

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
профессионального образования
«Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

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

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, доцент
Плешакова Екатерина Владимировна

Саратов – 2014

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Химическая и токсикологическая характеристика буровых шламов.....	11
1.1.1 Классификация компонентов, входящих в состав буровых растворов на углеводородной основе.....	11
1.1.2 Токсичность буровых шламов.....	15
1.1.3 Токсичность компонентов буровых растворов на углеводородной основе...	17
1.2 Способы детоксикации буровых шламов.....	22
1.3 Биологические методы утилизации буровых отходов: преимущества и перспективы.....	25
1.3.1 Микробная деградация нефтяных углеводородов.....	29
1.3.2 Факторы, влияющие на развитие микроорганизмов-деструкторов загрязнителей и эффективность обезвреживания буровых шламов.....	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	38
2.1 Объекты исследования.....	38
2.2 Питательные среды и условия культивирования бактерий.....	39
2.3 Методы выявления бактерий-деструкторов компонентов буровых шламов....	40
2.4 Методы изучения биологических и деструктивных свойств микроорганизмов.....	41
2.5 Оценка токсического воздействия на почву компонентов буровых шламов....	48
2.5.1 Условия проведения модельного эксперимента, характеристика почвы, загрязнителей.....	48
2.5.2 Метод определения токсичности почвы с использованием дождевых червей.....	49
2.5.3 Метод определения фитотоксичности почвы.....	51
2.5.4 Определение токсичности почвы по дегидрогеназной активности бактерий.....	52

2.5.5 Расчет индексов токсичности почвы.....	53
ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НА ПОЧВУ ИНВЕРТНО-ЭМУЛЬСИОННЫХ БУРОВЫХ РАСТВОРОВ, ДИСПЕРСИОННЫХ СРЕД И ОСНОВНЫХ КОМПОНЕНТОВ, ВХОДЯЩИХ В ИХ СОСТАВ.....	54
3.1 Результаты биотестирования с использованием дождевых червей.....	55
3.2 Результаты фитотестирования.....	62
3.3 Результаты определения токсичности почвы по дегидрогеназной активности <i>Dietzia maris</i> АМЗ.....	68
3.4 Интегральная токсичность исследованных образцов почв.....	72
ГЛАВА 4. ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ ИЗ БУРОВЫХ ШЛАМОВ, ИХ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОЦЕНКА ДЕСТРУКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА.....	77
4.1 Скрининг микроорганизмов-деструкторов компонентов буровых растворов..	77
4.2 Морфологические и физиолого-биохимические характеристики изолированных культур.....	81
4.3 Субстратный спектр бактерий, выделенных из буровых шламов.....	87
4.4 Количественная оценка деструкции нефтепродуктов бактериями, выделенными из буровых шламов.....	90
ГЛАВА 5. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БУРОВЫХ ШЛАМОВ.....	96
5.1 Поверхностно-активные свойства бактерий, изолированных из буровых шламов.....	96
5.1.1 Оценка гидрофобно-гидрофильных свойств выделенных бактерий.....	96
5.1.2 Оценка эмульгирующей активности у микроорганизмов.....	101
5.2 Эколого-функциональные свойства выделенных бактерий.....	105
5.2.1 Исследование устойчивости бактерий к тяжелым металлам.....	105
5.2.2. Рост бактерий в диапазоне pH и концентраций NaCl.....	110
5.2.3 Оценка экологической безопасности и конкурентной способности у выделенных штаммов.....	115

5.3 Оценка степени деструкции нефти модельными ассоциациями бактерий и составляющими их штаммами в экстремальных и нормальных условиях.....	121
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	128
ВЫВОДЫ.....	137
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	139
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	140
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	171

ВВЕДЕНИЕ

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; Benka-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 углеводов, 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 разбуhrиванием 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 (pH 7-9), *B. circulans* НШ (pH 7-10;

15% NaCl), *S. silvestris* ОБР 3.2 (15% NaCl; высокие концентрации Cu^{2+} (189 мг/л) и 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 углеводородов: *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 (научный руководитель доцент, д.б.н. Плешакова Е.В.). Идентификация бактерий по последовательности гена 16S рРНК выполнена в ВНИИСБ (г. Москва).

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Химическая и токсикологическая характеристика буровых шламов

1.1.1 Классификация компонентов, входящих в состав буровых растворов на углеводородной основе

В целях сохранения коллекторских свойств продуктивных пластов и предупреждения осложнений в ходе бурения неустойчивых разрезов в последние десятилетия были разработаны и стали активно использоваться в промышленных масштабах РУО. (Исламов, 2011; Jill, 2002). РУО в основном применяются при бурении скважин со сложным геологическим разрезом, когда требуется буровой раствор с высокой ингибирующей способностью. Их считают наиболее эффективными буровыми растворами, поскольку какой-либо контакт между разбуриваемыми пластами и водой отсутствует, в результате чего повышается устойчивость стенок ствола скважины. К дополнительным преимуществам РУО относится высокая смазывающая и выносная способность, что увеличивает механическую скорость проходки (Сушкова, 2005; Янг, Рамсес, 2006).

РУО подразделяются на безводные и инвертно-эмульсионные буровые растворы, в состав которых входит дисперсионная среда и дисперсионная фаза. В качестве дисперсионной среды в РУО может выступать нефть и различные нефтепродукты, такие как дизельное топливо (ДТ) и минеральное масло. Дисперсионная фаза данных буровых растворов включает: смачивающие агенты, эмульгаторы, структурообразователи, регуляторы реологии, плотности и фильтрации, водную фазу различной степени минерализации (Соловьев, 2003).

Основу РУО составляет углеводородная фаза, которая определяет их физико-химические и технологические свойства (Jill, 2002). Критерием выбора углеводородной фазы в первую очередь является температура вспышки (Bailey, Peden, 2000), которая должна на 30°C превышать температуру выходящего из скважины бурового раствора (или на 50°C температуру самовоспламенения). В последнее время серьезное внимание при выборе дисперсионной среды уделяется и ее токсичности для окружающей среды (Сушкова, 2005). Анализ современных

литературных и промысловых данных позволил Т.С. Смирновой (2011) классифицировать дисперсионные среды, входящие в состав РУО, следующим образом:

1. углеводородные жидкости природного происхождения – газоконденсаты и нефти;
2. продукты нефтепереработки, газоконденсата – керосины, минеральные масла, парафины, ДТ;
3. продукты нефтехимического синтеза и синтеза на основе растительного и животного сырья – олефины, их олигомеры, линейные алкилбензолы, полиолефины, ацетали, простые и сложные эфиры;
4. отходы нефтеперерабатывающей промышленности.

В состав дисперсионных сред РУО входят в основном жидкие углеводороды с числом атомов углерода от C_5 до C_{30} , многие из которых представляют собой сложные смеси. К наиболее распространенным дисперсионным средам РУО относятся: ДТ, нефть и минеральное масло (Смирнова, 2011; Young, 1994; Bailey, Peden, 2000).

Несмотря на то, что эмульгированная вода, входящая в состав ИЭР, приводит к увеличению реологических параметров, в буровые растворы добавляют специальные загустители (структурообразователи) и гелеобразующие реагенты (Смирнова, 2011). Реагенты – структурообразователи чаще всего представлены коллоидной фазой (Jill, 2002):

- органического состава (асфальто-смолистые вещества: битумы, сажа, углерод, нефтерастворимые полимеры, мыла высокомолекулярных органических кислот);
- неорганического состава – тонкодисперсные минеральные наполнители (мел, глины, асбест), синтетическая конденсированная твердая фаза (гидроксокарбонаты поливалентных металлов, гидроксилы) и эмульгированная водная фаза;
- смешанного состава (неорганические наполнители, обработанные поверхностно-активными веществами для придания им гидрофобизации, такие

как: монтмориллонитовые глины, модифицированные четвертичными аммонийными солями, органоглины).

Структурообразователи используются для повышения стабильности эмульсий, создания тиксотропной структуры и снижения фильтрации бурового раствора (Сушкова, 2005; Buckley, 2001).

В безводных РУО вода содержится в свободном и связанном виде (кристаллизационная) в количестве, необходимом для функционирования химических реагентов. В таких растворах необходимое количество воды не превышает 3-6% от общего объема (Гараев, 2005). Системы безводных РУО обычно используются для бурения с отбором керна. Однако в настоящее время широкое применение в бурении нашли ИЭР с объемным соотношением углеводородная фаза/водная фаза от 90:10 до 60:40. Эмульгированная вода в ИЭР является основной дисперсионной фазой, которая вместе со структурообразователями определяет структурные и реологические свойства буровых растворов, а также служит для частичной замены дорогостоящей и высокотоксичной органической дисперсионной среды (Jill, 2002). Содержание водной фазы в таких растворах находится в диапазоне от 10 до 40%. Поэтому для увеличения солесодержания водной эмульсии для ингибирования глин и активной твердой фазы в ИЭР добавляют соли для снижения активности воды. Наиболее распространенной солью, используемой в ИЭР, является CaCl_2 , также используют NaCl , KCl и органические соли, не содержащие хлоридов (Булатов и др., 1999).

ИЭР получают, используя специальные реагенты эмульгаторы, в качестве которых выступают ПАВ. Даже небольшие концентрации специальных ПАВ (0,3-0,6%) способны кардинально изменить свойства ИЭР. ПАВ, используемые в рецептурах ИЭР, определяют агрегативную и седиментационную стабильность растворов, устойчивость к воздействию агрессивных факторов, управляют процессами сольватации дисперсной фазы растворов (Гараев, 2005). В качестве ПАВ используют маслорастворимые металлические мыла органических кислот и оксиэтилированные производные органических кислот, сложных эфиров, амидов, аминов, полиамиды олигомерного состава, имидозалины, сложные эфиры жирных

кислот и т.п. Источником для их получения служат, как правило, высокомолекулярные органические продукты, которые содержат синтетические жирные кислоты, талловое масло, кубовые остатки синтетических жирных кислот, окисленный петролатум, гудроны животных и растительных жиров, нафтеновые кислоты и т.д. (Грей, Дарли, 1985; Liu, Buckley, 1997). ПАВ усиливают сродство дисперсной фазы ИЭР к углеводородной дисперсионной среде, тем самым защищая ее от гидрофильной флокуляции. Смачивающее действие ПАВ оказывают как на компоненты бурового раствора (утяжелитель, микрокальмотанты), так и на выбуренную породу (Young, 1994).

Для утяжеления РУО чаще всего применяют барит. Кроме него используют карбонат кальция и гематит. Использование того или иного утяжелителя зависит в основном от необходимой плотности бурового раствора (Гараев, 2005).

В ИЭР добавляют специальные реагенты – понизители фильтрации (водоотдачи). Фильтрация ИЭР зависит от вязкости жидкой дисперсионной среды, соотношения углеводородной основы и воды, плотности эмульсии и количества обработанной амином глины в циркуляционной системе. Однако при более высоких температурах большинство растворов обрабатывают реагентами – понизителями водоотдачи. К таким реагентам относят: гильсонит или битум, обработанный амином лигнин, полимерные наполнители (Рязанов, 2005).

В настоящее время, в связи с ужесточением экологических требований на использование РУО, основной задачей является замена углеводородных реагентов на менее токсичные соединения. Намечается и переход от использования в бурении безводных эмульсий к использованию ИЭР, которые по своим свойствам и условиям применения близки к безводным буровым растворам, но выгодно отличаются от них содержанием значительного количества воды, из-за чего существенно дешевле и экологически безопасны (Исламов, 2011; Buckley, 2001). Однако, несмотря на это, ИЭР содержат дополнительно целый ряд химических реагентов, например, ПАВ, которые, усиливают токсичность различных ксенобиотиков, в частности, углеводородов (Bobra et al., 1984).

1.1.2 Токсичность буровых шламов

Бурение нефтяных и газовых скважин связано с образованием большого количества БШ, которые оказывают значительное токсическое воздействие на окружающую среду. БШ представляет собой выбуренную породу, пропитанную отработанным буровым раствором (ОБР) (Булатов и др., 1999). Состав БШ, образующихся при выделении измельченной горной породы из буровых растворов, весьма разнороден и зависит от геологических условий, технологического оформления процесса очистки бурового раствора, а также от интервала бурения (Булатов и др., 1997; Terzaghi et al., 1998).

Степень токсического действия БШ зависит от их состава и свойств, которые в значительной степени определяются характеристиками выбуренной горной породы (Крючков, Курапов, 2012). Нефтяные и газовые месторождения состоят из осадочных пород, которые представляют собой механические и химические продукты разрушения метаморфических и изверженных пород, содержащих продукты жизнедеятельности организмов. К этим породам относятся мономинеральные (каменная соль, гипс, ангидрид, известняки, доломиты и др.) и полиминеральные (конгломераты, глины, песчаники и др.) породы (Булатов и др., 1999).

В работе А.П. Хаустова и М.М. Редина (2006) показано наличие в исследуемых образцах БШ высокого содержания элементов I и II класса опасности, таких как: Pb^{2+} , As^{3+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} и Al^{3+} . Концентрации данных элементов во много раз превышали предельно допустимую концентрацию (ПДК) в почве. Их присутствие в БШ было обусловлено поступлением из выбуренной породы, что подтверждалось химическими анализами водного и кислотного экстрактов. В водном экстракте установлено превышение ПДК по Cr^{2+} в 71 раз, Mn^{2+} – в 33, Co^{2+} – в 3, Ni^{2+} – в 11, Cu^{2+} – в 14, Zn^{2+} – в 8, Pb^{2+} – в 22 раза. В кислотном экстракте превышение ПДК составляло: по Ni^{2+} – в 90 раз, Cu^{2+} – в 72, Zn^{2+} – в 133, As^{3+} – в 153, Cd^{2+} – в 26, Pb^{2+} – в 834 раза.

Оценка фитотоксического действия выбуренной породы в работе А.П. Хаустова и М.М. Редина (2006) проводилась экспресс-методом при проращивании семян овса с использованием водного, буферного и кислотного экстрактов. Было показано, что степень опасности выбуренной породы по показателям фитотоксичности соответствовала уровню: V (водный экстракт), III (буферный экстракт), II (кислотный экстракт) классу опасности.

Токсичность выбуренной породы обусловлена не только неорганическими соединениями, входящими в состав разбуриваемых пластов. Основная опасность выбуренной породы заключается в высоком содержании углеводородов, которые присутствуют в продуктивных пластах (Майстренко, Ключев, 2004). Как правило, нефтяные сепараторы отделяют диспергированную и взвешенную нефть, однако водорастворимые фракции нефти в концентрациях от 10 до 60 мг/л и выше все равно остаются и попадают в окружающую среду (GESAMP..., 1993).

В соответствии с международным стандартом (GESAMP..., 1993), допустимое содержание углеводородов в сбрасываемых БШ не должно превышать 100 мг/л. В исследованиях Г.В. Мойсейченко и В.Л. Абрамова (1994) показано, что данная концентрация нефти в БШ может приводить к парализации и гибели бентосных олигохет, а в условиях хронического воздействия БШ с концентрацией нефти 12 мг/л смертность в популяции значительно превышает рождаемость.

В опытах И.Ф. Саблиной (1988) показано, что у зеленых водорослей водорастворимые фракции нефти вызывают изменение окраски тканей, угнетение точек роста и, в конечном итоге, гибель организма. Нефтяные углеводороды присутствуют во всех органах рыб. Максимальные концентрации водорастворимых фракций нефти отмечаются в печени и желудке, затем – в сердце, почках, жабрах, мышцах и гонадах. Углеводороды нефти воздействуют на семенники и яичники рыб, приводя к снижению их репродуктивного потенциала, появлению различных уродств и гибели эмбрионов. При длительном нахождении в загрязненной воде, содержащей водорастворимые фракции нефти, высокие концентрации углеводородов в тканях рыб сохраняются длительное время после перемещения рыб в чистую воду (Михайлова, Касинов, 1988).

Однако, несмотря на все выше изложенное, степень опасности БШ для окружающей среды определяется именно составом буровых растворов, используемых при бурении (Рязанов, 2005; Benka-Coker, Olumagin, 1995). Исследования Н.В. Козакова и Ю.Б. Проценко (1988), Г.Г. Ягафаровой с соавт. (1998), Т.В. Светличной (2004), Х.М. Исламова (2011) показали, что БШ, пропитанные буровыми растворами на водной основе, менее опасны, чем БШ, пропитанные РУО. Это связано с тем, что практически все реагенты, за исключением лигнинсодержащих, используемые для обработки буровых растворов на водной основе, относятся к IV и V классам опасности (Светличная, 2004; Саксонов и др., 2008). Синтетические полимеры, такие как: различные модифицированные целлюлозы, полиакриламид, модифицированный крахмал, используемые в буровых растворах, относительно мало токсичны, поэтому работы исследователей посвящены в основном только изучению биостойкости данных полимеров в окружающей среде (Светличная, 2004).

1.1.3 Токсичность компонентов буровых растворов на углеводородной основе

Одним из ключевых факторов использования той или иной дисперсионной среды в настоящее время является степень ее токсичности для окружающей среды (Сушкова, 2005; Okpokwasili, Nnubia, 1999). Дисперсионные среды, как самые важные компоненты, входящие в состав РУО, являются по своему составу многокомпонентными нефтепродуктами, которые оказывают различное воздействие на окружающую среду, вызывая гибель растений и животных от недостатка влаги в почве или кислорода в воде и токсические отравления продуктами неполного окисления отдельных углеводородов (Пономарев и др., 1985).

Сложный химический состав дисперсионных сред затрудняет возможность разделения их на индивидуальные углеводороды, поэтому об их химическом составе судят по содержанию в них отдельных групп углеводородов: нафтеновых,

парафиновых, ароматических, а также асфальто-смолистых веществ (Торопова и др., 1986; Майстренко, Ключев, 2011; Genovese et al., 2008).

Фракционный состав нефти отличается от состава ДТ и минерального масла высоким содержанием ароматических углеводородов, которое изменяется от 5 до 55%, чаще всего – от 20 до 40%. Содержание алифатических углеводородов в нефти колеблется и может достигать до 70% (Садовникова и др., 2006). Кроме того, в состав нефти могут входить полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) – соединения с числом конденсированных колец от двух до шести (Давыдова, Тагасов, 2004). Содержание ПАУ в нефти различно, но чаще всего составляет от 1 до 4%, но даже такая минимальная концентрация токсикантов вызывает тревогу у экологов в связи с высокой биологической (канцерогенной и мутагенной) активностью. В нефти распространены и гетероциклические аналоги ПАУ. Данные соединения иногда более токсичны, а их присутствие в смеси с ПАУ может вызвать синергетический эффект (Майстренко, Ключев, 2011). ДТ, также как и нефть, является сложной смесью парафиновых (10-40%), нафтеновых (20-60%) и ароматических (14-30%) углеводородов, соотношение которых зависит от марок топлива, используемых в РУО (Митусова и др., 2002; Zanaroli, 2010). Несмотря на меньшее содержание ароматических углеводородов в своем составе, имеются сведения о высокой токсичности и ограниченной биодоступности ДТ для микроорганизмов-деструкторов (Zanaroli, 2010). В исследованиях D. Wieszorec с соавт. (2012) показано, что ДТ обладает повышенной фитотоксичностью. В почве, загрязненной 5-10% ДТ, растения почти полностью погибали, а микрофлора сильно ингибировалась. В работе М.Н. Саксонова (2009) установлено острое токсическое действие ДТ в концентрации 20 мл/дм³ на водоросли, выражающееся в снижении уровня флуоресценции хлорофилла, а концентрация ДТ 1 мл/дм³ была токсична для губок, нарушая их пищевую активность.

Менее токсичной и вследствие этого самой распространенной дисперсионной средой, особенно при бурении скважин на морских проектах, является минеральное масло (Сушкова, 2005; Candler et al., 1993; Buckley, 2001). В состав

минеральных масел, используемых в РУО, входят в основном парафиновые углеводороды. Их содержание может достигать до 90%. Однако, нередко данные дисперсионные среды могут включать нафтеновые и ароматические углеводороды до 60 и 40% соответственно. В состав минеральных масел могут входить и смолисто-асфальтеновые вещества до 10% (Смирнова, 2011; Kimira et al., 1989). Токсичность минеральных масел, используемых в бурении, изучена достаточно слабо, однако имеются сведения, что данные дисперсионные среды относятся к III и IV классам опасности (Candler et al., 1993; Wang, Freemark, 1995).

Ароматические углеводороды являются самыми токсичными компонентами дисперсионных сред (Токсикологическая химия..., 2005; Buckley, 2001), однако алифатические углеводороды (C_5 - C_{10}), входящие в состав дисперсионных сред, также оказывают сильное токсическое воздействие на живые организмы, находясь в почвах, водной или воздушной средах. Алканы с короткой углеродной цепью особенно быстро действуют на клетки. Они легко проникают в клетки организмов через цитоплазматические мембраны, нарушая их (Пиковский, 1993). Однако, вследствие летучести, их токсическое действие непродолжительно (Кузнецов, Градов, 2006). Токсичность высокомолекулярных алканов (C_{11} - C_{28}) выражена гораздо слабее, чем низкомолекулярных. Парафины не оказывают токсическое действие на живые организмы (Лозановская и др., 1998).

Отдельной, наносящей большой вред группой реагентов, входящих в состав РУО, являются ПАВ. По химическому составу и поведению в растворах различают анионоактивные (АПАВ), неионогенные (НПАВ), катионоактивные (КПАВ) и амфолитные ПАВ. В бурении наиболее часто используются первые три группы (Кузнецов, Градова, 2006). Вредное воздействие ПАВ на биообъекты является сложным и многофакторным (Ставская, 1981; Астафьева, 2006). ПАВ ухудшают органолептические показатели воды, придавая ей неприятный кислый запах и мыльный привкус (Астафьева, 2006). Попадая в воду, ПАВ вызывают пенообразование. Пена не только нарушает тепло- и газообмен, но и снижает поступление кислорода из воздуха, вызывает в значительных количествах размножение микроорганизмов, в том числе, и патогенных (Грищенко и др., 1980;

Остроумов, 1991; Matthew, Scott, 2000). В исследованиях Л.А. Косковой и В.И. Козловской (1979) установлено, что закономерность действия ПАВ на рыб заключается в том, что при концентрации 4-16 мг/л у них нарушается слизистый покров, а при более высоких концентрациях происходит жаберное кровотечение и нарушается проницаемость жаберных мембран, что приводит к уменьшению поступления кислорода. Обнаружены изменения под действием ПАВ в обонятельных и вкусовых органах рыб. При концентрации 1,5 мг/л сульфанола НП-3 полностью угнетается обонятельная реакция карпа.

В исследованиях С.А. Остроумова (1991) показана способность синтетических НПАВ в концентрации 0,2-0,4 мг/л нарушать процессы фотосинтеза фитопланктона, прекращать рост некоторых зеленых водорослей.

Применяемые в бурении ПАВ негативно влияют и на обитателей моря. Сульфанола в концентрации 0,02 мг/л приводит к полной гибели велигеров приморского гребешка; концентрация 3,4 мг/л является смертельной для серого ежа (Мойсейченко, Абрамов, 1994). Дисолван в концентрации 0,3 мг/л вызывает гибель 60% особей сеголеток форели; в концентрации 100 мг/л полностью подавляет оплодотворение икры выюна (Лесюк, 1988).

В почвах ПАВ негативно влияют на жизнедеятельность микроорганизмов и рост растений. Так, например, под влиянием ПАВ происходит изменение культурально-морфологических свойств энтеробактерий (Григорьева и др., 1979). Большинство ПАВ обладают канцерогенным действием, что приводит к ускорению развития различных опухолей (Mcguire, Hughes, 2003). Опасность ПАВ заключается в том, что они способствуют растворению нерастворимых в воде токсикантов, в частности углеводородов, или образуют стойкие эмульсии.

