей среды при добычи нефти. М.: Дело, 2006. С. 324–326.
13. Коронелли Т.В., Нестерова Е.Д. Экологическая стратегия бактерий, использующих гидрофобный субстрат // Микробиология. 1990. Т. 59, вып. 6. С. 993–997.
14. Пleshakova Е.В., Матора Л.Ю., Турковская О.В. Нефтеокисляющий штамм *Dietzia maris* и возможности его использования для биоремедиации загрязненной почвы // Вестник МГОУ. Серия Естественные науки. 2010. № 4. С. 82–89.
15. Яскович Г.А. Роль гидрофобности клеточной поверхности в адсорбционной иммобилизации штаммов бактерий // Прикл. биохим. и микробиол. 1998. Т. 34, № 4. С. 410–413.
16. Zhang Y., Miller R.M. Effect of rhamnolipid (biosurfactant) on solubilization and biodegradation of n-alkanes // Appl. and Environ. Microbiol. 1995. Vol. 61. P. 2247–2251.
17. Коломынцева М.П., Соляникова И.П., Головлев Е.Л., Головлева Л.А. Гетерогенность *Rhodococcus opacus* 1CP как ответ на стрессовое воздействие хлорфенолов // Прикл. микробиол. и биохим. 2005. Т. 41, № 5. С. 541–546.
18. Никовская Г.Н. Адгезионная иммобилизация микроорганизмов в очистке воды // Химия и технология воды. 1989. Т. 5, № 2. С. 158–169.

ENVIRONMENTAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF BACTERIA ISOLATED FROM DRILL CUTTINGS

© 2014 A.Yu. Belyakov, E.V. Pleshakova, V.A. Amangalieva

Saratov State University named after N.G. Chernyshevsky

Ecological and functional properties of bacteria isolated from the drill cuttings were studied. It is shown that the isolated bacteria possess high endogenous and exogenous emulsifying activity against oil, resistance towards the most common heavy metals in the drilling cuttings and are stable to high alkalinity and mineralization of the medium.

Key words: microorganisms-destroyers, oil- and water-based mud, emulsifying activity, indicator of hydrophobicity, heavy metals.