

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

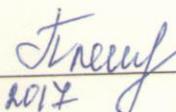
**ОСОБЕННОСТИ ДЕГРАДАЦИИ УГЛЕВОДОРОДОВ БАКТЕРИЯМИ,
ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ БУРОВЫХ ШЛАМОВ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студента 2 курса 241 группы
направления 06.04.01 - «Биология»
биологического факультета
Деева Дмитрия Вячеславовича

Научный руководитель:

профессор кафедры биохимии и биофизики,
д.б.н., доцент


21.06.2017

Е.В. Плешакова

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,
д.б.н., профессор


21.06.2017

С.А. Коннова

Саратов 2017

Введение. Крупнейшей проблемой, стоящей перед человечеством, является разрушение естественных экосистем под действием антропогенной нагрузки. Одним из основных факторов давления общепризнанно считается накопление в биосфере всевозможных поллютантов, в том числе, сырой нефти и продуктов её переработки. Спрос на нефть и нефтепродукты растёт благодаря постоянно увеличивающимся темпам индустриализации. Потери нефти только в России достигают 50 млн. тонн в год, из них более трети – за счёт аварийных ситуаций; при переработке нефти ежегодно образуется 700 тыс. тонн отходов. Они создают проблему загрязнения окружающей среды из-за неправильных методов утилизации и удаления из почвы возле нефтеперерабатывающих предприятий и мест добычи нефтепродуктов [1]. Опасными загрязнителями являются буровые шламы – суспензии на водной/углеводородной основе, твёрдая часть которой состоит из продуктов разрушения горных пород забоя и стенок скважины, продуктов истирания бурового снаряда и обсадных труб, глинистых минералов (при промывке глинистым раствором). По своему объёму буровые шламы являются самыми крупными отходами, образующимися во время разведки и разработки нефтяных и газовых месторождений.

Процесс естественного восстановления загрязнённых нефтяными углеводородами (УВ) почв длителен и ставит вопрос о создании и внедрении современных технологий рекультивации нарушенных территорий. Механические и физические методы не могут обеспечить полное удаление нефти из загрязнённой почвы/грунта, а процесс естественного разложения чрезвычайно длителен. Разложение углеводородов в почве – процесс биохимический, в котором основную роль играет функциональная активность комплекса почвенных микроорганизмов. Способность использовать нефть в качестве источника энергии присуща не единичным специализированным формам, а многим бактериям и грибам. Важным звеном в деструкции нефти и нефтепродуктов являются углеводородокисляющие микроорганизмы.

Использование биотехнологического метода для детоксикации буровых шламов ограничивается многокомпонентным составом пропитывающих их

буровых растворов в связи с известным синергическим действием ряда ксенобиотиков [2], 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, и повышенная минерализация (до 15%), обусловленная как использованием солей в составе буровых растворов, так и бурением солевых отложений. Поэтому микроорганизмы, разлагающие углеводороды и адаптированные к росту и развитию в подобных экстремальных условиях, играют важную роль в утилизации отходов бурения.

В связи с этим, целью наших исследований являлась оценка способности микроорганизмов, выделенных из буровых шламов, к деградации нефтяных углеводородов в нормальных и экстремальных условиях. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Изучить субстратный спектр бактерий, выделенных из буровых шламов, по отношению к буровому раствору на углеводородной основе, его дисперсионным средам (нефти и нефтепродуктам) и индивидуальным углеводородам.

2. Количественно оценить степень деструкции нефти исследуемыми бактериями.

3. Определить деструктивную активность бактерий *Bacillus circulans* НШ и *Bacillus firmus* ОБР 1.1 по отношению к нефти при культивировании их в условиях повышенной солёности и щёлочности среды.

4. Оценить степень деструкции нефти модельной микробной ассоциацией в экстремальных экологических условиях.

В работе использовали микроорганизмы (7 штаммов), выделенные Беляковым А.Ю. [3] 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 по последовательности гена 16S рНК в ВНИИСБ (г. Москва) были идентифицированы, как: *Bacillus circulans* [Jordan, 1890] НШ, *B. firmus* [Werner, 1933] ОБР 1.1, *B. firmus* ОБР 3.1, *Solibacillus silvestris* [Rheims *et al.*, 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 [3]. 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).