Для снижения активности воды в ИЭР используют хлорид кальция. Использование солей на основе хлоридов создает проблемы при утилизации отходов месторождения, образованных в результате работы с данным типом бурового раствора. Хлориды увеличивают электропроводимость любой воды и создают ряд проблем для биологических объектов, поскольку хлориды очень устойчивы к разрушению (Мойсейченко, Абрамов, 1994).

Модифицированная бентонитовая глина, используемая в РУО, по своему составу не представляет угрозы химического загрязнения, за исключением увеличения мутности воды (Патин, 1994). Из-за повышения мутности воды происходит отпугивание рыб от нерестилищ и миграционных путей (Горбунова, 1988). Это особенно актуально для Северного Сахалина, где уже нарушено 50% нерестилищ лососевых рыб под действием буровых отходов (Мойсейченко, Абрамов, 1994).

В РУО основным утяжелителем является барит. Оценка токсичности барита несколько различается в отечественной и зарубежной литературе. Американские ученые, например, считают его не токсичным, или малотоксичным веществом (Lamb et al., 2013). В работах отечественных и отдельных западных токсикологов имеются данные о более высокой токсичности барита. Барит, также как и глины, повышает мутность воды, но быстрее оседает на дно из-за своей высокой плотности, поэтому его влияние более ощутимо для бентоса, чем для планктона. Так, например, имеются сведения о значительном снижении численности полихет и моллюсков в донных сообществах под действием барита (Tagatz, Tobia, 1979). Концентрация барита 90-140 мг/л может вызывать реакцию активного избегания у молоди трески (Козак, Проценко, 1988); 150 мг/л – приводит к гибели планктонных ракообразных (Гусейнов, Касымов, 1986). Не токсичной считается концентрация 40-70 мг/л (Мовсумов, Гусейнов, 1986). Имеются сведения, что барит усиливает токсичность других компонентов буровых растворов (Мойсейченко, Абрамов, 1994).

Реагенты, изменяющие pH, используются в буровых растворах в больших количествах. Самым распространенным реагентом в РУО для поддержания pH является гашеная известь. Под действием щелочных буровых растворов изменяется pH воды, окисляемость, электропроводность и соленость (Okpokwasili, Nnubia, 1995).

Установлено, что подкисление или защелачивание воды приводит к затруднению тканевого дыхания у рыб, вызывая кислородный дефицит. До определенных значений pH это приводит к учащению дыхания и сердцебиению,

из-за чего происходит нарушение сердечных ритмов, завершающееся смертью рыб от удушья (Восканов, 1988).

Из всего вышесказанного следует, что каждый химический реагент, входящий в состав буровых растворов, обладает разнообразным токсическим эффектом на различные живые организмы. Буровые растворы – это многокомпонентная жидкость, и в полном буровом растворе взаимное влияние компонентов друг на друга еще более усиливает токсический эффект каждого из них (Мойсейченко, Абрамов, 1994). Таким образом, к токсичности выбуренной породы в БШ добавляется еще и токсичность отдельных компонентов, входящих в состав буровых растворов. Причем, как показывают литературные данные, именно состав буровых растворов, главным образом, определяет токсичность БШ в целом.

1.2 Способы детоксикации буровых шламов

Ключевыми факторами, определяющими направление утилизации БШ, является их состав и физико-химические свойства (Ягафарова, Барахнина, 2006). Взаимодействие РУО с выбуренной породой во многом определяет степень токсичности БШ, образованных в ходе бурения скважин (Рязанов, 2005; Venka-Coker, Olumagin, 1995). В настоящее время проблема минимизации потери РУО со шламом решается применением высокотехнологичных установок, чаще всего, это различные центрифуги, которые осушают шлам, предотвращая при этом попадание токсичных веществ, входящих в состав РУО, в окружающую среду. Однако, несмотря на использование самого высокотехнологического оборудования, потери РУО со шламом составляют не менее 4%. Даже такая низкая концентрация углеводородов может оказывать токсический эффект на живые организмы (Миннингалимов, Нафикова, 2008).

В настоящее время широко распространено захоронение БШ в земляных амбарах непосредственно на территории буровой площадки после окончания бурения скважины, что не всегда обеспечивает надежную экологическую защиту

мест захоронения отходов, из-за отсутствия или повреждения гидроизоляции дна и стенок амбара (Абалаков и др., 2003; Любин и др., 2009). Наиболее распространенным способом ликвидации шламовых амбаров является освобождение амбара от жидкой фазы. Оставшийся при этом БШ засыпают минеральным грунтом. Данный способ нейтрализации шламовых амбаров имеет ряд серьезных недостатков, одним из которых, как показывают результаты различных исследований, является содержание в БШ достаточно высоких концентраций углеводородов, ПАВ, ТМ в подвижной форме и других токсичных веществ (Шарипов, 1995; Аксентий, 1999; Морозов и др., 2004). Как показывают результаты литературного анализа, в настоящее время универсального способа нейтрализации и утилизации БШ, пропитанных РУО, отвечающего всем экологическим требованиям, не существует. Обычно при утилизации таких шламов применяются следующие методы: термический, физический, химический, физико-химический, биологический или их комбинация (Рядинский, Денеко, 2004). Применение этих методов позволяет снизить токсический эффект отходов бурения на окружающую среду. Однако в бурении немаловажен и социально-экономический эффект, а именно: снижение транспортных расходов, а также расходов на размещение буровых отходов.

В качестве безреагентных методов детоксикации БШ широкое распространение получил термический метод (Кофман, Востриков, 2013; Veil, 2003). Термическая обработка шлама обеспечивает разрушение органических веществ всех основных классов, присутствующих в БШ. Исследования, выполненные в Гипроморнефтегазе, показали, что концентрация 0,5 г/л необожженного шлама в морской воде уже делает среду обитания для организмов моря опасной (Мойсейченко, Абрамов, 1994). При прокаливании шлама при температуре 300°C токсичность шлама снижается в 10 раз, при 500°C – БШ обезвреживается полностью (Захаров, 1983). Однако метод термической обработки БШ является дорогостоящим процессом, при котором безвозвратно уничтожается ценная углеводородная составляющая БШ (Okpokwasili, Nnubia 1999).

Эффективным методом частичного обезвреживания шлама является отмывка его от загрязняющих органических веществ (в том числе, углеводородов) горячей технической водой с ПАВ системы оборотного водоснабжения буровой установки (Шишов и др., 1982). Недостатком данного метода является неполная детоксикация опасных агентов, поэтому для сброса БШ в окружающую среду необходимо дополнительное обезвреживание и переработка (Ягафарова, Барахнина, 2006).

Американскими и канадскими учеными получены результаты, свидетельствующие о повышении плодородности полей после внесения ОБР и БШ в почвы (Король и др., 2005). Однако данное условие выполняется, если в составе буровых отходов нет вредных примесей, оказывающих отрицательное влияние на качественный состав земель.

Приоритетным направлением нейтрализации шлама является их отверждение за счет превращения в инертную консолидированную массу и связывания в ее структуре загрязняющих веществ, что исключает миграцию их за пределы отвержденного раствора. В качестве отверждающих составов предлагаются минеральные добавки, такие как: окись алюминия, жидкое стекло, хлорид железа и др. (Ягафарова, Барахнина, 2006).

Одним из перспективных способов утилизации БШ в настоящее время является закачка их в пласт. При разработке месторождений этот способ является одним из наиболее надежных и экологически безопасных методов утилизации отходов бурения глубоко под землей в природных резервуарах. Основное преимущество данной технологии заключается в отсутствии выбросов в атмосферу и проблем, связанных с транспортировкой и хранением отходов. Этот метод был запатентован американской компанией АРКО в 1986 г. и получил название CRI – система утилизации отходов бурения методом закачки в пласт (Любин и др., 2009). Данный метод достаточно сложен и поэтому требует комплексного подхода к решению проблемы: сбор геологических данных, определение пластовых давлений и проницаемости у потенциальных пластов для закачки, определение давления закачки и др. Ошибка в определении хотя бы

одного из перечисленных выше параметров может привести к нанесению значительного урона для окружающей среды (Veil, 2003).

Таким образом, в настоящее время, универсального способа обезвреживания БШ не существует. Важно отметить, что на практике для более полной детоксикации БШ и химических реагентов, входящих в состав РУО, используют комбинацию предложенных выше методов. Особую роль в данном комбинированном подходе уделяют биологическому методу, т.к. в этом случае наблюдается практически полная детоксикация опасных агентов (Булатов и др., 1997; Ильина, 2002; Jing et al., 2007).

1.3 Биологические методы утилизации буровых отходов: преимущества и перспективы

Перспективным для обезвреживания и ликвидации буровых отходов, таких как, ОБР и БШ, является биотехнологический метод, основанный на использовании активных микробных штаммов-деструкторов органических загрязнителей буровых отходов (Ягафарова и др., 1998; Ильина, 2002; Jing et al., 2007). Данный способ утилизации буровых отходов, образующихся при бурении и заканчивании глубоких нефтяных и газовых скважин, особенно актуален и эффективен в тех случаях, когда широко применяются РУО, где углеводороды являются основными токсичными агентами (Балаба, 2004).

В настоящее время существует большое количество сведений о бактериях-деструкторах углеводородов. При этом в биотехнологическом способе детоксикации буровых отходов могут использоваться как аборигенные бактерии-деструкторы органических и неорганических загрязнителей, выделенные из шламов, так и специализированные микроорганизмы-интродуценты, как правило, в составе биопрепаратов (Ильина, 2002; Jing et al., 2007).

Нефтяные шламы (НШ), и в особенности, БШ – это комплекс устойчивых соединений, которые плохо поддаются разложению естественной микрофлорой даже при создании оптимальных условий (Никитина и др., 2006; Галиев, 2007).

Компоненты шламов обладают канцерогенным и иммунотоксическим действием. Поэтому в ряде случаев плотность популяции и эффективность природных углеводородоокисляющих микроорганизмов (УОМ) в НШ крайне низкие, и здесь предпочтительнее использование селекционированных микроорганизмов.

Л.В. Ковальчук с соавт. (2008) изучила детоксикацию нефтешламовых амбаров различного уровня загрязнения (от 20 до 79 г нефти на кг почвы) с использованием бактериального препарата «Нафтокс» (нефтеоокисляющие бактерии *Mycobacterium*, *Pseudomonas* и др.). Эффективность применения данной технологии составила от 65 до 99% к абсолютному значению, а общее содержание углеводов при этом снизилось до 2-0,5 г/кг. В исследованиях (Mishra et al., 2001) показана эффективность добавления бактериального консорциума *Mycobacterium* sp. Вр 3 и *Rhodococcus erythropolis* Ас-12 для стимуляции биоремедиации НШ. Обработка НШ консорциумом бактерий в сочетании с питательными добавками приводила к снижению общих углеводов нефти на 89,7-92,0% за один год, в контрольном участке степень разложения общих углеводов составляла всего 14%. Анализируя эффективность использования различных методов детоксикации НШ, исследователи (Ковальчук и др., 2008; Ouyang et al., 2005) отмечали, что биоаугментация на основе внесения бактериальных препаратов способствует убыли общих углеводов нефти на 45-53%, биокомпостирование – на 31%, биостимуляция естественного сообщества – на 13-23%.

Исследования Е.Г. Ильиной (2002) показали, что обработка НШ (донные отложения шламонакопителя ОАО «Башнефтехим») биопрепаратом «Родотрин» (*Rhodococcus erythropolis* Ас-1339Д) значительно интенсифицировала деградацию нефти и нефтепродуктов. В исследованиях Ф.М. Хабибулиной с соавт. (2002) показано, что две культуры микроорганизмов из рода *Rhodococcus* (НОК-15 и НОК-16) способны к очистке НШ. Утилизация нефти данными культурами в жидких средах достигала 38-52%. В работе О.Б. Супруновой (2005) показано, что интродукция циано-бактериального сообщества в НШ увеличивает

биodeградацию суммарных нефтяных углеводов на 20,1-27,0% по сравнению с деятельностью аборигенной микрофлоры.

В то же время, в НШ, которые формируются на предприятиях нефтепереработки, и которые отличаются от БШ отсутствием экстремальных экологических условий, связанных с повышенной щелочностью и повышенной минерализацией, нередко выявляются активные деструкторы углеводов. Так, в исследованиях Е.В. Никитиной с соавт. (2004) был обнаружен высокий уровень общего числа микробных клеток и их жизнеспособной части в составе микробиоценоза НШ ОАО «Нижекамскнефтехим»: около 10^8 - 10^{10} кл/г в зависимости от глубины; выделены деструкторы НШ и 10-ти индивидуальных ПАУ.

При высеве образцов нативных НШ ОАО «Нижекамскнефтехим» на среду TSA (триптонно-соевый агар), как сообщает А.В. Панов (2013), общая численность аэробных культивируемых гетеротрофных микроорганизмов составила 6×10^7 КОЕ/г НШ. Было выделено 4 различных штамма, утилизирующих БТЭК (смесь бензола (ben), толуола (tol), этилбензола (eb) и ксилолов (m-, p-, o-xyl)), и 4 различных штамма, растущих на нафталине.

Г.Ж. Шарипова (2012) выделила из нефтезагрязненных почв и НШ Западного Казахстана 175 изолятов, среди них были активные нефтеокисляющие культуры микроорганизмов. В коллекции Кубанского госуниверситета находится немало нефтеокисляющих актинобактерий, выделенных из НШ (Худокормов и др., 2013).

В.С. Овсянникова с соавт. (2013) в своих исследованиях установила, что биодеструкция аборигенной микрофлорой НШ дополнительно снижает уровень нефтяного загрязнения за месяц на 20-30%.

Литературных данных по практическому применению биологических способов утилизации БШ и ОБР не так много. Известен способ очистки БШ от нефти и полимерных реагентов, включающий обезвреживание активной ассоциацией микроорганизмов-деструкторов нефти и органических добавок при добавлении в БШ *Rhodococcus erythropolis* AC-1339Д и *Fusarium* sp. №56 в соотношении 1:1 в присутствии пламилонa и диаммофоса (Баряхнина, 1999). И

способ, отличающийся от вышеназванного тем, что производят разделение бурового раствора на БШ и промывочную жидкость, возвращение последней в циркуляцию буровой установки, подачу БШ в биореактор с послойным расположением в следующей последовательности: пламилон, дополнительно почвогрунт, БШ, затем производят аэрирование, добавление диаммофоса в количестве 0,1-0,3 мас.% и указанной ассоциации бактерий (Ягафарова, Баракнина, 2006).

Исследователи ООО "Научно-исследовательского центра "Промавтоматика", Киев, Украина (Дуброва и др., 2010) сообщают об оригинальной микробной технологии, основанной на использовании биопрепаратов-деструкторов, при которой биодеструкция, обезвреживание и биоутилизация углеводородов шламов буровых амбаров (4 класс опасности) происходит в течение 12-30 суток, шламовых амбаров нефтедобычи (3 класс опасности) – от 4-9 до 20 месяцев, шламовых амбаров нефтегазодобывающих и нефтеперерабатывающих производств – 5-18 месяцев. В последствии полученный экологически безопасный органо-минеральный субстрат (рН 6-7), по данным авторов, может быть использован для экологического экранирования (в т.ч. создания биологического фильтра) буровых скважин, буровых и шламовых амбаров, рассаливания грунтов, в качестве органо-минерального удобрения для сельского хозяйства и т.д., что создает замкнутый природоохранный цикл нефтегазодобывающей и нефтеперерабатывающей промышленности.

Достоинствами биологического метода обезвреживания БШ является возможность утилизации нескольких загрязнителей одновременно, например, ПАВ и углеводородов, а также отсутствие необходимости в специальной подготовке БШ (отделения твердой и жидкой фаз, отверждения, отмыва, нейтрализации), что позволяет осуществлять обезвреживание буровых отходов непосредственно на месте (*in situ*), не требуя строительства и сооружения дополнительного оборудования для их переработки.

1.3.1 Микробная деградация нефтяных углеводородов

Способность трансформировать углеводороды нефти в безвредные соединения естественным путем присуща разнообразным представителям микромира, которые используют углеводороды в качестве источника углерода и энергии, преобразуя их в углекислый газ и другие нетоксичные метаболиты (Ившина и др., 1995; Wilkinson et al., 2002). В настоящее время известно более ста родов бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов, представители которых являются ключевым звеном в биodeградации углеводородов. Исследования многих отечественных и зарубежных ученых показывают, что способность нефтяных углеводородов к разложению в окружающей среде в значительной степени зависит от активности УОМ (Ившина и др., 1995; Ильина, 2002; Градова и др., 2003; Krahn, Stein, 1998; Bento et al., 2003; Jing et al., 2007). По мнению авторов (Wilkinson et al., 2002), наиболее активными микроорганизмами-деструкторами нефти и нефтепродуктов являются почвенные микроорганизмы следующих родов: *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium* и *Flavobacterium*. Способность подвергать деградации минеральные масла выявлена у представителей рода *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodotorula*, *Mycobacterium* (Плешакова и др., 2001; Dott et al., 1989), ДТ – у бактерий рода *Pseudomonas*, *Bacillus* (Hawrot, Nowak, 2006).

Одним из лимитирующих факторов использования углеводородов бактериями-деструкторами является их гидрофобная природа. Так как углеводороды окисляются внутри бактериальных клеток, УОМ выработали целый ряд приспособлений для поглощения углеводородов: 1) образование гидрофобной клеточной стенки, 2) формирование в клеточной стенке липофильных каналов, 3) выделение в среду биоэмульгаторов (биоПАВ) (Коронелли, 1996).

В исследованиях Т.В. Коронелли с соавт. (1998) показано, что присутствие в окружающей среде углеводородов активирует у микроорганизмов-деструкторов синтез биоПАВ, которые выступают в роли стимуляторов бактериальных клеток к потреблению углеводородов. БиоПАВ способны не только диспергировать

углеводороды, переводя их в водную фазу и повышая биодоступность, но и модифицировать клеточные поверхности бактерий путем гидрофобизации, обеспечивая прямой контакт с молекулами углеводородов. В работе (Christofi, Ivshina, 2002) показано, что бактерии родов *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Nocardia* и дрожжи *Candida* являются активными продуцентами биоПАВ.

Комплекс биосурфактант-углеводород способен проходить через наружную липофильную мембрану клетки. Предположительно, здесь углеводород диссоциирует на молекулу амфипатического канала-рецептора. В мембране углеводород может отделиться от биосурфактанта, а биосурфактант – выйти из канала и вернуться обратно на наружную поверхность клетки. Таким образом, концентрация углеводорода в мембране увеличивается, и он по градиенту концентрации передвигается из мембраны в цитозоль клетки (Коронелли, Комарова, 1998; Christofi, Ivshina, 2002).

Известно, что самая быстрая и полная деградация углеводородов связана с окислительно-восстановительными процессами, происходящими при участии различных ферментов при доступе кислорода (Fritsche, Hofritcher, 2000). На рисунке 1 показан основной принцип аэробной деградации углеводородов.

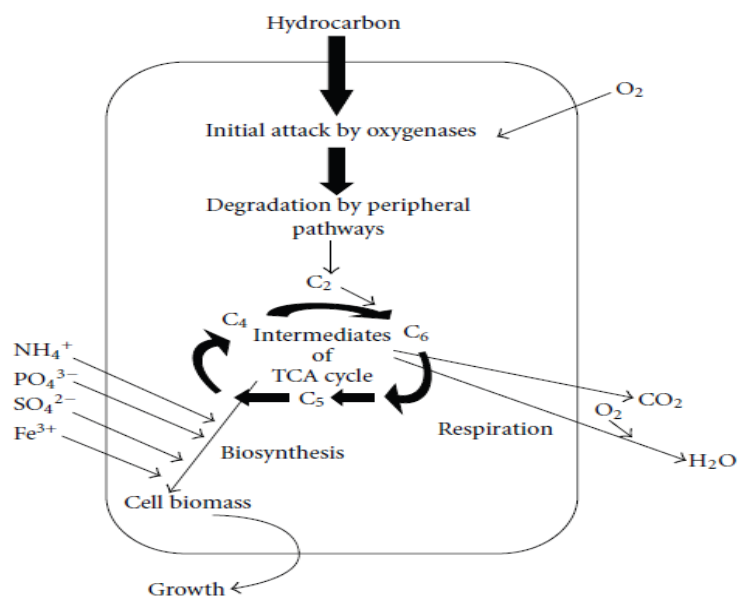


Рисунок 1 – Аэробная деградация углеводородов микроорганизмами-деструкторами (Das, Chandran, 2010)

Первоначальная внутриклеточная атака углеводов представляет собой окислительный процесс при участии оксигеназ и пероксидаз. Одним из способов деградации углеводов является реакция N-деалкилирования, играющая важную роль на ранних этапах разрушения алкилзамещенных соединений. Данную реакцию также катализируют различные оксидазы. В деградации углеводородных поллютантов могут принимать участие и ферменты реакций окислительного метаболизма, к которым относятся: декарбоксилирование, гидролиз эфирных связей, β -окисление, окислительное расщепление ароматического и гетероциклических колец (Fritsche, Hofritcher, 2000). Деградация нефтяных углеводов может осуществляться при помощи специфических ферментных систем. Так, исследователи J.B. Beilen и E.G. Funhoff (2007) показали участие цитохром P₄₅₀-гидроксилаз в микробной деградации нефти, ДТ и минерального масла. В зависимости от длины цепи углеводов, данная ферментная система вводит кислород в субстрат, инициируя таким образом биodeградацию. После окисления субстрата продукты деградации включаются в биосинтетические процессы в клетке.

У микроорганизмов-деструкторов метаболизм углеводов может также протекать как анаэробное дыхание, кометаболизм, восстановительное дегалогенирование, использование неорганических соединений в качестве доноров электронов (Fritsche, Hofritcher, 2000).

Практически все углеводороды могут быть объектом микробиологического воздействия, по-разному трансформируясь ими. По степени окисляемости микроорганизмами углеводороды располагаются в следующей последовательности: алифатические > ароматические > смолы > асфальтены (почти не окисляются). Наиболее активно разрушаются углеводороды с прямой цепью, *n*-алканы с длиной цепи C₁₂-C₂₂. Более устойчивы к окислению изо- и циклоалканы, а также ароматические углеводороды. Многие из них в виде моносубстратов не способны использоваться микроорганизмами, они разлагаются в режиме соокисления с другими более доступными углеводородами. Биodeградация смол и асфальтенов затруднена из-за устойчивости к воздействию ферментов и малой

способности их диспергироваться в жидкой фазе, поэтому время полураспада этих соединений варьирует от 4 до 2000 недель (Кузнецов, Градова, 2006).

1.3.2 Факторы, влияющие на развитие микроорганизмов-деструкторов загрязнителей и эффективность обезвреживания буровых шламов

Деструктивная активность нефтеокисляющих микроорганизмов зависит от многих факторов: температуры, солености, солнечной радиации, наличия питательных субстратов и др.

Одним из важных факторов, влияющих на способность микроорганизмов к детоксикации буровых отходов, является температура. Так, для развития УОМ и интенсификации процесса деструкции углеводородов и ряда синтетических полимеров оптимальными являются мезофильные условия, то есть 20-28°C. Однако, большинство месторождений нефти расположено в северных регионах, поэтому в районах с холодным климатом, где период деструкции может составлять 50 лет и более, встает вопрос о целенаправленном внесении селекционированных штаммов-деструкторов (Оборин и др., 1988). Короткое лето – основной лимитирующий фактор при биоремедиации загрязненных объектов окружающей среды в зоне холодного и умеренного климата.

В настоящее время имеются работы, посвященные поиску микроорганизмов-деструкторов углеводородов, устойчивых к низким температурам. В исследованиях И.А. Пырченковой с соавт. (2006) изучена способность микроорганизмов-нефтедеструкторов и деструкторов ПАУ к росту на ДТ и нефти при 4-6 и 24°C, а также при повышенной концентрации NaCl (до 6%). Показано, что степень деструкции штаммами *Rhodococcus* sp. Q15, sp. S26, sp. X 5 и *Pseudomonas* sp. 142NF при 4-6°C выше, чем при 24°C.

Т.Ю. Коршунова с соавт. (2012) из техногенно загрязненной почвы Красноярского края выделила и идентифицировала 8 бактериальных штаммов, способных к разложению углеводородов: декана, толуола и β -метилнафталина в условиях низких положительных температур. Показано, что штаммы

Pseudomonas sp. 1.1, *Pseudomonas* sp. 1.2, *Rhodococcus* sp. 3.3 и *Acinetobacter* sp. 4.3 проявляют повышенную деструктивную активность при 4-6°C. Путем скрининга УОМ почв и воды различных районов Сибири были выделены микроорганизмы, обладающие высокой эмульгирующей и нефтеокисляющей активностью, психрофильностью и галотолерантностью. Показана высокая степень утилизации углеводов отдельными микроорганизмами *Pseudomonas* sp. KL-1, *Yarrowia lipolytica* NF5-1, *Candida* sp. Nb2, *Arthrobacter* sp. Ja285p, *Arthrobacter* sp. Ja269p и их ассоциациями, которая достигает значений 64-92% за 6 сут. при температуре 4-6 и 22-24°C.

Однако, несмотря на наличие целого ряда микроорганизмов-деструкторов углеводов, многие из них не способны выполнять свои функции при высоких концентрациях углеводов в буровых отходах (Ившина и др., 1995). Как показывают результаты исследований Л.И. Сваровской и Л.К. Алтуниной (2004) при 5%-ном уровне загрязнения почвы углеводородами рост микрофлоры стимулируется, однако при увеличении концентрации углеводов до 10% рост микрофлоры угнетается, что также требует дополнительных поисков решений для применения биологического способа деградации углеводов.

Использование микроорганизмов-деструкторов для детоксикации БШ может осложняться их многокомпонентным составом (Ягафарова, Барахнина, 2006). В БШ помимо реагентов, входящих в состав пропитывающих их буровых растворов, содержатся ТМ, поступающие вместе с выбуренной породой (Булатов и др., 1999). Действие ТМ на микроорганизмы-деструкторы может проявляться по-разному. В одних случаях происходит длительная задержка роста, после которой скорость роста и конечная биомасса достигают величин, соответствующих росту в отсутствии ТМ. В других – длительность лаг-фазы не увеличивается, однако скорость роста и биомасса бактерий ниже, чем в контроле (Багаева и др., 2013). Поэтому важными в практическом отношении вопросами являются возможные и критические концентрации ТМ, которые должны определяться для каждого вида микроорганизма и металла отдельно.

В настоящее время имеется достаточно сведений об устойчивости к ТМ различных УОМ. Так, в работе И.Б. Ившиной с соавт. (2012) выявлена устойчивость алканотрофных бактерий *Rhodococcus erythropolis*, *R. fascians*, *R. rhodochrous* и *R. ruber* к Pb^{2+} , Zn^{2+} , Mo^{2+} , Cu^{2+} и Cr^{2+} в концентрации больше 100 мМ. А.Ю. Муратовой (2013) показана способность *Mycobacterium* sp. N7 расти в присутствии 5 мМ двухвалентного никеля и подвергать деградации ДТ (10 г/л).

Значительные успехи достигнуты в изучении резистентности к ТМ при использовании легко метаболизируемых источников углерода (глюкоза, сахароза, пируват). Однако, опираясь на эти работы, нельзя с уверенностью сказать о степени устойчивости к ТМ отдельных штаммов бактерий, часто используемых в процессе очистки углеводородзагрязненных объектов. В ходе биологической детоксикации НШ также возникает вопрос об устойчивости применяемых в очистке штаммов бактерий к ТМ, в зависимости от углеводородного субстрата. Авторы (Худокормов и др., 2013) исследовали устойчивость 8 штаммов нефтеокисляющих актиномицетов, выделенных из нефтезагрязненных экосистем, к солям ТМ при культивировании с использованием различных источников углерода. Показана возможность их использования при биоремедиации нефтезагрязненных объектов, содержащих ТМ.

Комплексное загрязнение в БШ способствует созданию экстремальных экологических условий для микроорганизмов-деструкторов, таких как, высокие значения рН и высокая степень минерализации. Как показывают результаты исследований В.В. Изжеуровой с соавт. (1993), наилучшее развитие нефтеокисляющих микроорганизмов происходит в интервале рН 6,5-7,5 и при содержании NaCl до 3%. Однако, в последние годы появляется все больше данных о грамотрицательных и грамположительных бактериях, способных деградировать целый ряд токсичных органических соединений, обладающих устойчивостью к экстремальным условиям существования, в том числе, к высоким значениям рН среды и высоким значениям минерализации (Ястребова, Плотникова, 2007; Luz et al., 1997).

Так, в исследованиях А.А. Ветровой (2010) была получена микробная ассоциация «ВиО», состоящая из штаммов-деструкторов родов *Rhodococcus*, *Pseudomonas* и *Acinetobacter*. Бактерии этого микробного консорциума способны к деградации углеводов нефти при 5%-ной концентрации соли и при значениях pH от 4 до 10. В работе D.A. Emerson и J.A. Breznac (1997) показана способность бактерий родов *Pseudomonas*, *Nocardioideis* к деградации ароматических и алифатических соединений в условиях засоления среды до 10% NaCl. Л.Н. Капотина с соавт. (2001) показала устойчивость деструкторов нефти и ПАВ *Artrobacter globiformis* и *Rhodococcus erythropolis* к концентрации NaCl до 20%.

Е.И. Милехина с соавт. (1998) показала, что пластовые жидкости нефтяных месторождений Татарстана с разной степенью минерализации являются одним из природных засоленных биотопов, которые хотя и характеризуются отсутствием кислорода или невысоким его содержанием, в то же время, являются экологической нишей гетеротрофной микрофлоры (Милехина и др., 1998). Данными исследователями было показано, что основными представителями углеводородоокисляющих сообществ заводняемых нефтяных месторождений Татарстана являются *Rhodococcus maris* и *R. erythropolis*. Установлена корреляционная зависимость солеустойчивости штаммов от солености природной среды обитания.

И.А. Борзенков с соавт. (2006) описал углеводородоокисляющие бактерии, выделенные из различных нефтяных месторождений, среди которых родококки являлись галотолерантными микроорганизмами, растущими в средах с 15%-ным содержанием NaCl. Все штаммы окисляли *n*-алканы сырой нефти.

Литературные данные (Рыбальский, Лях, 1990; Киреева и др., 2008) свидетельствуют о том, что ассоциации микроорганизмов-деструкторов способны полнее и быстрее разлагать ксенобиотики по сравнению с использованием монокультур. Преимущество смешанных культур микроорганизмов-деструкторов перед монокультурами заключается в более эффективной и более глубокой утилизации различных субстратов, связанных с мобилизацией ферментативных

систем микроорганизмов, с использованием явления кометаболизма (соокисления). Именно в условиях соокисления ксенобиотики могут быть атакованы и подвергаться более полной детоксикации микроорганизмами (Печуркин, 1981).

В настоящее время существует достаточно сведений о различных микробных консорциумах, способных эффективно разлагать различные нефтепродукты и ПАВ одновременно в самых разных условиях. В работах Г.С. Акоповой с соавт. (1996), О.Н. Логинова с соавт. (2002) показано, что такие препараты, как «Деворойл» (консорциум нефтеокисляющих микроорганизмов pp. *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и *Yarovvia*), «Ленойл» (естественная ассоциация нефтеокисляющих бактерий *Bacillus brevis* и *Arthrobacter* sp.) позволяют за один год добиться деструкции углеводородов на 60-94%. Е. Schmidt (1983) соединил *Pseudomonas* B-13, способный разрушать 4-хлорфенол, *Alcaligenes* A-7, способный разрушать ацетон, этанол, фенол и изопропанол и *P. extoquens* (деструктор метанола) в стабильное сообщество, способное разрушать синтетические отходы, содержащие ацетон, фенол, алканы и 4-хлорфенол

Путем направленной селекции получены консорциумы, которые являются основой технологии локальной очистки сточных вод от минеральных масел (Муратова, 1997).

В работе И.Б. Ившиной с соавт. (2012) описаны консорциумы нефтеокисляющих устойчивых к ТМ бактерий, способных в короткий срок утилизировать ароматические, полиароматические, изопреноидные углеводороды нефти, мазут и ДТ.

Представленные выше данные свидетельствуют о несомненной актуальности исследований, связанных с изучением токсичности и утилизации компонентов БШ, в частности РУО, как самых опасных их компонентов. Проанализированные литературные данные показали, что проблема токсического действия РУО и их компонентов на почву изучена недостаточно. В последние годы доля применения РУО при строительстве скважин на суше сильно растет, и в этом случае

негативное влияние буровые растворы оказывают уже на почву, нарушая состав, свойства и плодородие почвы.

Полученные данные свидетельствуют о сложности детоксикации БШ, пропитанных РУО. Биотехнологический способ утилизации БШ, несмотря на свою перспективность, имеет и недостатки требующих решений. В результате микробиологических процессов минерализуется лишь часть органических компонентов нефти, ПАВ, синтетических полимеров, которая трансформируется при этом в другие органические соединения, характер действия которых на природный биоценоз пока не изучены. Необходимо проводить биохимическую переработку длительное время в узком температурном диапазоне (что является лимитирующим фактором для регионов с низкими среднегодовыми температурами). Данный метод можно использовать для переработки БШ при низком содержании нефтепродуктов или как метод окончательной очистки отходов бурения после применения других методов. Многокомпонентность БШ требует от микроорганизмов устойчивости не только к условиям комплексного загрязнения, где помимо углеводородов дисперсионных сред, ПАВ, содержатся ТМ, являющиеся опасными экотоксикантами, но и к экстремальным экологическим условиям, характерным для такого сложного загрязнения. Это, прежде всего, высокие значения рН и высокая степень минерализации, которыми отличаются БШ. Поэтому данный метод, несмотря на свои преимущества, требует дополнительных доработок для его эффективного использования. В связи с этим, актуальным является поиск микроорганизмов-деструкторов, устойчивых к условиям комплексного загрязнения, способных расти и проявлять активную биохимическую деятельность в среде с высоким содержанием компонентов БШ, что в дальнейшем приведет к биодеструкции этих веществ.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

Буровые шламы

Образцы БШ были отобраны в процессе строительства нефтяных скважин Восточной Сибири с первой ступени очистки бурового раствора. Особенностью данных скважин является холодная геология продуктивных пластов (температура коллектора составляет 12-15°C), аномально низкие пластовые давления и высокое содержание NaCl (до 5%).

Образцы состояли из выбуренной породы, пропитанной раствором на основе ДТ – (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. Оба образца имели высокие значения pH (pH 9) и степень минерализации (15%). Общее содержание нефтяных углеводородов в образцах определяли ретортным анализом, путем перегонки шлама при $t=420^{\circ}\text{C}$ и последующем сборе в мерный цилиндр выпаренного конденсата (Булатов и др., 1999). Оно составило: в БШ 1 – 6, БШ 2 – 1,2%. Содержание углеводородов в БШ 1 было обусловлено, главным образом, потерями бурового раствора со шламом, в частности, углеводородной дисперсионной среды, и попаданием углеводородов из продуктивного пласта; в образце БШ 2 наличие углеводородов обусловлено потерями со шламом смазывающих агентов, добавляемых в буровой раствор, и также попаданием из продуктивного пласта.

Бактериальные штаммы

Объектами исследований являлись бактерии, выделенные из двух образцов буровых шламов (БШ 1 и БШ 2) методами прямого посева и накопительного культивирования. Морфологические признаки определяли после культивирования бактерий в течение 12-72 часов методом сканирующей электронной микроскопии. Для получения изображений объектов и изучения их формы применялся

просвечивающий электронный микроскоп MIRA//LMU (TESCAN, Чехия) с приставкой ТЕМ. Измерения проводили в режиме регистрации вторичных электронов. Физиолого-биохимические признаки исследовали по стандартным методикам (Нетрусов и др., 2005). Идентификацию выделенных культур проводили по результатам изучения совокупности морфолого-культуральных и физиолого-биохимических признаков согласно руководству «Определитель бактерий Берджи» (1997), а также на основе принципов молекулярного типирования по последовательности гена 16S рРНК в ВНИИСБ (г. Москва).

Микроорганизмы хранились на 0,4%-ной агаризованной LB-среде при 4°C с регулярными пересевами.

В качестве контрольного углеводородокисляющего микроорганизма в экспериментах использовали *Dietzia maris* AM3 из коллекции почвенных свободноживущих и ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (г. Саратов).

2.2 Питательные среды и условия культивирования бактерий

В работе использовали:

а) полноценные питательные среды: мясо-пептонный агар (МПА) и мясо-пептонный бульон (МПБ); среда Luria-Bertani (LB), г/л: триптон Bacto – 10,0; дрожжевой экстракт Bacto – 5,0; NaCl – 10,0 (среда также использовалась для хранения выделенных культур на столбиках под вазелиновым маслом) (Sambrook et al., 1989).

б) синтетическая минеральная среда М9, г/л: Na_2HPO_4 – 6,0; KH_2PO_4 – 3,0; NaCl – 0,5; NH_4Cl – 1,0 (Панченко и др., 2005). В качестве единственного источника углерода и энергии в минеральной среде в разных экспериментах использовали различные индивидуальные углеводороды и нефтепродукты.

в) среды для выявления микроорганизмов-деструкторов АПАВ и НПАВ, содержащие сульфонол НП-3 и синтанол АЦСЭ-12, соответственно, готовили на основе среды М9. ПАВ вносили в концентрации 0,2 г/л до стерилизации (Ротмистров и др., 1977; Cook, 1978).

г) крахмало-аммиачная среда для выявления бактерий, гидролизующих крахмал, г/л: растворимый крахмал – 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; MgSO_4 – 1,0; NaCl – 1,0; CaCO_3 – 3,0 (Меремкулова и др., 2010).

д) среда Гетчинсона для учета численности целлюлозоразрушающих микроорганизмов, г/л: NaNO_3 – 2,5; FeCl_3 – 0,01; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; NaCl – 0,1; CaCl_2 – 0,1; карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) – 5,0; pH среды доводили до 7,2 добавлением 20%-го раствора Na_2CO_3 (Зенова и др., 2002).

При необходимости жидкие среды уплотняли добавлением Васто агара до концентрации 15-20 г/л.

Бактериальные культуры выращивали при 28-30°C в стационарных условиях в термостате или в настольном шейкере-инкубаторе PSU-10i (BioSan) при 160 об/мин.

2.3 Методы выявления бактерий-деструкторов компонентов буровых шламов

При анализе микробных сообществ исследуемых БШ с целью обнаружения в них микроорганизмов-деструкторов различных ксенобиотиков использовали технику прямого посева и метод накопительного культивирования.

Накопительное культивирование осуществляли в 250-мл колбах в 2-х повторностях: в 100 мл минеральной среды М9 вносили 1 г БШ (Нетрусов и др., 2005). В качестве единственного источника углерода и энергии добавляли предварительно автоклавированные при 1 атм. буровые растворы в концентрации 1% по весу: 1) раствор на основе минерального масла (БР 1) и 2) раствор на основе ДТ (БР 2). Содержимое колб культивировали в течение 10 сут. на качалке при 160 об/мин. Далее готовили пяти- и десятикратные разведения в стерильном физиологическом растворе с последующими посевами в нескольких повторностях на соответствующие полноценные питательные и селективные агаризованные среды.

После инкубации посевов при 28°C через 2-3 сут. подсчитывали общее число колоний гетеротрофных микроорганизмов на МПА. Количество бактерий, гидролизующих крахмал, оценивали на крахмало-аммиачной среде (Меремкулова и др., 2010), принимая во внимание наличие прозрачных ореолов вокруг выросших колоний после обработки среды раствором Люголя. Целлюлозоразрушающие микроорганизмы учитывали на среде Гетчинсона (Зенова и др., 2002), при этом наличие целлюлозолитической активности у бактерий, гидролизующих КМЦ, определяли по прозрачным зонам вокруг колоний. Количество УОМ оценивали путем подсчета характерных колоний внутри и вокруг нефтяных пятен на поверхности плотной минеральной среды М9, содержащей товарную нефть (0,4 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии (Теппер и др., 1993). Для учета численности бактерий-деструкторов НПАВ использовали метод Кука (Cook, 1978). Выросшие на чашках Петри с селективной средой М9 и синтанолом АЦСЭ-12 (0,2 г/л) в качестве НПАВ, обрабатывали реагентом Драгендорфа и по наличию неокрашенных зон вокруг колоний на оранжевом фоне среды судили о присутствии микроорганизмов-деструкторов НПАВ. Количество колоний бактерий-деструкторов АПАВ подсчитывали с помощью метода К. Ohwada (Ротмистров и др., 1977). Колонии, выросшие на селективной среде М9 с сульфолом НП-3 (0,2 г/л), в качестве АПАВ, обрабатывали индикатором нейтральным красным и по наличию прозрачных ореолов вокруг колоний судили о присутствии деструкторов АПАВ.

Прямой высеv бактерий из образцов БШ (1 г) производили непосредственно на ряд вышеперечисленных сред.

2.4 Методы изучения биологических и деструктивных свойств микроорганизмов

В опытах по изучению влияния рН среды для культивирования (в диапазоне рН от 7 до 11) на рост бактерий применяли МПБ с использованием TRIS буфера

(рН 8-9) и буферного раствора на основе карбоната натрия с соляной кислотой (рН 10-11) (Справочник биохимика..., 1991). Для определения ростовых значений рН сред бактерии культивировали в пробирках в стационарных условиях в L-бульоне при 28°C в течение 7 сут. Прирост биомассы определяли по показателю оптической плотности, измеренной при $\lambda=540$ нм на фотоколориметре КФК-2 в кювете с длиной оптического пути 1 см.

При изучении способности выделенных из БШ 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 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, CdCl_2 , ZnSO_4 , NiSO_4 и FeSO_4 . Предварительно проавтоклавированные (при 1 атм.) растворы солей ТМ добавляли в МПА непосредственно перед розливом питательной среды в чашки Петри до конечной концентрации соль/металл в среде, мг/л: $\text{CuCl}_2/\text{Cu}^{2+}$ – 40/19, 70/33, 100/47, 300/94, 400/142, 500/189, 600/236; $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2/\text{Pb}^{2+}$ – 40/25, 140/88, 240/150, 600/375; $\text{CdCl}_2/\text{Cd}^{2+}$ – 20/12, 40/24, 70/43, 100/61; $\text{ZnSO}_4/\text{Zn}^{2+}$ – 40/16, 140/56, 240/97, 440/178; $\text{NiSO}_4/\text{Ni}^{2+}$ – 20/8, 40/15, 80/30, 100/38; $\text{FeSO}_4/\text{Fe}^{2+}$ – 20/7, 40/15, 80/29, 100/37. Культуры высевали на МПА с соответствующими ТМ методом штриха. После культивирования бактерий при 28°C в течение нескольких суток оценивали их рост на поверхности агаризованной среды.

Для оценки уровня индивидуальной металлоустойчивости бактериальных штаммов была рассчитана минимальная ингибирующая концентрация (МИК) соли каждого металла (Lambert, Pearson, 2000). Выбор ТМ и их действующих концентраций был основан на литературных данных по наличию ТМ в БШ (Бранулоу, 1984; Хаустова, Редина, 2006) и собственного анализа содержания ТМ в исследуемых шламах. Определение содержания ТМ в БШ проводили методом атомной абсорбции на спектрофотометре Квант-2АТ. Валовые формы извлекались путем химического разложения БШ кипячением с HNO_3 (1:1).

Эмульгирующую активность изолированных бактерий по отношению к товарной нефти и ДТ определяли методом Д. Купера с некоторыми модификациями (Cooper, Goldenberg, 1987). 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 ДТ марки «Л»). Для оценки экзогенной эмульгирующей активности бактериальные клетки отделяли от культуральной среды центрифугированием в течение 10 мин при 8 тыс. об/мин, 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 в биологических пробирках с углеводородным субстратом (нефть или ДТ) 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, измеряя эмульгирующую активность через 24 (E_{24}) и через 48 (E_{48}) часов. Эмульгирующую активность рассчитывали в процентах, как отношение объема эмульсии ($V_э$, мл) к общему объему жидкости (V , мл), умноженному на 100 процентов, используя формулу:

$$E_{24;48} = V_э/V \times 100, \text{ где } V = 5 \text{ мл}$$

Для оценки показателя гидрофобности (ПГ) бактериальных клеток применяли метод Е.В. Серебряковой с соавт. (2002), основанный на адсорбции бактериальных клеток на поверхности каплей 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. Измерения производили на КФК-2 в кювете с длиной оптического пути 1 см. При этом мы ориентировались на результаты Н.Н. Волченко (2006), 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 на КФК-2 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.

Для определения гемолитической активности микроорганизмы высевали на кровяной агар (стерильный МПА, охлажденный до $45^{\circ}\text{C} + 5\%$ стерильной дефибринированной крови) и инкубировали 1-2 суток. По наличию зон лизиса вокруг колоний судили о гемолитической активности микроорганизмов (Петерсон, Чиров, 2005). Лецитиназную активность культур при выращивании на агаризованной среде, содержащей в качестве источника лецитина желток куриного яйца, определяли по появлению помутнения, связанного с гидролизом лецитина, как описано в (Методы общей бактериологии..., 1984).

Определение антибиотикочувствительности бактериальных штаммов проводили диско-диффузионным методом (Методические указания..., 2004), используя бумажные диски с антибактериальными препаратами в стандартных концентрациях. Исследовали чувствительность штаммов по отношению к различным группам антибиотиков: β -лактамы – пенициллин, доксициклин, ампициллин, бензилпенициллин; аминогликозиды – мономицин, стрептомицин; макролиды – эритромицин, олеандомицин; препараты группы левомицетина – левомицетин; группы тетрациклинов – тетрациклин; антибиотики других химических групп – полимиксин, фузидин. Диски помещали в чашки Петри с МПА, инокулированной бактериальной культурой, на расстоянии 15-20 мм друг

от друга. Инокулят готовили в концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. В экспоненциальной фазе роста культуры равномерно распределяли (по 100 мкл) на поверхности среды в чашках Петри, инкубацию осуществляли при 28°C. Результаты учитывали на 3-7 сут. путем измерения диаметра зоны задержки бактериального роста вокруг соответствующего диска с точностью до 1 мм.

Вирулентность микроорганизмов изучали методом внутрибрюшинного заражения клинически здоровых беспородных самок белых крыс со средней массой 200 г. Бактериальную культуру выращивали на МПА в течение суток, затем смывали ее физиологическим раствором (0,85%-ный NaCl) и готовили суспензию по оптическому стандарту мутности (10 ед. мутности). Экспериментальным животным вводили внутрибрюшинно по 1 мл полученной суспензии (доза бактериальных клеток составила 10^9 КОЕ/животное). Контрольным животным вводили по 1 мл физиологического раствора. Каждая экспериментальная и контрольная группа состояла из 10 мышей, в одной клетке содержалось по 5 крыс. Наблюдение вели ежедневно в течение четырнадцати дней. Вирулентность штаммов оценивали по количеству летальных случаев в экспериментальных группах (Лабинская и др., 2005).