Для культивирования микроорганизмов использовались следующие среды: а) полноценные питательные среды: мясопептонный агар (МПА); среда Luria-Bertani (LB), г/л: триптон Bacto – 10,0; дрожжевой экстракт Bacto – 5,0; NaCl – 10,0 [4]; б) синтетическая минеральная среда М9 (г/л): Na₂HPO₄ – 6,0; KH₂PO₄ – 3,0; NaCl – 0,5; NH₄Cl – 1,0 [5]. В качестве единственного источника углерода и энергии в минеральной среде в разных экспериментах использовали различные индивидуальные углеводороды и нефтепродукты. Бактериальные культуры выращивали при 28-30°C в стационарных условиях в термостате или в настольном шейкере-инкубаторе PSU-10i (BioSan).

Бактерии культивировали в жидкой минеральной среде М9 с нефтью (0,4 и 1% по весу) в качестве единственного источника углерода и энергии при различных значениях pH и содержании NaCl в среде в условиях аэрации 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 щёлочностью (pH 9) и/или повышенной минерализацией (10% NaCl). В качестве контроля использовали минеральную среду с углеводородным субстратом без микроорганизмов и нормальным/повышенным содержанием NaCl и значением pH. В качестве

посевого материала использовали смыв суточной культуры бактерий (в случае *D. maris* AM3 – трёхсуточной) с МПА физиологическим раствором. Оптическая плотность посевной дозы составляла 1,0 ед. при длине волны 540 нм. Каждый вариант изучали в трёх повторностях.

Деструктивную активность бактериальных культур оценивали методом адсорбционной хроматографии с последующим гравиметрическим анализом, извлекая сумму неполярных и малополярных углеводов из культуральной жидкости органическим растворителем (хлороформом) с одновременной очисткой элюата на окиси алюминия в хроматографической колонке [6]. По полученным результатам рассчитывали степень деструкции, которую выражали в процентах:

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

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

Магистерская работа состоит из введения, 3-х глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования), заключения, выводов, списка использованных источников, включающего 49 источников русских и зарубежных авторов.

Научная новизна и значимость работы: Установлено, что исследованные бактерии, выделенные из буровых шламов, в связи с особенностями источника выделения адаптированы к химическим реагентам, составляющим основу буровых шламов, и к экстремальным условиям обитания, связанным с повышенной солёностью и щёлочностью. Выявленные свойства микробных штаммов *B. firmus* ОБР 1.1 и *B. circulans* НШ, такие как: высокая углеводородокисляющая активность и широкий адаптационный потенциал свидетельствуют о возможности их использования, а также модельной

ассоциации (*B. firmus* ОБР 1.1 + *D. maris* АМЗ) в технологиях микробной утилизации буровых шламов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Бактерии, выделенные из буровых шламов, характеризуются широким субстратным спектром в отношении нефтяных углеводов разной степени токсичности, высокой деструктивной активностью по отношению к нефти.

2. Бактерии *B. firmus* ОБР 1.1 и *B. circulans* НШ способны осуществлять деструкцию углеводов нефти при повышенной щёлочности и минерализации среды как индивидуально, так и в ассоциации с нефтеокисляющим микроорганизмом *D. maris* АМЗ.

Основное содержание работы. При изучении деструктивного потенциала микроорганизмов было показано, что все они характеризовались отчётливым ростом на среде, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии: буровой раствор на углеводородной основе, а также нефтепродукты, которые часто являются дисперсионной средой буровых растворов – это нефть, дизельное топливо, вазелиновое масло (таблица 1). Все исследованные бактерии отличались отчётливым ростом на всех используемых нефтепродуктах, за исключением штамма *S. silvestris* ОБР 3.2, рост которого в вариантах с вазелиновым маслом и дизельным топливом не наблюдался. На индивидуальных нефтяных углеводородах исследуемые бактерии росли с различной интенсивностью. Среди них выделялись несколько штаммов (*B. firmus* ОБР 1.1 и ОБР 3.1; *B. circulans* ОБР 3.3 и НШ), которые активно использовали для роста все тестируемые нами нефтепродукты и большинство индивидуальных углеводов. Следует отметить, что, несмотря на высокую токсичность ароматических углеводов [6], микробный штамм *B. firmus* ОБР 1.1 отличался отчётливым ростом на среде с толуолом и едва выраженным ростом на среде с нитробензолом. Бактерии *B. firmus* ОБР 3.1, *S. silvestris* ОБР 3.2 и *B. circulans* ОБР 3.3 характеризовались отчётливым ростом на среде с бензолом. Все исследованные бактерии оказались не способны усваивать циклогексан и нафталин в качестве единственного источника углерода, что

свидетельствует о высокой токсичности нефтяных углеводородов и ПАУ для данных микроорганизмов.