Определение экологической взаимосвязи бактерий проводили двумя методами; 1) методом перекрестного посева и 2) с помощью метода лунок (Нетрусов и др., 2005). В первом случае производили посев микробиологической петлей нескольких исследуемых культур на поверхность плотной питательной среды, перпендикулярно к этим культурам засеивали другие исследуемые культуры. Через несколько суток учитывали особенности роста культур в местах соприкосновения. В соответствии со второй методикой в лунки, проделанные стерильным пробочным сверлом в МПА, вносили суточную бульонную культуру бактерий, а на поверхность МПА высевали штрихом другой изучаемый микробный штамм, в перекрестном варианте – наоборот. Через несколько суток оценивали особенности роста культур по краю лунки.

При изучении субстратного спектра бактерий в качестве единственного источника углерода и энергии использовали: товарную нефть, вазелиновое масло,

ДТ, буровой раствор на основе минерального масла и ряд индивидуальных углеводородов: *n*-алканы (гексан, гептан, октан, декан, гексадекан), ароматические соединения (бензол, толуол, ксилол, кумол, нитробензол), алициклические (циклогексан) и полиароматические (нафталин).

Многокомпонентные субстраты стерилизовали отдельно и вносили в агаризованную среду М9 при равномерном перемешивании в момент розлива среды в чашки Петри. Конечная концентрация субстратов составляла 0,4 г/л. Способность микроорганизмов использовать для роста РУО и его дисперсионные среды (нефтепродукты) определяли с помощью чашечного метода Мак-Кланга, согласно которому отмечалось наличие роста культуры вокруг и внутри капель углеводородного субстрата на поверхности плотной минеральной среды (Теппер и др., 1993).

Способность бактерий к деструкции индивидуальных углеводородов (0,4 г/л) определяли с помощью метода лунок (Егоров, 1983). Углеводород вносили в лунку диаметром 8 мм, проделанную стерильным пробочным сверлом в центре агаризованной минеральной среды М9 на чашке Петри. Он равномерно диффундировал в агар и частично испарялся, так что культивирование проводили одновременно и на твердом субстрате, и в парах углеводородов. Вокруг лунки с субстратом производили штрихом посев культур. О деструкции углеводородов судили по интенсивности роста тест-культур на 1-7-е сут. инкубации в термостате при 28°C.

Деструктивную активность бактерий определяли после 10 сут. культивирования на качалке (160 об/мин) при комнатной температуре в жидкой минеральной среде М9 с нефтью, ДТ или минеральным маслом в качестве единственного источника углерода и энергии. В качестве контроля использовали минеральную среду с нефтепродуктами без бактерий. Каждый вариант изучали в трех повторностях.

В экспериментах использовали нефть, полученную с Саратовского нефтеперерабатывающего завода, которая представляет собой смесь нефтей различных месторождений: Астраханского, Калмыцкого и др. Соотношение

нефтяных фракций в данной нефти было следующим, %: парафины и нафтены – 68,2; моно- и бициклические ароматические соединения – 11,7; ПАУ – 7,5; спирто-бензольные смолы – 12,6. ДТ было представлено преимущественно углеводородами алканового ряда (65,96%) и нафтенами (32,72%), низкомолекулярные ароматические углеводороды составляли всего лишь 1,02%, ПАУ – 0,3%. В работе использовали коммерческое ДТ марки «Л». Фракционный состав минерального масла марки Luxe standart 15w-40 был также представлен преимущественно углеводородами алканового ряда (82,3%) и нафтенами (17,0%), низкомолекулярные ароматические углеводороды составляли 0,5%, ПАУ 0,2%.

Остаточное содержание нефтяных углеводородов в минеральной среде определяли гравиметрическим методом (РД 52.18.647-2003. Методические указания..., 2003) и методом газовой хроматографии (Суржко и др., 1995; Другов, Родин, 2007).

Для гравиметрического анализа экстракцию неполярных и малополярных углеводородов осуществляли органическим растворителем (хлороформом), дробно (3 раза) по 5 мл в течение 5 мин непосредственно в колбе с культуральной жидкостью объемом 50 мл на встряхивателе. Собранные экстракты помещали в стеклянные стаканы, высушивали и перерастворяли в экстрагенте. Эту процедуру проводили для получения экстрактов, свободных от бактериальных клеток. После этого элюаты пропускали через сорбент (оксид алюминия – Al_2O_3) в стеклянной хроматографической колонке, смывая их растворителем, в качестве которого использовали хлороформ. Алюминий окись (Al_2O_3) перед употреблением активировали прокаливанием при $t=600\pm 10^\circ\text{C}$ в течение 4 ч. Процесс извлечения нефтяных углеводородов осуществляли при комнатной температуре при истечении элюатов в предварительно взвешенные стеклянные стаканы. После полного испарения растворителя стаканы взвешивали еще раз для определения количества собранных углеводородов. По полученным результатам рассчитывали степень их деструкции, которую выражали в процентах.

Экстракцию углеводородов для газовой хроматографии осуществляли четыреххлористым углеродом. Для этого через 10 сут. культивирования в колбу

добавляли 5 мл экстрагента и встряхивали в течение 5 мин на встряхивателе. Экстракцию повторяли трижды. Экстракты собирали в мерные пробирки, осушали безводным Na_2SO_4 и доводили объем до 15 мл. Подготовленные пробы анализировали на газовом хроматографе «GC-2010» (Япония) с кварцевой капиллярной колонкой HP-5 ($30\text{м} \times 0,32\text{мм} \times 0,25\text{мкм}$). В качестве газа-носителя использовали гелий. Линейная скорость 34,6 см/сек. Температура инжектора и детектора 300°C . Идентификацию хроматографических пиков проводили по временам удерживания. Колличество остаточного содержания нефти оценивали по площади пиков.

2.5 Оценка токсического воздействия на почву компонентов буровых шламов

2.5.1 Условия проведения модельного эксперимента, характеристика почвы, загрязнителей

В лабораторных экспериментах нами исследовалось токсическое действие на почву трех видов ИЭР, различающихся типом дисперсионных сред, среди которых были: минеральное масло И-20 (ИЭР 1), товарная нефть (ИЭР 2) и ДТ марки «Л» (ИЭР 3). Фракционный состав дисперсионных сред подробно описан в подглаве 2.4. Также нами отдельно оценивалось токсическое воздействие на почву вышеперечисленных дисперсионных сред и ряда компонентов дисперсионной фазы, входящих в состав исследуемых буровых растворов. ИЭР с объемным соотношением углеводородная фаза/водная фаза (75:25) были смоделированы на основе литературных данных о составе буровых растворов, наиболее распространенных в бурении нефтяных и газовых скважин (Гаршина и др., 2011; Смирнова, 2011; Young, 1994). Остальные реагенты, входящие в состав ИЭР, г/л: органобентонит – 4,6; сульфонол – 22,8; BaSO_4 – 645,0; $\text{Ca}(\text{OH})_2$ – 22,8; CaCl_2 – 51,8.

В экспериментах использовали чернозем южный, суглинистый, отобранный в Саратовской области, со следующими гранулометрическими характеристиками:

частицы >5 мм – 1,8%; <5->3 мм – 4,2%; <3->1 мм – 10,0%; <1->0,5 мм – 11,5%; <0,5->0,25 мм – 19,0%; <0,25 мм – 53,6%. Разделение на гранулометрические фракции осуществляли при помощи стандартного набора сит с последующим взвешиванием выделенных фракций (Добровольский, 2001). Чернозем южный содержал: 0,9% общего органического углерода, 6,3 мг/кг NO_3^- , 59,3 мг/кг NH_4^+ , 156 мг/кг подвижного P_2O_5 , pH почвы (солевой) 7,2. Таксономическая принадлежность почв приводится в соответствии с «Классификацией и диагностикой почв СССР» (1977) с учетом региональных особенностей (Болдырев, Пискунов, 2006).

Перед экспериментом из почвы удаляли крупные включения, просеивали через сито с диаметром ячеек 5 мм и загрязняли ИЭР и дисперсионными средами в концентрации 40 и 25 г/кг, соответственно; также в почву вносили компоненты дисперсионной фазы: BaSO_4 – 25,8; $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0,9; CaCl_2 – 2,1; сульфонол – 0,9 г/кг. Концентрации загрязнителей взяты на основании данных о потерях ИЭР с выбуренной породой при бурении скважин, которые происходят, несмотря на использование высокотехнологичного оборудования (Ягафарова, Барахнина, 2006). По литературным данным органобентонит не обладает токсическим действием, поэтому отдельно этим компонентом почву не загрязняли (Смирнова, 2011). Почву тщательно перемешивали и выдерживали в течение суток для равномерного распределения загрязнителей. В качестве контроля использовали исходную чистую почву. Токсичность образцов почвы определяли непосредственно после загрязнения (1 сут.) и через 30 сут. выдерживания почвы без полива, при комнатной температуре.

2.5.2 Метод определения токсичности почвы с использованием дождевых червей

Оценку токсичности почвы на дождевых червях проводили по методу, основанному на исследовании их выживаемости при воздействии токсичных веществ (Международный стандарт..., 1998). В качестве тест-организмов

использовали дождевых компостных червей «Старатель», полученных в лабораторных условиях профессором А.М. Игониным путем скрещивания особей двух пространственно отдаленных популяций (местной российской и киргизской популяции) навозных червей *Eisenia foetida* (Патент РФ №2058737). Черви «Старатель» элитной промышленной линии были любезно предоставлены ОАО «Агрофирма Грин-ПИКЪ», (г. Ковров, Владимирская обл.) и впервые использованы нами для оценки токсичности комплексного загрязнения почвы. Преимущество их использования, по нашему мнению, заключалось в применении особей генетически однородной популяции, что повышало достоверность результатов тестирования.

Экспериментальные пластиковые контейнеры заполняли загрязненной или чистой (контрольной) почвой (1 кг) и помещали по 20 особей. Каждый вариант эксперимента был представлен в трех повторностях. Для создания оптимальных условий для червей «Старатель» в ходе биотестирования почву увлажняли профильтрованной водопроводной водой, поддерживая влажность в ходе эксперимента на уровне не менее 60%, дополнительно вносили биогумус (червекомпост) в соотношении к почве 1:6. Инкубирование дождевых червей осуществляли при комнатной температуре. Контейнеры сверху плотно фиксировали марлей, которая содержала небольшие отверстия для воздухообмена, и, в то же время, препятствовала высыханию почвы и случайному высвобождению из контейнеров тест-организмов.

Показателем выживаемости служило среднее количество червей, выживших в тестируемой почве, по сравнению с контролем (незагрязненная почва). Критерием высокой токсичности являлась гибель 50% и более дождевых червей в тестируемой почве по сравнению с контролем. Проводили кратковременное биотестирование в течение 2 сут., что позволило выявить острое токсическое действие загрязнителей почвы на дождевых червей. В ходе более длительного биотестирования (7 сут. экспозиции) оценивали субхроническое действие экополлютантов на дождевых червей. Дополнительно изучали изменение поведенческих реакций у тест-организмов.

2.5.3 Метод определения фитотоксичности почвы

Для выявления токсичности почвы и воды широко используются фитотесты, в которых растения способны адекватно реагировать на экзогенное химическое воздействие путем снижения всхожести семян, интенсивности прорастания корней и побегов, следовательно, выступать в роли индикаторов токсичности (Колесникова и др., 2007; Dorn, Salanitro, 2000).

Оценку токсичности почвы, загрязненной исследуемыми поллютантами, проводили в фитотесте на трехсуточных проростках скороспелого редиса сорта «Заря», который характеризуется высокой всхожестью. 20 г испытуемого образца почвы помещали в стеклянные чашки Петри, увлажняли 5-тью мл дистиллированной воды, на поверхность почвы в каждую чашку помещали 20 предварительно откалиброванных семян тест-растения. Через 3 сут. инкубации в термостате при 28°C определяли всхожесть семян в процентах, учитывая число проросших семян редиса, измеряли в миллиметрах среднюю длину побега и среднюю длину корня у проростков редиса (Остроумов, 1990).

Средняя длина побега и средняя длина корня – это отношение суммарной длины побегов или корней к числу проросших семян. Всхожесть семян рассчитывали по формуле:

$$\text{Всхожесть} = \frac{\text{число проросших семян}}{\text{общее число семян}} \times 100\%$$

В качестве контроля служила чистая почва, не подвергавшаяся химическому воздействию. Для каждого варианта определение проводилось в трех повторностях. Определяли разницу (в %) изученных показателей между загрязненной и контрольной чистой почвой. Разницу показателей до 10% по сравнению с контролем не принимали во внимание и почву считали экологически чистой, разница в 10-30% указывала на слабую токсичность почвы, от 30 до 50% – на среднюю степень, а выше 50% – на высокую степень фитотоксичности почвы.

2.5.4 Определение токсичности почвы по дегидрогеназной активности бактерий

Используемый метод основан на способности ферментов бактерий – дегидрогеназ восстанавливать за счет дегидрирования бесцветный 2,3,5-трифенилтетразолийхлорид (ТТХ) до 2,3,5-трифенилформаза (ТФФ), имеющего темно-красный цвет. Дегидрогеназы высоко чувствительны к действию токсичных веществ, в присутствии которых их активность снижается. Это позволяет путем сравнения количества трифенилформаза, образованного дегидрогеназами микробного штамма *Dietzia maris* AM3, в опытах и контроле оценить степень токсичности исследуемых образцов почвы.

В начале эксперимента, микробный штамм *D. maris* AM3, хранящийся в коллекции непатогенных микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов), выращивали в течение 3 сут. на МПА. Затем готовили в стерильном физиологическом растворе суспензию тест-культуры *D. maris* AM3 с оптической плотностью 0,5 ед. Оптическую плотность бактериальной суспензии определяли на КФК-2 в кюветах толщиной 1 см при синем светофильтре ($\lambda=440$ нм). В химически чистые сухие пробирки вносили в указанной последовательности следующие растворы: 1,2 мл 1/15 М Na_2HPO_4 ; 0,5 мл 0,1 М глюкозы; 0,1 мл 0,1 М MgSO_4 ; 0,2 мл 0,5% ТТХ; 1 мл бактериальной суспензии и 1 г почвы, предварительно выдержанной в сушильном шкафу при $t=180^\circ\text{C}$ в течение 1,5 часов для инактивирования почвенных ферментов.

В качестве контроля анализировали бактериальную суспензию с вышеназванными растворами без добавления почвы.

Полученную смесь инкубировали в термостате при $t=28^\circ\text{C}$ в течение 5-7 сут. до появления окраски формаза. Из реакционной смеси ТФФ экстрагировали ацетоном (по 5 мл в каждую пробирку). Для полного извлечения формаза из реакционной смеси пробирки тщательно встряхивали, а затем отстаивали. На полноту извлечения ТФФ указывало обесцвечивание реакционной смеси. ТФФ,

осторожно, с помощью фторопластовой пипетки переносили в кюветы для колориметрирования. Колориметрировали в кюветах толщиной 1 см при синем светофильтре ($\lambda=440$ нм). Количество образованного бактериями ТФФ рассчитывали по калибровочной кривой, и по отклонению этого показателя от контрольного (в чистой почве) оценивали токсичность исследованных почвенных образцов. Степень токсичности почв рассчитывали также, как в описанном выше (подраздел 2.1.3) фитотесте.

2.5.5 Расчет индексов токсичности почвы

Для проведения сравнительного анализа степени токсичности почвы, определенной с помощью различных методов биотестирования, использовали методику расчета индекса токсичности оцениваемого фактора (ИТФ) по Р.Р. Кабирову с соавт. (1997). Для получения сопоставимых результатов рассчитывали индекс токсичности оцениваемого фактора или интегральный показатель токсичности среды по формуле: $ИТФ = (ТФ_0/ТФ_к)$, где $ТФ_0$ – значение тест-функции в опыте, а $ТФ_к$ – значение в контроле.

Для обобщения всех параметров, полученных в результате биотестирования, производили расчет $ИТФ_{ср}$ – среднего значения величины ИТФ для каждого опыта по формуле: $ИТФ_{ср} = (ИТФ_1 + ИТФ_2 + ИТФ_n)/n$. Затем сравнивали полученные результаты со шкалой токсичности, где: 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: $ИТФ = 0$.

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, учитывая, что проблема токсического действия на почву данных поллютантов изучена недостаточно. Конечно, существуют и специальные химические реагенты, различающиеся на разных месторождениях, однако, считается, что в большинстве случаев оказываемое ими воздействие незначительно по сравнению с углеводородами и солями. Так, в работе М.Н. Саксонова с коллегами (2008) показано, что присутствие в буровых растворах таких полимеров как: КМЦ, полиакриламида, гипана, сополимера СВАП-3, некоторых водорастворимых солей, с точки зрения токсичности не имеет существенного значения для экологической безопасности.

Биотестирование является важным элементом биодиагностики качества техногенных субстратов и природных сред, в том числе, почвы, способным интегрально и оперативно оценить степень их токсичности (Ибрагимова и др., 2009; Терехова, 2010). Спектр методов биотестирования почвы включает использование чувствительных к токсическим воздействиям организмов, среди которых: микроорганизмы, микроводоросли, высшие растения, почвенные беспозвоночные. В России для задач экологического контроля используются методы биотестирования, включенные в Федеральный реестр методик и реестр Природоохранных нормативных документов, в которых тест-организмами являются гидробионты: *Paramecium caudatum*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia affinis* и *Scenedesmus quadricauda* (Терехова и др., 2006). Многие исследователи считают, что комплексное биотестирование, т.е. расширенный набор биотест-систем, позволяет оценить токсичность не только исходных загрязнителей, но и их метаболитов (Achazi, 2002).

Учитывая чрезвычайно сложный гетерогенный состав ИЭР, очевидно, что для адекватной оценки степени их негативного воздействия на почву требуется использование нескольких биотестов, при этом важной задачей является выявление оптимального сочетания методов биотестирования.

Для оценки токсичности почвы нами были выбраны три биотест-системы. Как считают исследователи (Маячкина, Чугунова, 2009; Терехова, 2010), для объективного анализа экологической токсичности природных сред и объектов окружающей среды целесообразно использовать в качестве тест-объектов представителей разных систематических групп. В связи с этим, в настоящих исследованиях мы использовали: высшие растения, дождевых червей и микроорганизмы.

3.1 Результаты биотестирования с использованием дождевых червей

Дождевые черви используются в биотестировании различных химических реагентов, загрязняющих почву (Романова, Любомирова, 2009; Dorn, Salanitro, 2000; Schaefer, 2001). В связи с эколого-физиологическими особенностями эти организмы контактируют с почвенными частицами, воздухом и влагой не только на поверхности кожных покровов, но и внутри пищеварительного тракта, непосредственно перерабатывая и накапливая большое количество почвы. Таким образом, они подвергаются прямому влиянию неорганических и органических веществ, находящихся в почве. Дождевые черви легко разводятся в лабораторных условиях, имеют короткое время регенерации и хорошо изучены (Игонин, 1995).

Результаты биотестирования почвы на дождевых червях «Старатель», проведенного нами сразу после внесения загрязнителей, продемонстрировали, что показатели выживаемости тест-объектов в контрольной (100%-ная выживаемость) и загрязненной почве существенно различались (рисунок 2). В почве, загрязненной минеральным маслом, выживаемость дождевых червей через 2 сут. экспозиции составила 100%, что свидетельствовало об отсутствии острой токсичности почвы при добавлении этого поллютанта (рисунок 2а).

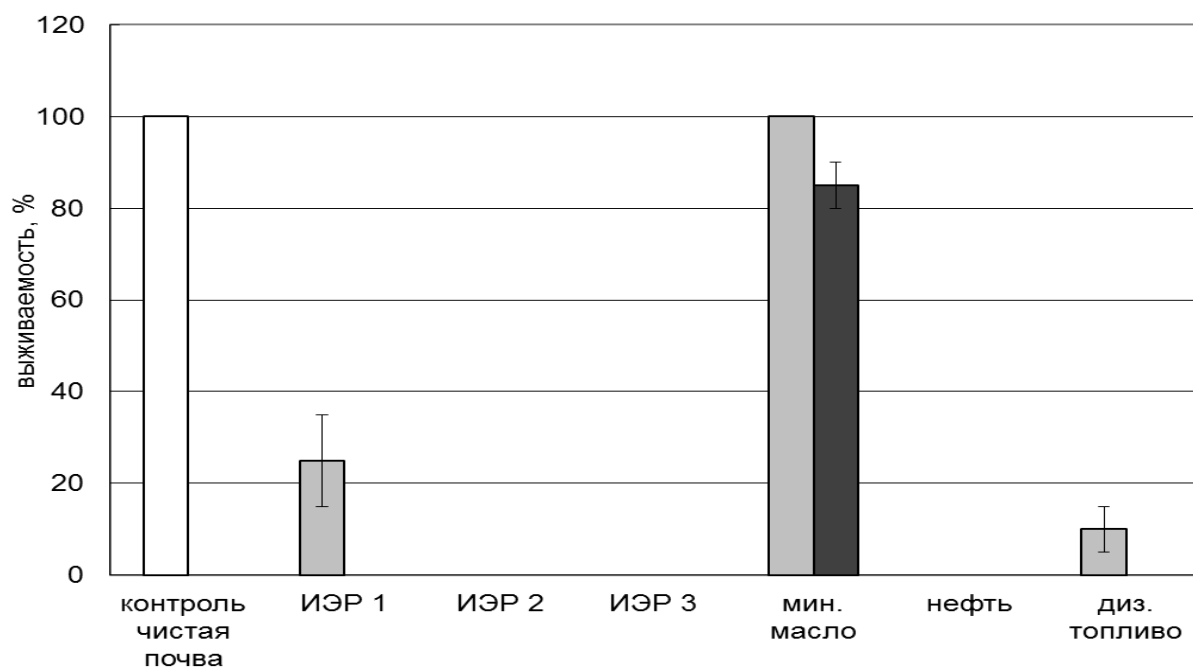
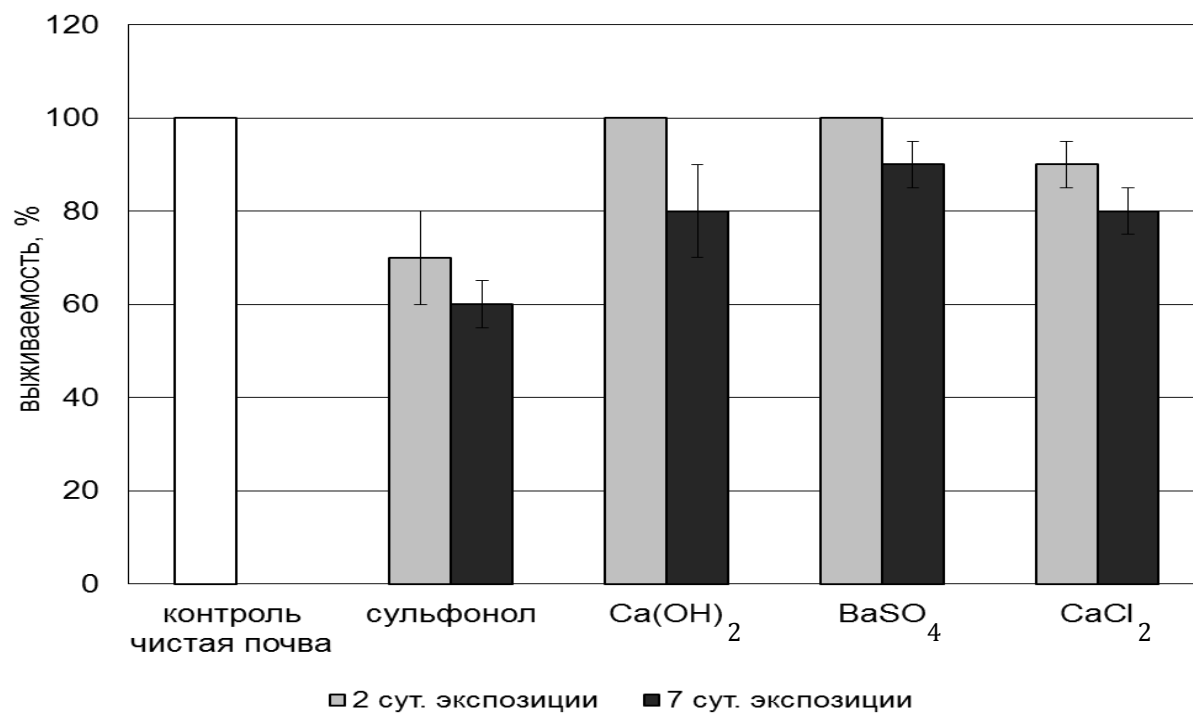
*a**б*

Рисунок 2 – Результаты вермистестирования почвы через 1 сут. после внесения загрязнителей: *a* – ИЭР и их дисперсионных сред; *б* – отдельных реагентов, входящих в состав ИЭР

В варианте с ИЭР 1, основой которого было минеральное масло, выживаемость червей «Старатель» составила 25%. В почве с ДТ, нефтью и ИЭР с

соответствующими дисперсионными средами выживаемость была крайне низкой – от 0 до 10%, что указывало на острое токсическое воздействие данных загрязнителей на дождевых червей. Такое ингибирующее действие наблюдалось и через 7 сут. инкубирования дождевых червей в почве.

Следует отметить, что при проведении тестирования в этих вариантах наблюдали изменения в поведенческих реакциях дождевых червей: они не зарывались в почву (рисунок 3а), а стремились на ее поверхность, что также являлось показателем наличия в почве токсичных веществ. При окончательном учете результатов наблюдали погибших высохших (обезвоженных) дождевых червей (рисунок 3б). В почве, загрязненной минеральным маслом, выживаемость червей через 7 сут. снизилась от 100 до 85%. Снижение выживаемости дождевых червей в течение 7 суток до 40% при 1,5%-ной концентрации нефти в почве было показано в работе Н. Safwat с соавт. (2002).



а



б

Рисунок 3 – Биотестирование почвы с загрязнителями с использованием дождевых червей: а – визуализация поведенческих реакций на начальных этапах эксперимента в почве с ИЭР 2; б – учет результатов через 7 сут. экспозиции

В почвенных образцах с добавлением BaSO_4 и $\text{Ca}(\text{OH})_2$ выживаемость дождевых червей через 2 сут. составила 100, с CaCl_2 – 90%, указывая на отсутствие острой токсичности почвы, загрязненной этими реагентами (рисунок 2б). Среди исследованных компонентов буровых растворов максимальное снижение выживаемости тест-организмов наблюдалось при загрязнении почвы

сульфонолом, которая составила в этом варианте 70%. Через 7 сут. экспозиции выживаемость со всеми загрязнителями несколько снизилась и составила в почвенных образцах с баритом – 90, известью и CaCl_2 – 80, сульфонолом – 60%, что указывает на 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 контрольной чистой почве и в вариантах с минеральным маслом и ИЭР на его основе.

В остальных почвенных образцах с ИЭР и их дисперсионными средами показатели выживаемости не изменились по сравнению с предыдущим тестированием, выполненным через 1 сут. после загрязнения почвы (рисунок 4а). В почве, загрязненной минеральным маслом, выживаемость червей через 7 сут. экспозиции осталась на уровне 100%, со всеми буровыми растворами, нефтью и ДТ была равна нулю.

В почве, загрязненной отдельными компонентами, входящими в состав исследуемых буровых растворов, через 30 сут. эксперимента наблюдалось следующее (рисунок 4б). Выживаемость дождевых червей «Старатель» через 2 и 7 сут. экспозиции в почве с известью и баритом составила 100%, что свидетельствует о нетоксичности данных компонентов ИЭР. В почве, загрязненной сульфонолом, выживаемость *E. foetida* через 2 и 7 сут. экспозиции составила 80%, что на 10 и 20% выше, чем в почве сразу после загрязнения. Это может быть связано с процессами абиотической и биотической трансформации ПАВ. В почве с CaCl_2 выживаемость тест-организмов была ниже, чем при первоначальном внесении соли, через 2 сут. экспозиции – на 20%, через 7 сут. данный показатель уменьшился почти в 2 раза по сравнению с результатом анализа через 2 сут. экспозиции, выживаемость составляла всего 40%, что, вероятно, обусловлено осмотическим давлением, создаваемым в почве хлоридом кальция. В этом образце отмечали отсутствие у червей инстинкта переработки почвы, они обезвоживались, становились неподвижными, а затем погибали.

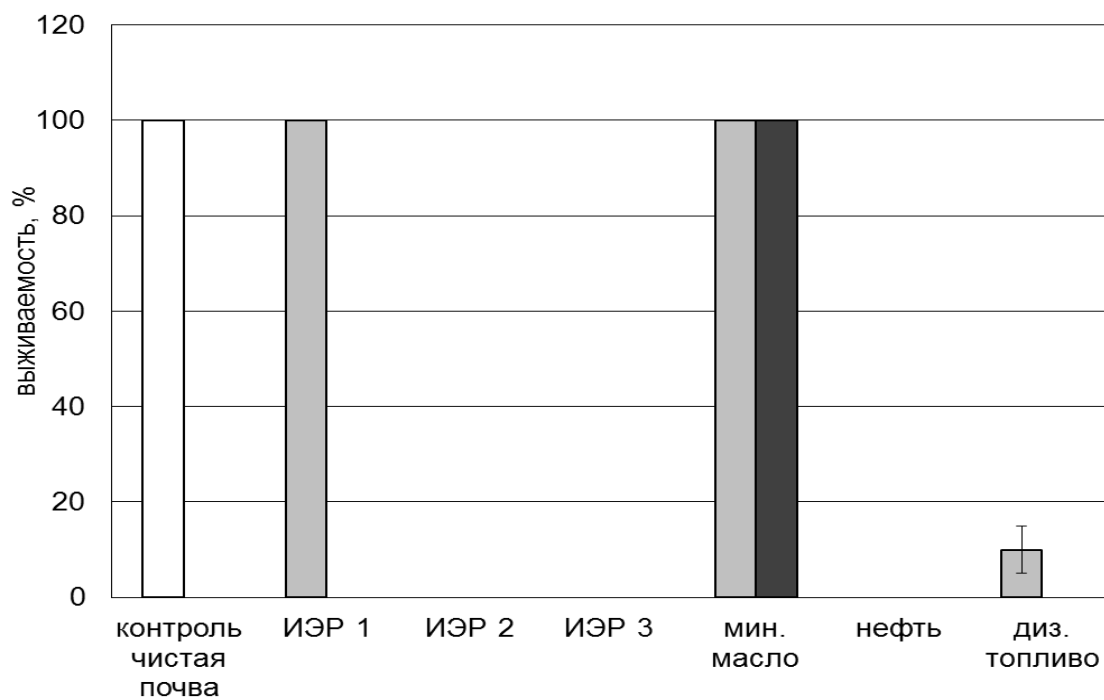
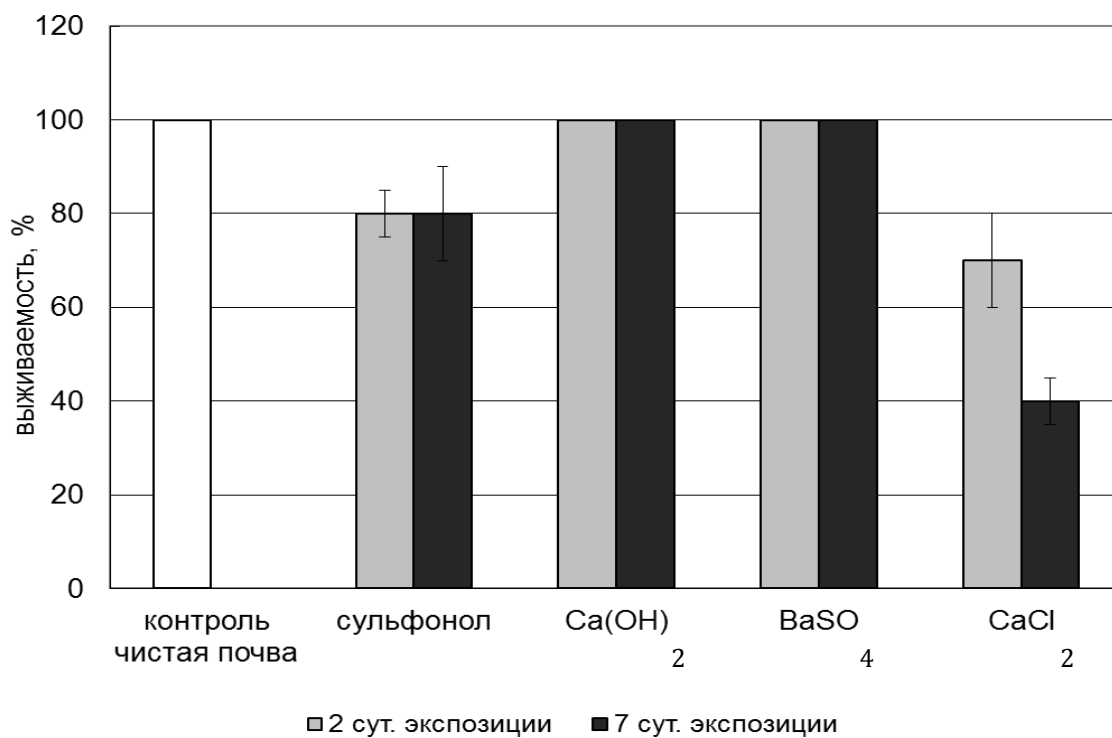
*a**б*

Рисунок 4 – Результаты вермистестирования почвы через 30 сут. после внесения загрязнителей: *a* – ИЭР и их дисперсионных сред; *б* – отдельных реагентов, входящих в состав ИЭР

Известно, что дождевые черви имеют механизмы замещения и консервирования воды в клетках тела. Если влажность в почве становится слишком низкой, черви также начинают терять воду и массу, и могут потерять до 70-75% воды без летального исхода. Они способны поддерживать постоянный уровень соли в своем организме в слабосоленых средах, но не в средах с высокой концентрацией солей. При высокой засоленности почвы осмотическое давление иссушает червей, что приводит, в конечном итоге, к оцепенению и гибели (McCosh, Getliff, 2003). С.В. Максимова с соавт. (2009) исследовала воздействие солесодержащих гололедных реагентов и показала, что содержание солей в водной вытяжке из почв более 1 г/л приводит к значительному угнетению дождевых червей. Также, М.Н. Саксонов с соавт. (2008, 2011) при изучении токсичности компонентов буровых растворов и БШ установил: все исследованные системы соленасыщенных буровых растворов токсичны; насыщение NaCl увеличивает токсичность растворов, содержащих коллоидные наполнители, для тест-организма – *Euglena viridis*; после отмыва БШ от солей токсичность их водных вытяжек близка к токсичности отстойной водопроводной воды.

Результаты осуществленного нами вермитестирования, показавшие подавление тест-функции более, чем на 50% относительно контроля, а в большинстве случаев продемонстрировавшие тотальную смертность дождевых червей, свидетельствовали о высокой степени токсичности почвы при внесении в нее ИЭР и их дисперсионных сред, за исключением минерального масла, при добавлении которого в почву не проявлялся токсический эффект как непосредственно после загрязнения, так и 30 сут. спустя. В целом, и буровой раствор, основой которого было минеральное масло, оказывал меньшее токсическое воздействие на почву по сравнению с остальными ИЭР, в состав которых входило ДТ и нефть, что, скорее всего, связано с разным фракционным составом исследованных загрязнителей, и, в частности, с различным процентным содержанием ароматических углеводородов, как наиболее токсичных (Токсикологическая химия..., 2005; Loibner et al., 2004). Так, Д.О. Таран с

коллегами (2013) с использованием тест-организмов: дождевых червей, дафний и растений пшеницы показал, что пробы почвы, загрязненной нитробензолом в концентрации 0,5 г/кг и выше, проявляли острое токсическое действие.

Имеются сведения, что с точки зрения экологии, здоровья и безопасности, РУО можно классифицировать по содержанию ароматических соединений. К первой группе относят РУО с высоким содержанием ароматических соединений ($>0,35\%$), в том числе, растворы на основе ДТ и нефти. Вторая и третья группы – это РУО со средним и низким содержанием ароматических соединений ($0,001-0,35\%$) и ($>0,001\%$). К этим группам относят РУО на основе минеральных масел (McCosh, Getliff, 2003). Кроме того, известно, что особенностями такого поллютанта как ДТ, являются: 1) глубокое проникновение в почвенные горизонты; 2) наличие большого количества летучих фракций, оказывающих сильное токсическое действие на почвенные организмы (Djomo et al., 2004).

Таким образом, в наших исследованиях с помощью дождевых червей «Старатель» мы показали низкое токсическое воздействие на почву минерального масла и ИЭР на его основе и выраженный токсический эффект нефти, ДТ и соответствующих ИЭР. Эти результаты согласуются с данными исследователей, которые показали, что РУО, содержащие ароматические соединения и циклические УВ, более токсичны для почвенных беспозвоночных (ногохвостки) и растений (Curtis et al., 2001). М.Н. Саксонов с соавт. (2008) в ряде работ сообщал о высокой токсичности БШ со значительным содержанием нефтепродуктов для дафний в хронических опытах.

Через 30 сут. после загрязнения мы наблюдали снижение токсичности почвы с ИЭР на основе минерального масла и сульфолом, что может быть связано с процессами абиотической и биотической трансформации легкоразлагаемых углеводородов и ПАВ, входящих в состав данного бурового раствора. А показатели токсичности почвы с ИЭР 2, ИЭР 3, нефтью и ДТ были достоверно снижены по сравнению с контролем и через 30 сут. эксперимента, что свидетельствовало о проявлении хронической токсичности данных растворов и реагентов.

При оценке влияния неорганических компонентов, входящих в состав исследованных ИЭР, нами установлено, что наибольшее токсическое действие на дождевых червей оказывала почва с хлоридом кальция, что связано, по нашему мнению, с известной (Захваткин, 2003) чувствительностью *E. foetida* к осмотическому давлению в засоленных почвах. По мере того, как разлагается буровой раствор в БШ, высвобождается дисперсная фаза. Среди солей дисперсной фазы хлорид кальция можно рассматривать как наиболее опасный токсикант, т.к. он накапливается с течением времени и может привести к токсичным концентрациям, способным увеличить электропроводность среды.

Добавление в почву в наших экспериментах извести не оказывало токсического действия на дождевых червей, возможно, из-за слишком малой концентрации (0,9 г/кг почвы). Известно, что для дождевых червей оптимальны нейтральные значения pH (Тиунов, 2007), а внесение извести в небольшой концентрации не повлияло существенно на pH почвы. К тому же, имеются сведения, что *E. foetida* толерантны к изменению pH почвы (Воробейник, 1998). Добавление в почву барита в исследуемой концентрации, как установлено нами, также не оказывало негативного воздействия на дождевых червей. Как показал М. Фриман (1999), барит не усваивается дождевыми червями и поэтому не приносит им вреда.

3.2 Результаты фитотестирования

Для измерения токсичности почвы давно и широко применяется фитотестирование на основе высших растений, при котором исследуется всхожесть семян и морфометрические характеристики растений, выращенных на исследуемых почвах (Лисовицкая, Терехова, 2010; Назаров, Иларионова, 2010; Cofield et al., 2007). В том числе, есть достаточное количество работ, посвященных изучению фитотоксичности почв в условиях углеводородного загрязнения (Петухов и др., 2000; Колесников и др., 2007; Adam, Duncan, 1999). К основным причинам утраты плодородия таких почв относят: 1) токсическое

действие нефтяных углеводородов на растения; 2) существенное ухудшение агрофизических и агрохимических свойств почвы; в) перераспределение доминирующих микроорганизмов в составе активно функционирующего микробного сообщества в сторону фитотоксичных форм.

Получены данные, указывающие на наибольшую чувствительность растений по сравнению с другими тест-объектами к компонентам НШ (Никитина и др., 2006). Существует немало рекомендаций, предписывающих использование того или иного вида растений для фитотестирования. На кафедре агрохимии МГУ апробирован метод определения суммарной токсичности почвы с использованием семян редиса, что обосновывается «высокой степенью отзывчивости семян на токсические вещества» (Лисовицкая, Терехова, 2010).

Результаты, проведенного нами фитотестирования представлены в таблице 1. В качестве контроля мы рассматривали чистую почву, и данные представляли в % от контроля. При анализе таблицы 1 видно, что всхожесть семян редиса после внесения в почву загрязнителей снизилась, за исключением варианта с минеральным маслом. Наиболее заметно угнеталась всхожесть семян под влиянием ИЭР с нефтью в качестве дисперсионной среды, составляя всего 16% от контроля. В почвах, загрязненных всеми исследуемыми буровыми растворами, всхожесть семян редиса была ниже, чем всхожесть в почвах, загрязненных соответствующими дисперсионными средами, входящими в состав ИЭР. Через 30 сут. показатели всхожести семян остались на прежнем уровне в почве с дисперсионными средами, а в образцах с ИЭР наблюдалась тенденция к увеличению, указывая на снижение токсического влияния растворов.

Стоит отметить, что в литературе имеются достаточно противоречивые данные о влиянии нефти на прорастание семян. Так, авторы D.W. Blankenship и R.A. Larson (1978) считают, что нефть не влияет на прорастание семян растений, однако, в экспериментах ряда других ученых показано, что при воздействии нефти резко снижается прорастание семян (Джамбетова и др., 2005), что связано, по их мнению, главным образом, с приобретением почвой гидрофобных свойств.

Таблица 1 – Результаты оценки фитотоксичности почвы, загрязненной ИЭР, дисперсионными средами и их

компонентами

Варианты почвы с загрязнителями	Экспозиция почвы после внесения загрязнителей, сут.	Показатель					
		Всхожесть		Средняя длина корня		Средняя длина побега	
		%	% от контроля	мм	% от контроля	мм	% от контроля
контроль – чистая почва		95,0±2,3	100	37,5±1,6	100	17,3±1,9	100
ИЭР 1	1	81,6±2,7	85,8±1,9	18,8±0,5	50,1±1,4	4,8±1,3	27,7±0,3
	30	80,0±0,9	84,2±1,1	20,9±1,4	55,7±1,3	5,2±0,4	30,1±1,0
Минеральное масло	1	93,3±1,9	98,2±2,4	12,7±1,5	33,9±1,8	12,7±2,5	73,4±1,2
	30	86,6±2,8	91,2±2,3	13,9±0,4	37,1±1,4	16,2±1,7	93,6±2,1
ИЭР 2	1	15,0±1,3	15,8±0,4	10,8±2,0	28,8±0,8	5,7±2,1	33,0±1,2
	30	46,6±1,9	49,0±0,6	15,1±1,4	40,2±1,0	5,9±0,3	34,1±2,4
Нефть	1	60,0±2,0	63,1±1,2	8,9±2,3	23,7±1,5	5,3±0,3	30,6±1,1
	30	65,0±1,0	68,4±1,2	1,2±1,6	40,4±0,3	6,7±0,9	38,7±2,3
ИЭР 3	1	50,0±1,0	52,6±0,8	12,6±1,2	33,6±0,4	8,4±1,2	48,6±0,6
	30	76,6±2,7	80,6±2,0	4,0±1,8	10,7±0,9	1,7±2,0	9,8±0,4
Дизельное топливо	1	74,4±1,2	78,3±1,2	12,4±1,2	33,1±1,3	14,6±1,2	84,4±1,1
	30	71,6±1,7	75,4±0,5	15,4±0,5	41,1±2,0	5,8±0,8	33,5±0,4
Сульфонол	1	65,0±1,6	68,4±1,0	18,6±1,2	49,6±2,0	16,8±1,1	97,1±1,0
	30	83,3±0,5	87,7±0,7	20,6±1,7	55,0±1,2	7,3±2,2	42,2±0,6
Ca(OH) ₂	1	80,0±2,1	84,2±1,2	32,0±1,2	85,3±1,6	17,0±2,5	98,3±0,3
	30	58,0±1,4	61,0±0,3	21,0±1,1	56,0±0,8	8,3±1,9	48,0±1,9
BaSO ₄	1	81,6±1,2	85,8±1,3	30,4±1,2	81,1±1,2	16,8±0,3	97,1±0,5
	30	73,0±2,3	76,8±0,2	22,8±1,7	60,9±1,0	11,1±0,3	64,2±1,2
CaCl ₂	1	80,0±2,8	84,2±1,2	21,5±1,4	57,3±1,3	14,3±1,3	82,6±1,9
	30	46,5±1,4	48,9±2,2	13,8±0,5	36,8±2,3	3,7±1,2	21,4±0,7

Е.В. Донец (2009) было показано, что концентрация нефти более 1,0 мг/л снижает всхожесть семян у хвойных древесных растений. Исследователь Е.М. Ogbo (2009) установил, что 1%-ная концентрация ДТ не оказывает никакого токсического эффекта на всхожесть семян *Vigna unguiculata*, *Arachis hypogaea*, *Sorghum bicolor* и *Zea mays*, а более высокие концентрации загрязнителя ингибируют всхожесть семян. А.С. Григориади (2013) при определении фитотоксичности почвы показала, что снижение всхожести семян редиса коррелирует с увеличением концентрации ДТ. В исследованиях D. Minai-Tehrani и A. Herfatmanesh (2007) показано, что нефть стимулирует всхожесть семян овсяницы. Авторы предполагают, что стимулирующее действие нефтяных углеводородов заключается в гормональном эффекте загрязнителя, а также в возможном использовании его в качестве питательного субстрата.

По нашим данным, все добавленные в почву анализируемые компоненты, входящие в состав исследуемых ИЭР, аналогично их дисперсионным средам, угнетали всхожесть семян редиса (таблица 1). Наибольшее угнетение всхожести через 1 сут. после загрязнения наблюдалось в почве с сульфолом, по сравнению с контролем всхожесть снизилась на 32%. Через 30 сут. в этой почве по показателю всхожести семян тест-растения наблюдалась тенденция к уменьшению токсического эффекта. Разница с контролем составила 12%. Во всех остальных вариантах через 30 сут. всхожесть семян редиса заметно снизилась, отличаясь от значений в контрольном образце на 22-48%. Наибольшее угнетение всхожести наблюдалось в почве с CaCl_2 , наименьшее – в почве с BaSO_4 . В первом случае, как мы полагаем, это связано с чувствительностью тест-растения к осмотическому давлению в засоленных почвах (Захваткин, 2003), во втором с низкой химической активностью барита (Фриман, 1999).

Более чувствительными характеристиками влияния исследованных нами загрязнителей на почву оказались показатели длины корней и побегов у проростков редиса, развитие которых заметно ингибировалось. Следует заметить, что тест-параметры, оцениваемые различными исследователями в лабораторном фитотестировании, довольно неоднозначны, однако показатель длина корней

проростков семян используется практически во всех работах и является наиболее информативным (Лисовицкая, Терехова, 2010).