Таблица 1 – Субстратный спектр микроорганизмов, выделенных из буровых шламов

Субстрат	Рост штаммов						
	<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>Erwinia rhaпонici</i> ОБР 4.1	<i>Halomonas</i> sp. ОБР 1	<i>Bacillus circulans</i> НШ
буровой раствор на УВ-основе	+	+	+	+	+	+	+
нефть	+	+	+	+	+	+	+
вазелиновое масло	+	+	-	+	+	+	+
дизельное топливо	+	+	-	+	+	+	+
н-алканы:							
гексан	+-	+-	+	+	+-	+-	+-
гептан	+-	+	+	+-	+	+	+
октан	+-	+-	+	+-	-	-	+-
декан	+-	+-	+	+	+-	+-	+-
гексадекан	+	+	+	+	-	+-	+
ароматические углеводороды:							
бензол	-+	+	+	+	-+	-+	-+
толуол	+	-+	-	+-	-	-	-+
ксилол	-+	+	-	+	-+	-+	+
кумол	-	-	-	-	-	-	-
нитробензол	+-	-	-	-	-	-+	-
нафтены:							
циклогексан	-	-+	-	-	-	-	-
ПАУ:							
нафталин	-	-	-	-	-	-	-

Примечания: 1 «-» – отсутствие роста; 2 «+» – едва выраженный рост; 3 «+-» – заметный рост; 4 «+» – отчётливый рост.

При количественном анализе способности к деструкции УВ у всех изученных микроорганизмов обнаруживалась деструктивная активность по отношению к нефти (04% по весу), которая составила 31-40% за 10 суток культивирования (рисунок 1).