Все исследованные дисперсионные среды и ИЭР после добавления их в почву почти в равной степени сильно угнетали рост корней у проростков редиса: на 50-76% (таблица 1). Минимальное ингибирование корней наблюдалось в почве с ИЭР на основе минерального масла, максимальное – в почве с нефтью. Через 30 сут. в образцах почвы с ДТ и ИЭР на его основе угнетение корней у проростков еще усилилось, особенно в варианте с ИЭР 3 – средняя длина корня составляла лишь 11% от контроля (рисунок 5б), что, возможно, связано с накоплением в почве продуктов трансформации, более токсичных для растений, чем исходный загрязнитель. Авторами (Никитина и др., 2006) было обнаружено аналогичное повышение токсического эффекта на начальном этапе ремедиации шламов нефтедобывающей и нефтеперерабатывающей промышленности. Как предположили исследователи, это может являться следствием образования и накопления токсичных продуктов нефтяных углеводородов в результате микробного метаболизма. Из литературных данных известно также о возрастании токсичности в первые месяцы биоремедиации нефтезагрязненных почв, которое было зафиксировано на люминесцентных бактериях (Marin et al., 2005) и растениях, что связано, по мнению ученых, с образованием более токсичных метаболитов, например, жирных кислот, которые оказывают токсический эффект на растения.

В почве с минеральным маслом и соответствующим ИЭР через 30 сут. нашего эксперимента этот показатель не изменился по сравнению с начальным определением, в почве с нефтью и ИЭР на ее основе ингибирование корней у проростков редиса немного уменьшилось.

Средняя длина корня заметно снижалась и в почве при внесении отдельных компонентов дисперсионной фазы ИЭР (таблица 1). Наибольшее угнетение роста корня у проростков редиса наблюдалось в почве с сульфонолом и CaCl_2 , средняя длина корня составляла 50 и 57% от контроля соответственно. Через 30 сут. в почве с ПАВ наблюдалась тенденция к увеличению средней длины корня у

проростков редиса, что указывало на снижение токсического влияния данного реагента. Противоположная тенденция наблюдалась в почве, загрязненной неорганическими компонентами буровых растворов. Средняя длина корня в почве с CaCl_2 была на 36, с $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и BaSO_4 – на 20% меньше, чем данный показатель через 1 сут. после внесения реагентов в почву.

Как показали результаты фитотестирования почвы через 1 сут. после загрязнения, показатели средней длины побега у проростков редиса в вариантах со всеми исследуемыми ИЭР были в 2-3,6 раза ниже, чем в контрольной почве. Максимальное ингибирование развития побегов наблюдалось в вариантах с ИЭР 1 на основе минерального масла и ИЭР 2 на основе нефти, минимальное – с ИЭР 3 на основе ДТ. В образцах с дисперсионными средами показатели средней длины побега меньше отличались от контроля: с ДТ – на 15, минеральным маслом – на 27%, наиболее существенно в почве с нефтью – на 69%. Через 30 сут. ингибирующее воздействие на надземную часть проростков уменьшилось в вариантах с минеральным маслом, ДТ и ИЭР на его основе.

Все проанализированные компоненты, входящие в состав исследованных буровых растворов, оказывали незначительное ингибирующее воздействие на развитие побега на следующие сутки после загрязнения почвы. Однако через 30 сут. во всех вариантах наблюдалась тенденция к увеличению токсического эффекта изученных компонентов. Средняя длина побега через 30 сут. снизилась в 1,5-3,8 раза по сравнению с показателями, полученными через 1 сут. после загрязнения почвы. Наибольшее снижение средней длины побега наблюдалось в почве с CaCl_2 , наименьшее – с BaSO_4 .

В целом, на основании показателей всхожести семян, средней длины корня и средней длины побега проростков редиса почва с нефтью и ИЭР на ее основе отличалась самой высокой токсичностью. Минеральное масло и ИЭР на его основе оказывали менее выраженный токсический эффект по сравнению с другими поллютантами. В тоже время следует отметить, что минеральное масло сразу после внесения в почву ингибировало рост корней проростков редиса на 66%, а ИЭР на его основе в 3,6 раза угнетало развитие побегов. Почва с баритом и

известью, аналогично результатам вермитестирования, оказалась наименее токсична для тест-растения редиса. Внесение в почву CaCl_2 способствовало проявлению максимальной токсичности среди исследованных компонентов дисперсионной фазы ИЭР, аналогичные данные получены и с помощью тест-организмов – дождевых червей. Повышение показателей всхожести семян редиса и средней длины корня через 30 сут. свидетельствовало о снижении токсичности почвы с сульфолом, в то же время токсический эффект проявлялся заметным угнетением развития надземной части проростков.

Следует заметить, что достоинством фитотестов является использование самой загрязненной почвы, а не водного экстракта из нее, как при биотестировании на гидробионтах; а недостатком – сравнительно большая продолжительность и трудоемкость анализа. Также показано, что результаты фитотестирования во многом зависят от воздушного и водного режима почвы в ходе экспериментов, а не от прямого токсического действия ксенобиотиков на всхожесть и прорастание растений. Поэтому для достоверности наблюдаемых токсических эффектов надежнее было применить и другие биотесты.

3.3 Результаты определения токсичности почвы по дегидрогеназной активности *Dietzia maris* AM3

Ферменты дегидрогеназы широко распространены у живых организмов, они катализируют реакции дегидрирования органических веществ и выполняют функцию промежуточных переносчиков водорода (Николаев, 2004). В то же время, дегидрогеназы высоко чувствительны к действию ядовитых веществ, в присутствии которых их активность снижается, что позволяет использовать активность дегидрогеназ различных организмов в качестве биоиндикационного показателя. Так, В.В. Семенова (2007) сообщает об изменении активности дегидрогеназ *E. coli* K-12 под воздействием слабого и сверхслабого магнитных полей. Обоснована применимость анализа дегидрогеназной активности ила для

контроля работы биологических очистных сооружений предприятий химического профиля (Кремлева, 2007).

Исходный метод (Методические указания..., 1981), предназначенный для определения токсичности различных веществ по дегидрогенаной активности микроорганизмов, был значительно модифицирован нами: вместо тестируемых веществ мы использовали образцы почвы; для того, чтобы исключить влияние на результаты анализа активности дегидрогеназ, содержащихся в почве, перед анализом почву стерилизовали прогреванием в сушильном шкафу при $t=180^{\circ}\text{C}$ в течение 1,5 часов. В исходной методике оценивали активность дегидрогеназ бактерии *E. coli*, нами был выбран другой тест-микроорганизм *D. maris* AM3, выделенный ранее из нефтяного шлама в Саратовской области. Данный микроорганизм, как было установлено, способен к деструкции как алкановых, так и ароматических углеводородов, что предполагает у него наличие широкого спектра ферментов. В связи с использованием другого микробного штамма, в ходе отработки модифицированной нами методики были подобраны оптимальные условия культивирования для данного штамма, как на агаризованной питательной среде, так и в жидкой среде с почвенными образцами, оптимальные значения оптической плотности бактериальной суспензии *D. maris* AM3 для внесения ее в среду с тестируемой почвой.

Преимущества разработанного и использованного нами в данном эксперименте метода оценки токсичности почвы следующие. Метод достаточно прост, хорошо воспроизводим, обеспечивает получение стабильных и достоверных результатов. Для анализа используются непосредственно образцы почвы, а не почвенная вытяжка, что позволяет более достоверно оценить степень токсичности почвы. Методика не требует большого количества образца, навеска почвы для анализа – 1 г. В качестве тест-объекта применяется штамм *D. maris* AM3, который является широко распространенным почвенным микроорганизмом, обладает значительной дегидрогеназной активностью. Данный микроорганизм не требует специальных методов хранения и культивирования, он длительно и стабильно хранится на 0,4%-ной агаризованной LB-среде при 4°C . Хорошо растет

на классических микробиологических средах: МПБ, МПА, минеральной среде с добавлением глюкозы.

Метод обладает высокой чувствительностью. Он позволяет не только регистрировать возможность образования в почве более опасных метаболитов токсикантов, но и обойти защитные барьеры микроорганизма, так как при его использовании токсикант воздействует непосредственно на белковую систему.

В ходе оценки токсичности почвы, загрязненной ИЭР и дисперсионными средами, по суммарной дегидрогеназной активности *D. maris* AM3 были получены следующие результаты (рисунок 5).

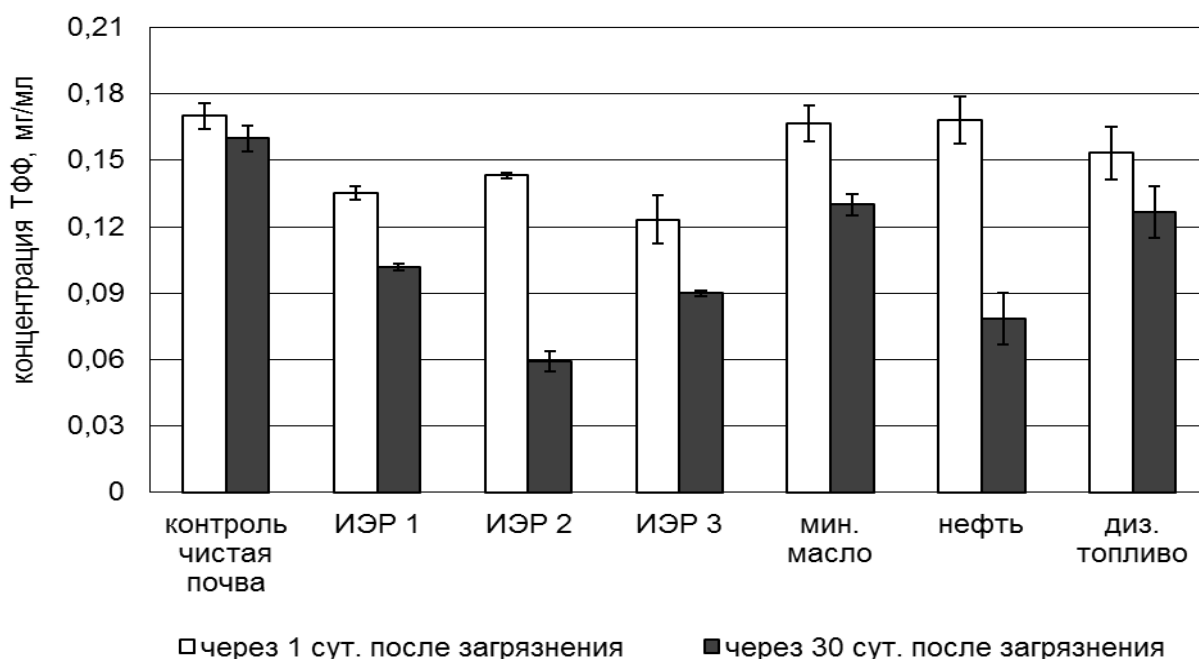


Рисунок 5 – Оценка токсичности почвы с ИЭР и дисперсионными средами по дегидрогеназной активности *D. maris* AM3

Дисперсионные среды, внесенные в почву, не влияли на активность дегидрогеназ микробного штамма AM3, тогда как буровые растворы на основе этих сред снижали данный показатель на 18-30% по сравнению с чистой почвой. Наибольшее снижение наблюдалось в почве, загрязненной буровым раствором на основе ДТ, что соответствует известным данным о токсичности ДТ и составляющих его низкомолекулярных углеводородов для бактерий (Sikkema et

al., 1995; Cunningham, Philp, 2000). Через 30 сут. содержание ТФФ, которое отражало суммарную активность дегидрогеназ *D. maris* AM3, снизилось во всех вариантах. Максимальное снижение отмечалось в образцах почвы, загрязненной нефтью и ИЭР на ее основе: на 51 и 63% соответственно по сравнению с исходной чистой почвой. Токсическое действие остальных дисперсионных сред и буровых растворов на активность дегидрогеназ тест-микроорганизма через 30 сут. экспозиции почвы также увеличилось.

Из всех компонентов, входящих в состав исследованных ИЭР, сульфенол при добавлении его в почву, проявил максимальную токсичность (рисунок 6). Через 1 сут. после загрязнения активность дегидрогеназ снизилась на 42% по сравнению с чистой почвой.

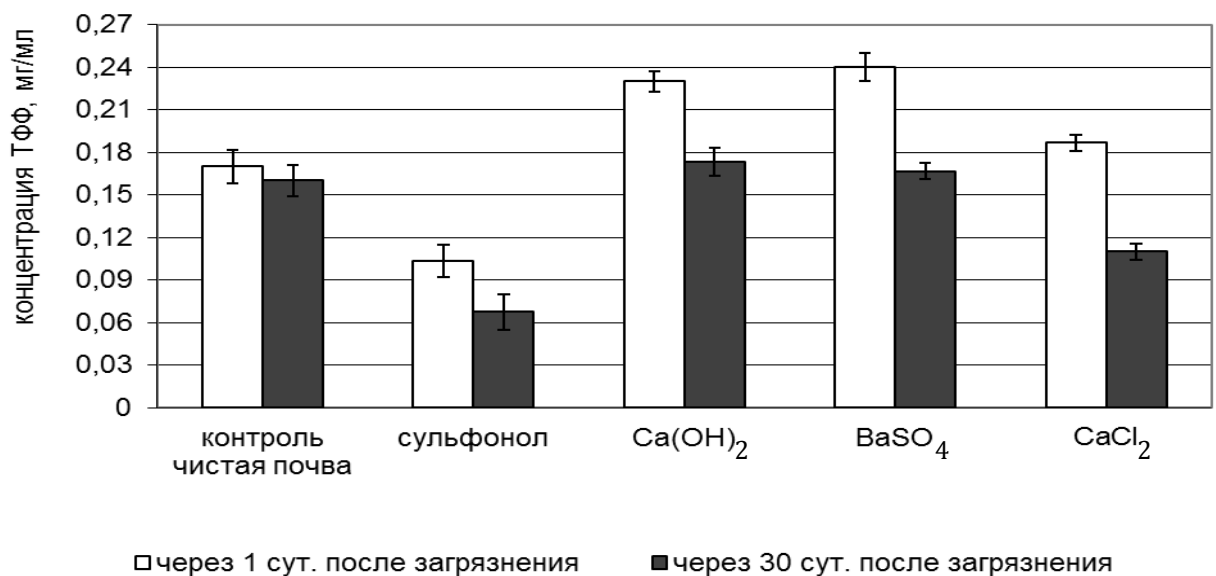


Рисунок 6 – Оценка токсичности почвы, загрязненной отдельными реагентами, входящими в состав ИЭР, по дегидрогеназной активности *D. maris* AM3

Через 30 сут. активность дегидрогеназ в варианте с сульфенолом была в 2,6 раза ниже, чем в чистой почве, что свидетельствовало об усилении токсического действия сульфенола со временем. Все остальные реагенты, внесенные в почву, наоборот, оказывали стимулирующее действие на суммарную активность дегидрогеназ тест-организма через 1 сут. после загрязнения. О подобном

временном стимулирующем действии ионов кальция, входящих в состав CaCl_2 , и извести на активность различных дегидрогеназ сообщалось в работе Ю.В. Овсиенко (1983). Через 30 сут. активность в вариантах с известью и баритом была сопоставима с данным показателем в чистой почве, а в образце с CaCl_2 активность дегидрогеназ снизилась на 32%.

3.4 Интегральная токсичность исследованных образцов почв

При определении степени токсичности почв методами биотестирования большое значение имеет чувствительность к токсикантам подопытных организмов. Наиболее корректный результат, по мнению ряда ученых (Маячкина, Чугунова, 2009, Терехова, 2010) достигается при использовании нескольких тест-объектов из разных систематических групп. Согласно действующим природоохранным нормативным документам Российской Федерации рекомендуется использовать минимум две биотест-системы. Оговорено, что тест-организмы должны принадлежать к разным таксономическим группам (Приказ МПР России от 15.06.2001 № 511). В научной литературе имеются сообщения об использовании тест-систем, состоящих из трех, четырех представителей животного и растительного мира (Селивановская, Латыпова, 2004; Ибрагимова и др., 2009). Широкий спектр методов (микробиологический, гидробиологический и фитотестирование) с анализом реакций представителей разных царств живого повышает надежность анализов.

Как полагают исследователи (Капелькина и др., 2013), сложный состав БШ и применение при бурении реагентов часто неизвестного химического состава обуславливают необходимость проведения серии биологических тестов на организмах с различным уровнем организации. По результатам проведенного ими биотестирования (тест-объекты: высшие растения, микроорганизмы и гидробионты) установлено, что БШ в большинстве случаев относятся к 4-му классу опасности, при применении биоразлагаемых реагентов фиксируется 5

класс, при использовании соли для цементирования скважин – 3-й класс опасности.

В связи с вышесказанным, в качестве тест-объектов для оценки токсического действия на почву буровых растворов и их компонентов нами были использованы организмы разных систематических групп: высшие растения, почвенные беспозвоночные и микроорганизмы. При сравнении результатов, полученных с помощью трех приемов биотестирования, были установлены сходные тенденции. Сравнению результатов способствовал расчет индексов токсичности оцениваемого фактора (Кабиров и др., 1997) для каждой тест-реакции (таблица 2).

Из всех 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. Авторы (Полонский, Полонская, 2013) также показали отрицательное действие нефти и нерафинированного подсолнечного масла на прорастание семян пшеницы, объяснив наблюдаемое явление не прямым воздействием фитотоксических веществ, а образованием на поверхности семян и корней проростков гидрофобной пленки, затрудняющей газообмен и поступление в них воды.

Все исследованные буровые растворы, внесенные в почву, по всем показателям биотестов обладали высокой токсичностью, которая незначительно уменьшалась через 30 сут. экспозиции. Буровые растворы на основе нефти и ДТ, в дисперсионной среде которых содержались ароматические соединения и циклические углеводороды в средней и высокой концентрации, были более токсичны по отношению к тест-организмам по сравнению с ИЭР на основе минерального масла. Полученные данные позволяют рекомендовать использование минерального масла в качестве углеводородной основы ИЭР как наименее токсичной дисперсионной среды.

Таблица 2 – 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 ₂	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) ₂	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 ₄	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.

Результаты микробного теста показали, что активность дегидрогеназ *D. maris* AM3 в почве с различными типами ИЭР была значительно ниже, чем в почве с соответствующими дисперсионными средами, свидетельствуя о большей токсичности ИЭР, которая, вероятно, обусловлена комбинированным действием соединений, входящих в состав ИЭР. В то же время, по результатам фито- и вермитестирования токсичность ИЭР и их дисперсионных сред (нефть, ДТ) существенно не отличалась.

Из всех остальных исследованных компонентов буровых растворов 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 наблюдали при добавлении в почву CaCl_2 и сульфонола. Почва, загрязненная сульфонолом, по всем показателям биотестов, за исключением средней длины побега в фитотесте, отличалась средним уровнем токсичности, которая со временем увеличивалась. При добавлении в почву хлорида кальция все тест-показатели через 30 сут. свидетельствовали о средней и высокой токсичности этой почвы. В то же время, со временем в этом образце отмечалось снижение токсического эффекта на тест-растении редиса.

Также следует отметить, что тест-организмы характеризовались разной чувствительностью к поллютантам. Через 30 сут. экспозиции в загрязненной почве по ряду показателей фито- и вермитестирования наблюдалось снижение токсичности, тогда как по показателю активности ферментов тест-микроорганизма токсичность всех образцов загрязненной почвы, за исключением вариантов с известью и баритом, увеличилась. Таким образом, как подтвердили также в своей работе исследователи (Никитина и др., 2006), отсутствие токсического действия загрязнителей почвы на растения, не является показателем отсутствия токсичности реагентов в отношении других биологических объектов. Это свидетельствует о необходимости использования нескольких биотестов для адекватной оценки токсичности почв.

Итак, нами апробирован комплекс тест-организмов для экотоксикологической оценки почв, загрязненных компонентами БШ, состоящий из высших растений, микроорганизмов и почвенных беспозвоночных. Показанная корреляция результатов биотестирования является убедительным доказательством надежности данного комплекса биотестов, который может быть рекомендован для практического использования.

Как показали наши исследования, токсичность всех исследованных буровых растворов была значительно выше, чем токсичность отдельных компонентов, входящих в их состав. Таким образом, можно заключить, что отдельные загрязнители, входящие в состав бурового раствора, в результате известного комбинированного действия соединений (Терехова, 2010; Тазетдинова и др., 2013) определяют общую токсичность буровых растворов. Изолированного действия загрязнителей не существует, по мнению ученых (Маячкина, Чугунова, 2009), есть лишь совместное действие комплекса факторов, к которым, кроме химических, относятся также физические и другие факторы, при комбинировании их вредное действие может усиливаться (синергизм).

Кроме того, для понимания опасности комплексного загрязнения важно, что именно ПАВ, как сообщают исследователи (Bobra et al., 1984) усиливают токсичность ряда ксенобиотиков, в частности, нефти.

В целом, тремя способами биотестирования было доказано негативное влияние на почву исследованных буровых растворов 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

4.1 Скрининг микроорганизмов-деструкторов компонентов буровых растворов

Известно, что при разработке способов микробной утилизации различных загрязнителей, в том числе компонентов, входящих в состав буровых растворов и шламов, целесообразным является скрининг микроорганизмов-деструкторов в загрязненных местообитаниях, т.к. в таких условиях под воздействием селективного давления формируются микробные штаммы с высоким деструктивным потенциалом (Стабникова и др., 1995; Сваровская, Алтунина, 2004; Сушкова, 2005; Пырченкова и др., 2006).

Присутствие микроорганизмов в нефтяных пластах было установлено давно. На примере различных нефтеносных горизонтов установлено существование в пластах анаэробных микроорганизмов различных метаболических групп – сульфатредуцирующих бактерий, восстанавливающих тиосульфат, Fe^{3+} и элементарную серу, бродильных бактерий, ацетогенов и метаногенов (Назина и др., 2006). Нефтеносные горизонты, как правило, характеризуются бескислородными условиями, и поэтому основное внимание исследователей привлекали анаэробные микроорганизмы (Розанова, Кузнецов, 1974; Magot et al., 2000). Тем не менее, аэробные микроорганизмы также обитают в нефтяных пластах, куда они проникают с нагнетаемой водой, буровым раствором при разработке месторождений и в связи с естественной гидродинамикой подземных вод. В эксплуатирующихся нефтяных месторождениях УОМ являются начальным звеном микробной трофической цепи, осуществляющей биodeградацию нефти (Кузнецова, Горленко, 1965; Розанова, Назина, 1982; Горлатов, Беляев, 1984; Назина и др., 1993; Борзенков и др., 1997; Милехина и др., 1998).

Эксплуатация нефтяных месторождений, которые до момента их разработки практически не подвергались внешним воздействиям, сопровождается поступлением в пласт поверхностных микроорганизмов, кислорода и некоторых

биогенных элементов, что создает предпосылки для развития специализированных микробных сообществ, одним из основных компонентов которых являются УОМ (Борзенков и др., 2006).

В настоящее время показано широкое распространение микроорганизмов в водах нефтяных месторождений. Авторами (Кондакова, Иванова, 2004) проводился поиск жизнеспособных УОМ в подземных водах глубокой скважины (1900 и 3200 м), которые представляли собой хлоридно-кальциевые термальные рассолы. В таком специфическом по экологическим факторам биотопе удалось обнаружить УОМ и грибы. БШ, которые в течение длительного времени находятся на специализированных площадках нефтяных месторождений, также могут служить селективными агентами для образования УОМ, а также бактерий-деструкторов различных компонентов буровых растворов (Калюжин, 2009; Benka-Coker, Olumagin, 1995).

В связи с вышесказанным, мы изучили микробные сообщества нескольких образцов БШ (БШ 1 и БШ 2) с высоким значением pH (pH 9) и степенью минерализации (15%) (более полная характеристика образцов приведена в главе 2) для выявления микроорганизмов-деструкторов химических реагентов, входящих в состав буровых растворов.

В ходе проведенных исследований было показано, что численность гетеротрофных микроорганизмов, выделенных прямым высевом, в микробных сообществах анализируемых образцов БШ 1 и БШ 2 составляла 1×10^3 и $8,9 \times 10^3$ кл/г соответственно (таблица 3). Нами исследовались только аэробные бактерии микробных сообществ, т.к. для микробной утилизации БШ, размещенных на специальных территориях (площадках, амбарах и т.д.), предпочтительнее использование аэробных бактерий.

В связи с многокомпонентным составом БШ, включающим кроме углеводородной основы, различные химические соединения, такие как ПАВ, крахмал, КМЦ и др., для более подробной характеристики микробных сообществ БШ оценивали количество бактерий, гидролизующих крахмал, КМЦ, а также микроорганизмов-деструкторов НПАВ, АПАВ и УОМ.

Таблица 3 – Содержание микроорганизмов различных физиологических групп в буровых шламах

Образцы	Методы выделения микроорганизмов	Численность бактерий, кл/г (мл)					
		гетеротрофных	УОМ	гидролизующих крахмал	гидролизующих КМЦ	деструкторов НПАВ	деструкторов АПАВ
БШ 1	1. Прямой высеv	$1,0 \times 10^3 \pm 0,30$	$<50 \pm 0,44$	$<50 \pm 0,00$	$<50 \pm 0,00$	$<50 \pm 0,00$	$<50 \pm 0,00$
	2. Накопительное культивирование (+БР 1)	$2,8 \times 10^5 \pm 0,58$	$4,4 \times 10^4 \pm 0,22$	$<50 \pm 0,00$	$<50 \pm 0,00$	$<50 \pm 0,00$	$<50 \pm 0,00$
	3. Накопительное культивирование (+БР 2)	$2,0 \times 10^4 \pm 0,22$	$1,1 \times 10^4 \pm 0,44$	$4,3 \times 10^2 \pm 0,42$	$<50 \pm 0,44$	$<50 \pm 0,00$	$<50 \pm 0,00$
БШ 2	1. Прямой высеv	$8,9 \times 10^3 \pm 0,38$	$6,1 \times 10^3 \pm 0,34$	$8,8 \times 10^2 \pm 0,46$	$<50 \pm 0,54$	$<50 \pm 0,00$	$<50 \pm 0,00$
	2. Накопительное культивирование (+БР 1)	$1,4 \times 10^5 \pm 0,38$	$4,3 \times 10^4 \pm 0,45$	$6,9 \times 10^3 \pm 0,58$	$<50 \pm 0,00$	$<50 \pm 0,00$	$<50 \pm 0,00$
	3. Накопительное культивирование (+БР 2)	$1,8 \times 10^5 \pm 0,40$	$1,6 \times 10^4 \pm 0,28$	$4,2 \times 10^3 \pm 0,52$	$<50 \pm 0,00$	$<50 \pm 0,00$	$<50 \pm 0,00$

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

Как было установлено (таблица 3), в образце БШ 2 содержалось: УОМ – $6,1 \times 10^3$ и $8,8 \times 10^2$ кл/г микроорганизмов, гидролизующих крахмал. При этом не обнаруживались микроорганизмы-деструкторы синтанола АЦСЭ-12, сульфонола и КМЦ. Микробное сообщество образца БШ 1 не отличалось разнообразием, т.к. здесь не выявлялись в заметном количестве УОМ, деструкторы НПАВ, АПАВ, КМЦ и крахмала.

При выделении бактерий методом накопительного культивирования в качестве единственного источника углерода и энергии использовали углеводородные субстраты, к которым, предположительно, микроорганизмы БШ могли быть частично адаптированы – это буровые растворы на основе минерального масла (БР 1) и ДТ (БР 2). Данные по общей численности гетеротрофных микроорганизмов и содержанию УОМ, микроорганизмов-деструкторов НПАВ, АПАВ и бактерий, гидролизующих крахмал и КМЦ, полученные при анализе накопительных культур с использованием образцов БШ, представлены в таблице 3.

Результаты экспериментов показали, что добавление в среду культивирования селективных источников питания увеличило количество бактерий ряда вышеперечисленных групп по сравнению с прямым высевом микроорганизмов из БШ. В образце шлама БШ 1 общее содержание гетеротрофных бактерий возросло в 10 раз при культивировании его с буровым раствором на основе ДТ и значительно выше – на два порядка – с раствором на основе минерального масла. Использование данных РУО в качестве питательных субстратов способствовало, в значительной степени, развитию группы УОМ. При прямом высеве из данного образца УОМ обнаружить не удалось, тогда как, при накопительном культивировании численность УОМ достигла значений: $1,1 \times 10^4$ и $4,4 \times 10^4$ кл/мл при введении в среду буровых растворов на основе ДТ и минерального масла соответственно. В образце БШ 1 по сравнению с прямым высевом количество микроорганизмов, гидролизующих крахмал, при культивировании их с модельным раствором на основе ДТ (БР 2), возросло на 2 порядка, при этом,

добавление бурового раствора на основе минерального масла (БР 1) не повлияло на количество данной группы бактерий.

В образце БШ 2 общая численность гетеротрофных микроорганизмов, также как и в БШ 1, достигла значений 10^5 кл/мл при культивировании его с растворами БР 1 и БР 2, численность УОМ – 10^4 кл/мл, примерно в 10 раз увеличилось количество бактерий, гидролизующих крахмал. Оба буровых раствора, использованных нами в качестве селективных реагентов, в равной степени способствовали развитию микроорганизмов разных групп, 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.

Следует отметить, что добавки в среду культивирования в виде буровых растворов 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.

Таким образом, можно отметить, что аэробные гетеротрофные бактерии содержатся в БШ в разных количествах, что обусловлено, вероятно, особенностями условий окружающей среды, а также различным составом выбуренной породы и, как следствие, наличием различных источников питательных веществ. Среди бактерий, входящих в сообщества БШ, обнаруживаются УОМ, микроорганизмы, гидролизующие крахмал. Это создает предпосылки для выделения из таких сообществ активных деструкторов реагентов БШ и буровых растворов, в том числе, опасных для окружающей среды.

4.2 Морфологические и физиолого-биохимические характеристики изолированных культур

В результате проведенных экспериментов из БШ мы изолировали 7 чистых микробных культур, которые в дальнейшем исследовались более подробно.

Прямым высевом из образца БШ 1 выделили штамм с лабораторным шифром НШ, из БШ 2 – ОБР 1. Методом накопительного культивирования из варианта

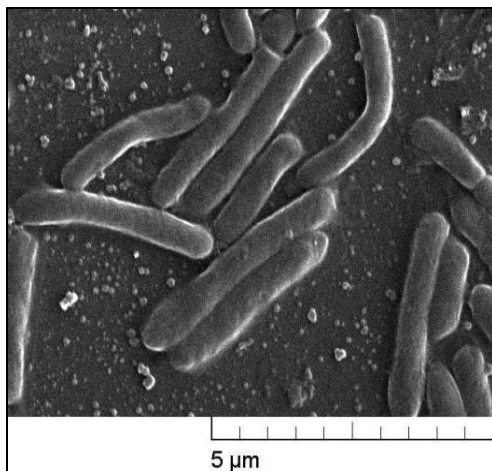
БШ 1, где в качестве единственного источника углерода был буровой раствор БР 2, выделили: ОБР 3.1, ОБР 3.2 и ОБР 3.3; при использовании бурового раствора БР 1 из этого образца изолировали ОБР 1.1; из образца БШ 2 с буровым раствором БР 2 – ОБР 4.1.

С целью идентификации выделенных штаммов нами были проведены исследования по изучению их культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков. Результаты проведенных анализов представлены в таблицах 4, 5. Основные диагностические морфологические и морфометрические характеристики микробных клеток были получены с использованием электронной микроскопии (рисунок 7).

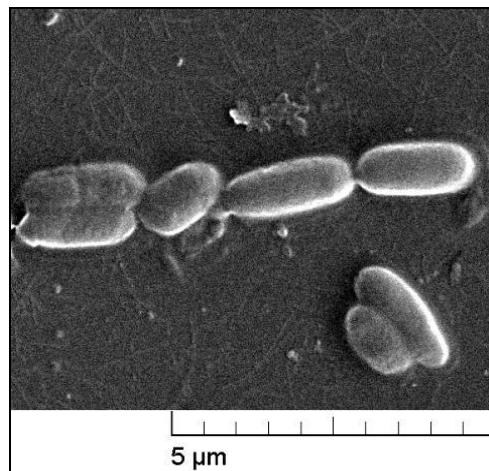
У изучаемых нами культур был также осуществлен анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, результаты которого представлены в приложении 1.

На основании проведенных исследований изолированные из буровых шламов культуры по результатам сравнительного анализа культурально-морфологических, морфометрических и физиолого-биохимических признаков в соответствии с критериями дифференциации бактерий, предложенными в 9-м издании руководства «Определитель бактерий Берджи» (1997), а также согласно принципам молекулярного типирования клеток прокариот были идентифицированы нами 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.

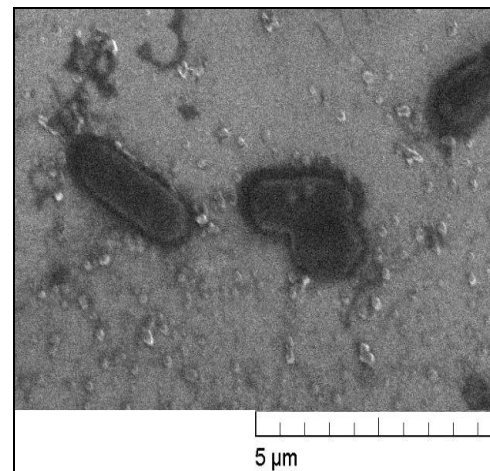
Итак, из образца БШ 1 прямым высевом и с помощью накопительного культивирования выделили: *Bacillus circulans* НШ; *B. firmus* ОБР 1.1; *B. firmus* ОБР 3.1; *Solibacillus silvestris* 3.2 и *B. circulans* ОБР 3.3. Из образца БШ 2 изолировали следующие культуры: *Halomonas* sp. ОБР 1 и *Erwinia rhapontici* ОБР 4.1.



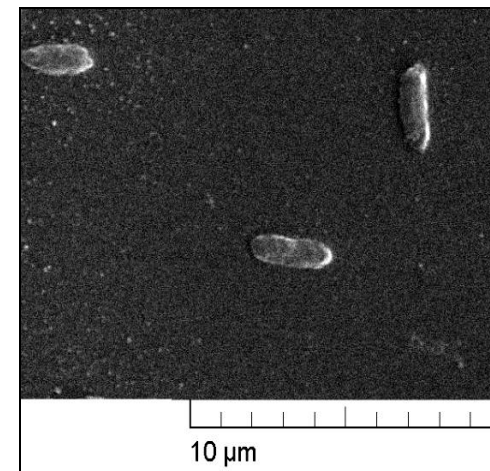
НШ



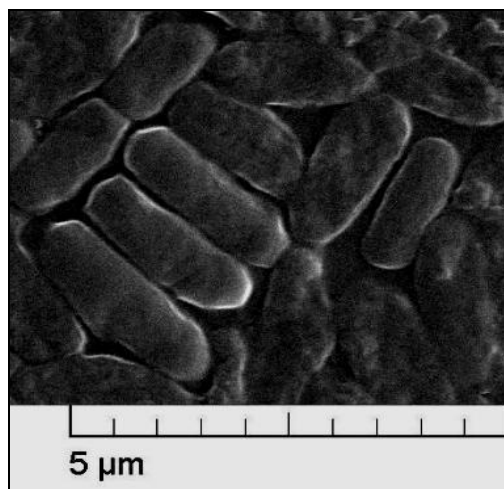
ОБР 1.1



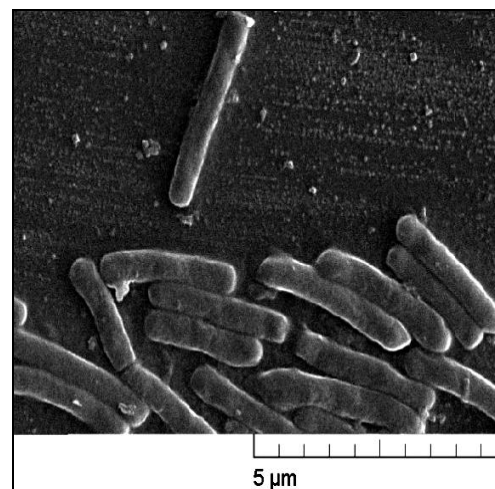
ОБР 3.1



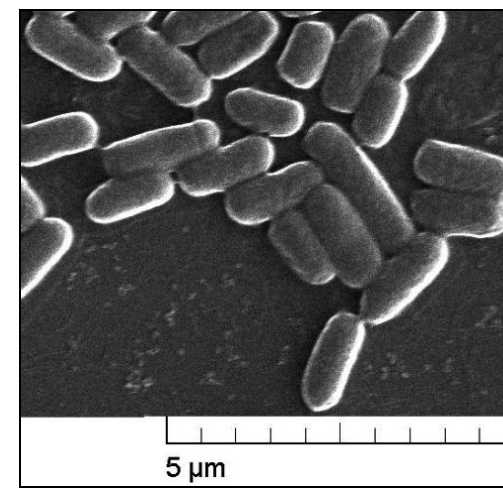
ОБР 1



ОБР 3.2



ОБР 3.3



ОБР 4.1

Рисунок 7 – Изображения клеток выделенных культур в возрасте 24 ч, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии

Таблица 4 – Культурально-морфологические признаки выделенных культур

Лабораторный шифр культур	Основные свойства					
	Микроскопическое исследование	Рост на МПБ	Рост на МПА	Отношение к кислороду	Температурный оптимум	Характеристика колоний
НШ	Грамвариабельные палочки: в возрасте 24 ч - граммотрицательные длинные или слегка изогнутые, расположенные одиночно и попарно; 48 ч - грамположительные короткие. Эндоспоры эллипсоидальные, лежат субтерминально. Споры цилиндрические.	При инкубации в течение 24-48 часов без встряхивания наблюдается равномерное помутнение бульона, образование пленки, осадка	Хороший рост на первые сутки при 28°C	Факультативный анаэроб	20-30°C	Непрозрачные кремовые со слегка выпуклой блестящей поверхностью и ровными краями; d колоний – 1,0-3,0 мм
ОБР 1.1	Грамположительные палочки, расположенные одиночно и в виде цепочек по две-три клетки. Эндоспоры эллипсоидальные, лежат субтерминально. Споры эллипсоидальные.	При инкубации в течение 24-48 часов без встряхивания наблюдается образование осадка при равномерном помутнении среды	Хороший рост на первые сутки при 28°C	Факультативный анаэроб	20-30°C (способен расти при 12°C)	Непрозрачные кремовые со слегка выпуклой блестящей поверхностью и ровными краями; d колоний – 2,0-4,0 мм
ОБР 3.1	Грамположительные палочки, расположенные одиночно и попарно. Эндоспоры эллипсоидальные, лежат субтерминально. Споры эллипсоидальные.	При инкубации в течение 24-48 часов без встряхивания наблюдается образование осадка	Хороший рост на первые сутки при 28°C	Факультативный анаэроб	20-30°C	Непрозрачные белые со слегка выпуклой блестящей поверхностью и ровными краями; d колоний – 2,0-3,5 мм
ОБР 1	Грамотрицательные прямые палочки, расположенные одиночно. Спор не образует	При инкубации в течение 24-48 часов без встряхивания наблюдается образование пленки на поверхности	Хороший рост на первые сутки при 28°C	Аэроб	20-42°C	Округлой формы, с шероховатой поверхностью, блестящие, бело-кремового цвета с ровными краями, сухой консистенции; d колоний – 2,0-4,0 мм

Продолжение таблицы 4

Лабораторный шифр культур	Основные свойства					
	Микроскопическое исследование	Рост на МПБ	Рост на МПА	Отношение к кислороду	Температурный оптимум	Характеристика колоний
ОБР 3.2	Грамположительные прямые палочки, расположенные одиночно. Образует споры. Эндоспоры сферические, лежат терминально в раздутом спорангии.	При инкубации в течение 24-48 часов без встряхивания наблюдается образование пленки на поверхности среды	Хороший рост на первые сутки при 28°C	Аэроб	20-35°C	Мелкие округлой формы, гладкие, блестящие, белого цвета, гомогенные, с ровными краями, слизистой консистенции; d колоний – 1,0-3,0 мм
ОБР 3.3	Грамположительные длинные палочки, расположенные как одиночно, так и попарно. Образует споры. Эндоспоры эллипсоидальные, лежат субтерминально. Споры цилиндрические.	При инкубации в течение 24-48 часов без встряхивания наблюдается образование осадка при равномерном помутнении среды.	Хороший рост на первые сутки при 28°C	Факультативный анаэроб	20-30°C	Непрозрачные белые с ровной блестящей поверхностью и ровными краями; d колоний – 1,0-3,0 мм
ОБР 4.1.	Грамотрицательные прямые палочки с закругленными концами, расположенные одиночно. Спор не образует.	При инкубации в течение 24-48 часов без встряхивания наблюдается образование осадка	Хороший рост на первые сутки при 28°C	Факультативный анаэроб	20-42°C	Крупные округлой формы, гладкие, блестящие, белого цвета, непрозрачные, гомогенные, с ровными краями, слизистой консистенции; d колоний – 3,0-5,0 мм. Через 48 ч инкубации колонии приобретают слегка розовый оттенок.

Таблица 5 – Физиолого-биохимические свойства выделенных культур

Признаки	Лабораторный шифр культур						
	НШ	ОБР 1.1	ОБР 3.1	ОБР 3.2	ОБР 3.3	ОБР 1	ОБР 4.1
Кислотоустойчивость	-	-	+	+	-	-	-
Подвижность	+	+	+	+	+	+	+
Продукция:							
Оксидазы	-	-	-	-	-	+	-
Каталазы	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	+	+	+	+	+	+	+/-
Индола	-	-	-	-	-	-	-
NH ₃	-	-	-	+/-	-	+/-	+
Нитратредуктазы	+	+	+	-	-	-	+
Фенилаланиндезаминазы	+	-	-	-	-	-	-
Казеина	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-
Желатиназы	+/-	-	+	-	+/-	-	+/-
Аргинингидролазы	-	-	-	-	-	+/-	-
Лизиндекарбоксилазы	-	-	-	-	-	+/-	-
Орнитиндекарбоксилазы	-	-	-	-	-	-	-
Лецитиназы	-	-	-	-	-	-	-
Уреазы	-	-	-	-	-	+/-	-
Гидролиз крахмала	+/-	+	-	+/-	-	+/-	-
Утилизация цитрата	-	-	-	+/-	-	-	-
Рост при 10°C	-	+	-	-	-	-	-
Рост при 42°C	+	+	+	-	+	+	+
Окисляет:							
Глюкоза	OF	OF	OF	O	OF	O	F
Лактоза	F	OF	F	O	OF	O	-
Арабиноза	OF	O	-	O	OF	-	F
Сахароза	-	O	OF	O	OF	O	O
Мальтоза	-	O	O	O	O	-	F
Маннит	O	O	OF	O	F	O	-
Ксилоза	O	O	-	O	O	-	-
Фруктоза	O	-	-	-	O	-	-
Галактоза	O	O	-	O	O	O	F
Реакция Фогес-Проскауэра	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: «О» – окисление, «F» – ферментация, « - » – отсутствие реакции.

Сапротрофные спорообразующие бактерии (бациллы) – обычные обитатели почв, они активно участвуют в процессах, связанных с разложением органических субстратов. Показано, что в условиях нефтяного загрязнения в почвах происходит активное размножение клеток бацилл, причем, в большой степени размножаются виды, характерные для почв со слабо протекающими минерализационными

процессами, увеличивается разнообразие видового состава спорообразующей микробиоты (Киреева, Рафикова, 2007).

Авторы (Bento et al., 2003) выделили из почв, загрязненных ДТ (Калифорния, США), консорциум УОМ, основу которого составляли: *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumilus*, *Acinetobacter junii* и *Pseudomonas* sp. Известно (Нетрусов, Котова, 2006; Госманов и др., 2011), что образование споры для бактерий является фактором сохранения вида в неблагоприятных условиях (изменение температуры, рН среды, недостаток питательных веществ, присутствие токсинов и пр.).

Тот факт, что среди выделенных нами из БШ бактерий доминировали представители спорообразующих микроорганизмов, свидетельствует об их широком адаптационном потенциале, связанным, в том числе, со спорообразованием.

4.3 Субстратный спектр бактерий, выделенных из буровых шламов

В связи с тем, что углеводородная составляющая РУО представляет большую экологическую опасность для окружающей среды и требует быстрого и полного разрушения, мы исследовали бактерии, выделенные нами из микробных сообществ БШ, на способность к деградации нефтяных углеводородов.

При изучении деструктивного потенциала микроорганизмов, выделенных из БШ, в качестве единственного источника углерода и энергии в агаризованную минеральную среду вносили сырую нефть, вазелиновое масло, ДТ, буровой раствор на основе минерального масла, ряд индивидуальных углеводородов: *n*-алканы (гексан, гептан, октан, декан, гексадекан), ароматические (бензол, толуол, ксилол, кумол, нитробензол), алициклические соединения (циклогексан) и ПАУ (нафталин).

Все исследованные бактерии характеризовались отчетливым ростом на всех используемых нефтепродуктах (рисунок 8), за исключением штамма *S. silvestris* ОБР 3.2, рост которого в вариантах с вазелиновым маслом и ДТ не наблюдался.



а



б

Рисунок 8 – Рост *B. firmus* ОБР 3.1 на минеральной среде с буровым раствором (а) и вазелиновым маслом (б) в качестве единственного источника углерода и энергии

Рост на нефти и нефтепродуктах предполагает наличие у бактерий соответствующих ферментных систем для деградации углеводородов и механизмов подавления токсического действия нефти. Нефть содержит в своем составе тысячи веществ, и доля немногих из них достигает хотя бы одного процента. Очевидно, что для эффективной деградации нефти штамм должен обладать способностью к компенсации токсического действия загрязнителя и быть способным использовать хотя бы часть компонентов нефти в качестве источников углерода и энергии.

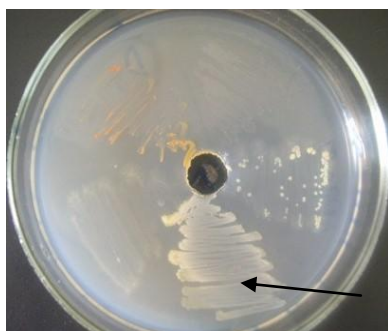
На индивидуальных углеводородах исследуемые микроорганизмы росли с различной интенсивностью. Среди них можно выделить несколько культур (*B. firmus* ОБР 1.1; *B. firmus* ОБР 3.1; *B. circulans* ОБР 3.3 и *B. circulans* НШ), которые активно использовали для роста все тестируемые нами нефтепродукты и индивидуальные углеводороды (таблица 6, рисунок 9).

Относительно большее значение ширины спектра потребляемых углеводородов у данных микроорганизмов можно интерпретировать как относительно большие их возможности к потреблению нефтепродуктов-загрязнителей (таблица 6).