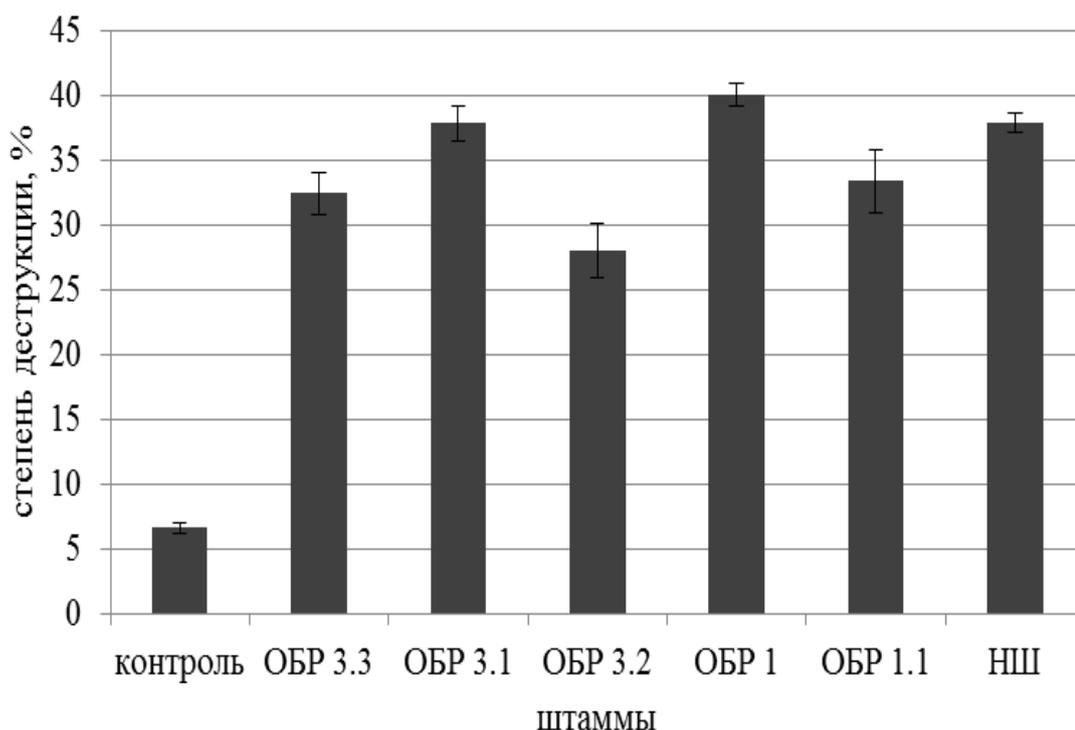


Рисунок 1 – Деструкция нефти (0,4% по весу) бактериями через 10 сут. культивирования в жидкой среде.

Максимальная активность наблюдалась у штаммов *B. firmus* ОБР 3.1 и *B. circulans* НШ (37,5%), *Halomonas* sp. ОБР 1 – 39,7%.

Итак, было показано, что все выделенные из буровых шламмов бактерии хорошо усваивают нефть в качестве единственного источника углерода и энергии, что может быть связано с источниками их выделения (нефтяные скважины) и, как следствие, их многолетней адаптацией к данному субстрату как источнику питания.

Для дальнейших 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. Деструктивную активность бактерий в нормальных условиях (рН 7, 0,5%-ное содержание NaCl), а также в условиях щелочной среды (рН 9) и/или повышенной степени минерализации (10% NaCl)

определяли после 14 сут. культивирования в жидкой минеральной среде с нефтью (1% по весу) по остаточному содержанию нефтяных углеводов.

Количественный анализ остаточного содержания общих нефтяных углеводов при культивировании бактерий в нормальных условиях показал, что повышенная степень деструкции УВ по сравнению с контролем наблюдалась у штамма *B. circulans* НШ. Степень деструкции нефтяных углеводов составила 56% (таблица 2). Количество нефти при этом снизилось на 13%. Убыль нефтяных УВ при культивировании *B. firmus* ОБР 1.1 происходила, согласно полученным результатам, на 32%.

В условиях щелочной среды (рН 9) и повышенной степени минерализации (10% NaCl) у исследованных бактерий наблюдались следующие результаты. Степень деструкции УВ в среде с рН 9 у *B. circulans* НШ составила 62%, что превышает данный показатель при культивировании данного микроорганизма в обычных условиях. Степень деструкции УВ в среде с 10%-ным содержанием NaCl составила 42%. Деструктивная активность у штамма *B. firmus* ОБР 1.1 при культивировании его в экстремальных условиях, была несколько ниже, чем у *B. circulans* НШ. Общее содержание нефтепродуктов снизилось в условиях рН 9 на 36%, в условиях повышенной минерализации – на 22%.

Как известно, наиболее эффективная деструкция УВ происходит при применении ассоциации углеводородокисляющих микроорганизмов. Основу таких ассоциаций должны составлять микроорганизмы, обладающие наибольшей активностью по окислению нефтяных углеводов и высокой технологичностью. Также стоит учитывать способность микроорганизмов дифференцированно окислять различные составляющие нефти. В связи с этим мы исследовали способность к деструкции нефтяных углеводов в экстремальных условиях у модельной ассоциации штаммов *B. firmus* ОБР 1.1 + *D. maris* АМЗ. Количественный анализ остаточного содержания общих нефтяных углеводов при культивировании бактерий в экстремальных условиях (рН 9; 10% NaCl) показал, что у модельной ассоциации штаммов:

B. firmus ОБР 1.1 + *D. maris* АМЗ наблюдалась повышенная степень деструкции УВ по сравнению с контролем, которая составила 44,9% (таблица 2).

Таблица 2 – Деструкция нефти (1% по весу) бактериями через 14 сут. культивирования

Варианты	Условия культивирования		Степень деструкции общих углеводородов, %
	Значение pH	Содержание NaCl, %	
	<i>нормальные условия</i>		
<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
	<i>повышенная щёлочность</i>		
<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
	<i>повышенная солёность</i>		
<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
	<i>повышенная щёлочность и солёность</i>		
<i>D. maris</i> АМЗ	9	10	39±1,3
<i>B. firmus</i> ОБР 1.1	9	10	26±1,9
<i>B. firmus</i> ОБР 1.1 + <i>D. maris</i> АМЗ	9	10	45±3,8
Контроль	9	10	6±0,9

Деструктивная активность у *B. firmus* ОБР 1.1 при культивировании его в экстремальных условиях, была несколько ниже, чем в его ассоциации с *D. maris* АМЗ, составляя 26,2%.

Заключение. 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. Было показано, что все бактерии характеризовались отчетливым ростом на среде, содержащей буровой раствор на углеводородной основе, а также нефтепродукты: нефть, дизельное топливо, вазелиновое масло. Среди изученных бактерий выделились несколько штаммов (*B. firmus* ОБР 1.1 и ОБР 3.1; *B. circulans* ОБР 3.3 и НШ), которые активно использовали для роста тестируемые нами нефтепродукты и индивидуальные углеводороды.

У всех исследованных микроорганизмов была обнаружена способность к деструкции нефти. Максимальная деструктивная активность отмечена у *Halomonas* sp. ОБР 1 (40% за 10 сут. культивирования). *B. circulans* НШ и *B. firmus* ОБР 3.1 деградировали нефть на 38%. Было показано, что в условиях повышенной солёности и щёлочности среды бактерии *B. circulans* НШ и *B. firmus* ОБР 1.1 также способны к деструкции нефти. Высокая степень деструкции нефти в условиях повышенной солёности и щёлочности среды обнаруживалась у модельной ассоциации бактерий: *B. firmus* ОБР 1.1 и *D. maris* АМЗ – 45% за 14 сут. Выявленные характеристики бактерий позволяют рассматривать их как потенциальных интродуцентов (как отдельно, так и в ассоциациях) для использования в технологиях очистки отходов бурения.

Выводы:

1. У исследованных бактерий показан широкий субстратный спектр по отношению к нефтепродуктам и индивидуальным нефтяным углеводородам.

2. Установлено, что степень деструкции нефти (0,4% по весу) при культивировании бактериальных штаммов в течение 10 суток в жидкой среде составляет 31-40%. Максимальная деструктивная активность по отношению к

нефти наблюдается у бактерий *Halomonas* sp. ОБР 1 – 39,7%; *B. firmus* ОБР 3.1 и *B. circulans* НШ – 37,5%.

3. Показано, что при культивировании *B. circulans* НШ и *B. firmus* ОБР 1.1 в течение 14 сут. в нормальных условиях степень деструкции нефти (1% по весу) составляет 56 и 32%; в среде с рН 9 – 62 и 36%; в среде с 10% NaCl – 42 и 22%.

4. Максимальная степень деструкции нефти в условиях повышенной солёности и щёлочности среды выявлена у модельной ассоциации бактерий: *B. firmus* ОБР 1.1 и *D. maris* АМЗ. Через 14 сут. культивирования она составила 45%, и была выше, чем активность индивидуальных штаммов *D. maris* АМЗ и *B. firmus* ОБР 1.1, выращенных в аналогичных условиях.

Список использованных источников

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

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

3. Беляков, А. Ю. Скрининг микроорганизмов-деструкторов компонентов буровых растворов / А. Ю. Беляков, Е. В. Плешакова // Известия СГУ. Серия Химия. Биология. Экология. 2013. Т. 13, №. 4. С. 37–43.

4. Панченко, Л. В. Введение в практические занятия по экологической биотехнологии с основами микробиологии / Л. В. Панченко, А. Ю. Муратова, О. В. Турковская. Саратов: Изд-во «Научная книга», 2005. 56 с.

5. Теппер, Е. З. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. М.: Изд-во «Колос», 1993. 175 с.

6. РД 52.18.647-2003. Российская Федерация. Методические указания определения массовой доли нефтепродуктов в почвах / М. А. Запечалов [и др.]. Разр. «Тайфун». Утв. Росгидрометом 18.03.2003. Введен. 01.06.2003. 16 с.

7. Иваненко, Н. В. Экологическая токсикология. Учебное пособие / Н. В. Иваненко. М.: ВГУЭС, 2006. 90 с.