Таблица 6 – Субстратный спектр микроорганизмов, выделенных из буровых шламов

Субстрат	Оценка роста штаммов						
	<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>E. rhapontici</i> ОБР 4.1	<i>Halomonas</i> sp. ОБР 1	<i>B. circulans</i> НШ
Буровой раствор	+	+	+	+	+	+	+
Нефть	+	+	+	+	+	+	+
Вазелиновое масло	+	+	-	+	+	+	+
Дизельное топливо	+	+	-	+	+	+	+
н-алканы:							
Гексан	+-	+-	+	+	+-	+-	+-
Гептан	+-	+	+	+-	+	+	+
Октан	+-	+-	+	+-	-	-	+-
Декан	+-	+-	+	+	+-	+-	+-
Гексадекан	+	+	+	+	-	+-	+
Ароматические углеводороды:							
Бензол	-+	+	+	+	-+	-+	-+
Толуол	+	-+	-	+-	-	-	-+
Ксилол	-+	+	-	+	-+	-+	+
Кумол	-	-	-	-	-	-	-
Нитробензол	+-	-	-	-	-	-+	-
Нафтенy:							
Циклогексан	-	-+	-	-	-	-	-
ПАУ:							
Нафталин	-	-	-	-	-	-	-

Примечания: «-» – отсутствие роста; «-+» – едва выраженный рост (3-5 колоний на чашку); «+-» – заметный рост; «++» – отчетливый рост.



а



б

Рисунок 9 – Рост *B. circulans* ОБР 3.3 на минеральной среде с гексадеканом (а) и ДТ (б) в качестве единственного источника углерода и энергии

Все исследованные бактерии оказались не способны усваивать циклогексан в качестве единственного источника углерода, что свидетельствует о высокой токсичности нафтенных углеводородов для данных микроорганизмов. Бактерии не росли также на минеральной среде с нафталином, выступающим в качестве единственного источника углерода и энергии, в то же время, на МПА с нафталином в концентрации 0,4 мг/л все культуры отличались хорошим ростом на первые сутки, что говорит об устойчивости данных бактерий к нафталину в такой концентрации.

Д.А. Мельников и Э.В. Карасева (2005) сообщали, что у бактериальных штаммов, выделенных из нефтезагрязненной почвы, наиболее часто встречался рост на *n*-алканах (14,5-33,3%), значительно реже на ароматических углеводородах (0-4,3%).

Следует отметить, что, несмотря на высокую токсичность ароматических углеводородов, в частности, нитробензола (Таран, 2012; Elder, Kelly, 1994), микробный штамм *B. firmus* ОБР 1.1 отличался едва выраженным ростом на нитробензоле и отчетливым ростом на толуоле. Микроорганизмы *B. firmus* ОБР 3.1, *S. silvestris* ОБР 3.2 и *B. circulans* ОБР 3.3 характеризовались отчетливым ростом на среде с бензолом.

Итак, полученные результаты свидетельствовали о разнообразии трофических возможностей у выделенных микроорганизмов по отношению к нефтепродуктам и индивидуальным углеводородам – компонентам БШ.

4.4 Количественная оценка деградации нефтепродуктов бактериями, выделенными из буровых шламов

Известно, что самыми распространенными дисперсионными средами в РУО является нефть, ДТ и минеральное масло (Соловьев, 2003; Смирнова, 2011; Young, 1994). Поэтому деструктивную активность выделенных микроорганизмов изучали по отношению к данным дисперсионным средам (нефтепродуктам),

которые вносили в минеральную среду М9 в качестве единственного источника углерода и энергии в концентрации 0,4% (по весу).

Деструктивную активность бактерий определяли после 10 сут. культивирования по остаточному содержанию нефтяных углеводородов в минеральной среде гравиметрическим методом (РД 52.18.647-2003. Методические указания..., 2003).

Через 10 сут. в контрольных образцах (без добавления бактерий) наблюдалась небольшая убыль исследуемых дисперсионных сред, которая обусловлена физико-химическими процессами, происходящими с течением времени в среде с нефтепродуктами (фотолиз, гидролиз и т.п. без участия биоты) (Иваненко, 2006; Shukla, 1990). Количество нефти при этом снизилось на 7, минерального масла – на 8, ДТ – на 15%.

Согласно полученным результатам, у всех изученных микроорганизмов обнаруживалась деструктивная активность по отношению к нефти (рисунок 10).

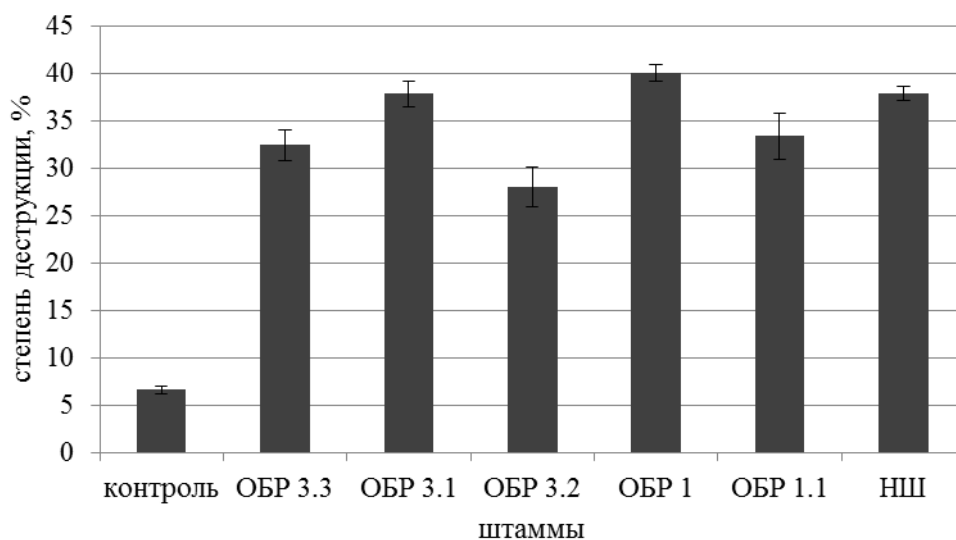


Рисунок 10 – Деструктивная активность бактерий по отношению к нефти через 10 сут. культивирования в жидкой среде

Деструктивная активность бактерий составляла у разных штаммов 28-40%. Максимальная деструктивная активность по отношению к нефти наблюдалась у

штаммов *B. firmus* ОБР 3.1 (рисунок 11а) и *B. circulans* НШ (38%) (рисунок 11б), а также у *Halomonas* sp. ОБР 1 – 40%.

На рисунке 18 визуализируются различия: в жидкой среде с нефтью в качестве единственного источника углерода и энергии и микробными штаммами отмечается отсутствие маслянистости на стенках колбы, заметно помутнение среды вследствие бактериального роста, нефть находится в диспергированном состоянии, в виде мелкодисперсной эмульсии, в гранулах разного размера. В контрольной колбе без бактерий среда – прозрачная, нефть находится без всяких изменений в цвете и агрегатном состоянии. Факт диспергирования нефти говорит о том, что данные штаммы в определенных условиях культивирования способны синтезировать и секретировать ПАВ, эмульгирующие нефть.

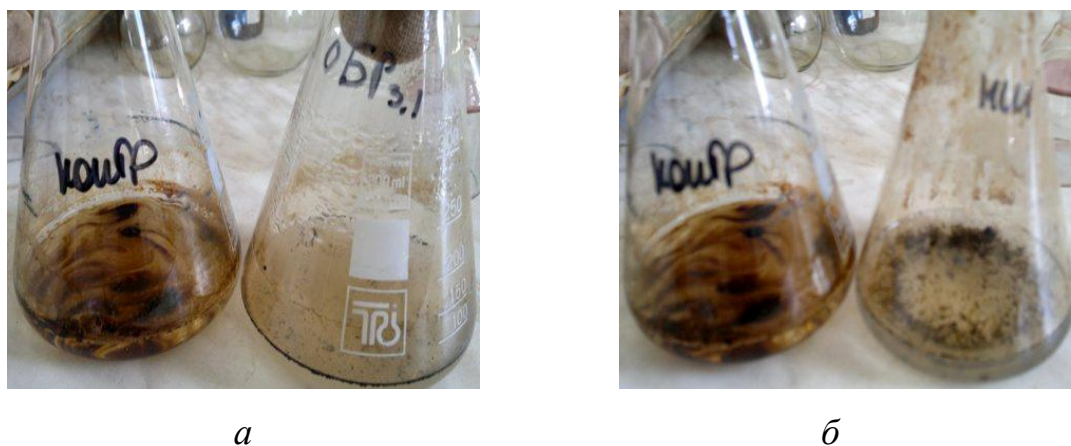


Рисунок 11 – Визуальная оценка характера роста бактерий в жидкой среде с нефтью в качестве единственного источника углерода и энергии по сравнению с контролем (колба слева): а – *B. firmus* ОБР 3.1; б – *B. circulans* НШ

Если сравнивать деструктивную активность бактерий, выделенных нами из БШ с активностью других культур-нефтедеструкторов, то можно отметить следующее. В модельном эксперименте О.Н. Логинова с соавт. (2004) показано, что биопрепарат «Бациспецин» на основе штамма *Bacillus* sp. 739 способен утилизировать нефть на 40-60% за 30 сут. в зависимости от степени загрязнения. В работе М.А. Ключановой (2009) установлено, что штамм *B. firmus* SDS-1, выделенный из нефтезагрязненной почвы, способен утилизировать нефть в

жидкой среде до 82% за 10 сут. культивирования. Е.Г. Плотникова (2010) в своих исследованиях показала, что штамм *Halomonas* sp. способен усваивать ароматические и полиароматические углеводороды, которые содержатся в составе нефти, до 55%. Бактериальные штаммы, изолированные исследователями (Plyina et al., 2003) из нефтезагрязненных почв, показавшие от 21 до 30,5% деструкции общих нефтяных углеводородов за 15 сут. культивирования, были отобраны как лучшие среди других 30-ти изолятов, на их основе создан биопрепарат «COBE-10». Среди этих штаммов были: *Bacillus* sp., *Rhodococcus* sp., *Providencia* sp., *Citrobacter* sp.

Таким образом, проявленная деструктивная активность выделенных нами микроорганизмов в отношении нефтяных углеводородов, хотя и не слишком высока, в то же время, сравнима с литературными данными.

По отношению к ДТ заметную деструктивную активность проявили два штамма *B. circulans* ОБР 3.3 и *B. circulans* НШ. Общее содержание углеводородов при культивировании данных штаммов снизилось на 35,5 и 25% соответственно. Полученные результаты согласуются с литературными данными. В экспериментах Н.Г. Астровой с соавт. (1998) показана высокая деструктивная активность штаммов *Bacillus* sp., которые в ассоциациях с *Pseudomonas* sp. и *Micrococcus* sp. способны снижать концентрацию ДТ до 0,01 мг/л и ниже. Однако все остальные исследованные нами штаммы не проявили значимую деструктивную активность по отношению к ДТ.

Известно, что в ДТ преобладают простые неразветвленные *n*-алканы (Heath et al., 1993). И хотя метаболизм *n*-алканов (C₆-C₁₂) возможен, многие из них действуют как растворители, разрушая клетки посредством частичной солубилизации мембранных фосфолипидов, оказывая, таким образом, токсическое действие на многие микроорганизмы (Cunningham, Philp, 2000). Возможно, исследованные нами бактерии также оказались подвержены токсическому действию низкомолекулярных алканов ДТ.

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 микробных штаммов не приводило к существенной деградации минерального масла. Низкий деструктивный потенциал бактерий-деструкторов по отношению к исследованному минеральному маслу (Luxe standart 15w-40) может быть связан с многокомпонентным составом данного нефтепродукта, в состав которого помимо высокомолекулярных углеводов входят различные присадки, такие как, феноляты, дитиофосфаты и алкилдитиофосфаты различных металлов (Караулов, Худолий, 2000).

Итак, проведенный эксперимент показал, что все выделенные из БШ 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. Деструктивная активность выделенных бактерий по отношению к ДТ и минеральному маслу была значительно ниже, что согласуется с литературными данными, т.к. известно, что, несмотря на меньшее содержание ароматических углеводов в своем составе, данные нефтепродукты обладают ограниченной биодоступностью для микроорганизмов-деструкторов (Zanaroli et al., 2010).

Тот факт, что не все культуры, растущие на твердой среде с минеральным маслом и ДТ, проявили заметную активность в суспензионной культуре, может быть также обусловлен известным эффектом, когда прикрепленные к поверхностям клетки проявляют большую активность, чем свободные (Ананько и др., 2005). Было показано, что клетки ряда штаммов не способны ассимилировать токсические субстраты при росте на диффузном агаре, но утилизируют субстраты в составе агаровых гранул (Федоров и др., 2000). Такие штаммы представляют интерес для применения в иммобилизованном виде.

По результатам проведенного нами эксперимента можно выделить следующие бактерии в качестве перспективных деструкторов нефтяных углеводов: *B. circulans* НШ – деградирует нефть, ДТ и минеральное масло за 10 сут. культивирования в жидкой среде – на 38, 25 и 35%; *B. firmus* ОБР 3.1 – нефть и

минеральное масло – на 38 и 39%; *Halomonas* sp. ОБР 1 – нефть – на 40%; *B. circulans* ОБР 3.3 – ДТ – на 35,5%.

Тот факт, что не все выделенные из БШ бактерии проявили высокую деструктивную активность по отношению к нефтепродуктам, может объясняться следующим. Известно, что в заводняемых нефтяных месторождениях, где единственным источником углерода является нефть, наряду с нефтеокисляющими микроорганизмами («продуцентами») можно выделить множество хемогетеротрофных аэробных и анаэробных микроорганизмов-спутников (диссипотрофов), которые не способны утилизировать компоненты нефти, но растут за счет продуктов ее деградации. Возможно, среди выделенных нами бактерий, были именно такие микроорганизмы-спутники. Авторы (Милехина и др., 1998) отмечали, что углеводородокисляющая активность была характерна только для грамположительных бактерий, выделенных из пластовых жидкостей и нефти Бондюжского и Ромашкинского нефтяных месторождений Татарстана. На основании полученных результатов исследователи предположили, что грамотрицательные бактерии имеют другое функциональное значение в нефтесодержащих экосистемах.

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, обнаруженный у выделенных бактерий, свидетельствует о перспективности использования таких микроорганизмов в технологиях микробной утилизации буровых отходов.

Поэтому следующим этапом нашей работы явилось исследование эколого-функциональных особенностей микроорганизмов, выделенных нами из БШ.

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

Современные технологии биоремедиации во многом базируются на применении бактерий-деструкторов, способных биокатализировать поллютанты. Уникальные углеводородокисляющие штаммы, технологии их культивирования и методы применения составляют основу современной микробной экобиотехнологии.

При разработке биотехнологического метода обезвреживания отходов бурения следует учитывать многокомпонентный состав БШ, наличие в их составе углеводов, ПАВ, ТМ, 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 вышеперечисленным условиям.

Описанные выше экологические особенности исследуемых БШ (глава 2) свидетельствовали о возможном наличии у выделенных микроорганизмов оригинальных эколого-функциональных характеристик, связанных с гало- и алкалотолерантностью, устойчивостью к ТМ и др.

Поэтому целью данного раздела работы явилось выяснения возможности присутствия у бактерий, выделенных нами из БШ, комплекса важных свойств, необходимых при использовании этих бактерий в качестве основы биопрепаратов для детоксикации отходов бурения.

5.1 Поверхностно-активные свойства бактерий, изолированных из буровых шламов

5.1.1 Оценка гидрофобно-гидрофильных свойств выделенных бактерий

Гидрофобно-гидрофильную природу поверхности микроорганизмов как интегрального показателя ее структуры необходимо учитывать в биологических

исследованиях при изучении адгезионных процессов с участием клеток и поверхностей различной структуры, а также роста на углеводородах, связанного с прямым потреблением субстрата (Яскович, Елькин, 1995). 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 (Яскович, 1998; Zhang, Miller, 1995).

Структура поверхности бактериальных клеток определяется экологическими особенностями их жизнедеятельности. Изменение гидрофобно-гидрофильного состава поверхности штамма указывает на изменение ее химической структуры. Г.А. Яскович и Е.П. Яковлева (1996) в своей работе, анализируя имеющиеся литературные данные, отмечают качественное и количественное непостоянство компонентов липидного состава клеточной стенки бактерий и их способность к транслокации в зависимости от внешних условий. Они приводят в пример работу R.K. Cunningham с коллегами (1986), где указывается на смещение внутреннего липополисахаридного слоя, имеющего в своей структуре большое число гидрофобных групп, в наружный мембранный слой, вследствие чего увеличивается гидрофобность мутантного микроорганизма. Анализ подобных работ позволил ученым высказать предположения, что изменения степени гидрофобности поверхности микроорганизмов происходят как вследствие смещений в поверхностный слой имеющихся гидрофобных или гидрофильных соединений (липополисахариды, фосфолипиды, интегральные белки, ионы металлов), так и изменений, обуславливающих синтез иных элементов поверхности из-за утраты или приобретения внехромосомных факторов наследственности.

Авторами (Никовская и др., 1989) показано, что характер гидратации клеток практически не зависит от фазы роста культуры и сохраняется при глубинном и поверхностном культивировании. В то же время, есть данные о том, что потребление углеводородных субстратов во многом определяет своеобразие структурной и метаболической организации микроорганизмов и сопровождается

появлением новых физиологических свойств. При культивировании на углеводородных субстратах нередко происходят изменения в составе липидных комплексов клеточной оболочки нефтеокисляющих бактерий, вследствие чего меняется гидрофобность клеточной поверхности (Коломынцева и др., 2005).

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.

Методика Е.В. Серебряковой, выбранная нами для анализа гидрофобных свойств бактериальных клеток, базируется на фотометрическом определении степени прилипания клеток к поверхности капель хлороформа после перемешивания и отстаивания бифазной системы «водная суспензия бактерий – хлороформ». В других методах, где используются такие углеводороды как *n*-гексадекан, *n*-октан и *n*-килол, углеводородная фаза после перемешивания и экспозиции поднималась вверх из-за низкой плотности, что вносило существенную погрешность в оценку показателя гидрофобности. В каждой серии опытов нами было выполнено по 3-4 независимых определений, в таблице 7 представлены средние арифметические значения.

Таблица 7 – 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	
			E ₂₄	E ₄₈	E ₂₄	E ₄₈
<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. rhapsodici</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

Согласно нашим результатам, ПГ у бактерий, относящихся к роду *Bacillus*: *B. firmus* ОБР 1.1, *B. firmus* ОБР 3.1, *B. circulans* ОБР 3.3 и *B. circulans* НШ, при культивировании их на питательной среде составлял от 23,7 до 36,8%, при выращивании их в минеральной среде с глицерином ПГ был значительно выше – 57,3-65,5%. Рисунок 12 отражает один из этапов определения показателя гидрофобности у культуры *B. firmus* ОБР 1.1, когда бактериальные клетки переходили в нижнюю углеводородную фазу. ПГ у штамма *S. silvestris* ОБР 3.2 составил 18,7 и 66,2% при культивировании на МПА и в жидкой среде с углеводородом, соответственно. Низкие значения ПГ наблюдались у культур *Halomonas* sp. ОБР 1 и *E. rhapsodicus* ОБР 4.1.

В сравнении с высокими значениями ПГ у контрольного нефтеокисляющего микроорганизма *D. maris* АМЗ, ПГ у исследуемых нами бактерий, были ниже.

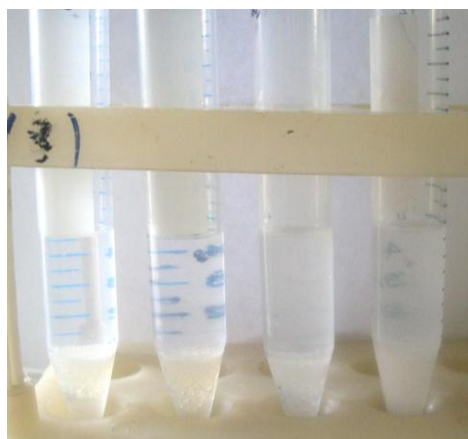


Рисунок 12 – Определение ПГ у культуры *B. firmus* ОБР 1.1 (бактериальные клетки переходят в нижнюю углеводородную фазу)

По данным авторов (Милько, Егоров, 1991), величина ПГ клеток, выращенных на питательном агаре, является постоянным конститутивным признаком, варьирующим в зависимости от диссоциативных переходов микробной культуры. Исследователи (Самков, Карасева, 2007) показали, что при культивировании *Rhodococcus erythropolis* F1 в жидкой минеральной среде с гексадеканом в качестве единственного источника углерода и энергии отмечалось увеличение ПГ клеток от 24 до 69%. Клетки другого штамма *R. erythropolis* B2 исходно, вне контакта с углеводородом, гидрофильны (около 20%), при контакте с

нефтепродуктами гидрофобность клеток повышается до 80%, что обеспечивает эффективное поглощение и ассимиляцию субстрата (Карасева и др., 2012).

В работе Т.У. Думанской с соавт. (2005) сообщалось, что штаммы *R. erythropolis* ИМВ В-7012 и *Gordonia rubripertincta* ИМВ Ас-5005, несмотря на наличие у них высоколипофильной клеточной стенки, характеризуются низкой гидрофобностью клеточной поверхности, что может быть связано, по мнению ученых, с формированием у этих штаммов поверхностных полисахаридных капсулоподобных структур. При этом отмечалось, значительное увеличение ПГ при росте данных культур на гексадекане – для родококков – с 2,4 до 58%, для гордоний – с 9,6 до 31%.

Адгезионная активность алканотрофных бактерий в отношении жидких углеводов обуславливает успешный процесс их ассимиляции, обеспечивая конкурентное преимущество данных микроорганизмов в углеводородсодержащих биотопах. М.С. Куюкина с коллегами (2007), исследуя адгезионную активность УОМ, которая определяется свойствами клеточной поверхности, прежде всего, степенью ее гидрофобности, показала, что степень адгезии бактерий *R. rubber* ИЭГМ 231 к исследуемым *n*-алканам составила 91-98%. При этом было обнаружено постепенное увеличение этого показателя с возрастанием длины углеродной цепи и степени гидрофобности углеводов в ряду C₉-C₁₆.

В наших исследованиях также показано, что у большинства культур наблюдалось значительное увеличение ПГ после культивирования их на гидрофобном источнике углерода (глицерине), например, у *S. silvestris* ОБР 3.2 – от 18,7 до 66,2%, что связано, по всей видимости, с вариациями в составе клеточных стенок бактерий. Известно, что при использовании глицерина в качестве субстрата для культивирования микроорганизмов, возможно получение широкого спектра продуктов, в том числе, ПАВ, которые могут быть использованы для решения экологических проблем, например, для очистки окружающей среды от нефти и нефтепродуктов (Конон и др., 2011). Л.Ю. Кузьмина и Г.Э. Актуганов (2009) обнаружили, что для исследуемых штаммов *Bacillus* можно расположить источники углерода по их предпочтительности для

продукции биосурфактантов следующим образом: *B. subtilis* ИБ 17: глицерин > глюкоза > сахароза > крахмал; *Bacillus* sp. ИБ-а-2: крахмал > глицерин > сахароза > глюкоза.

В связи с этим, обнаруженные нами изменения у исследуемых микроорганизмов при смене источника углерода в среде культивирования могут свидетельствовать о возможном направленном синтезе биоПАВ.

5.1.2 Оценка эмульгирующей активности у микроорганизмов

Важным свойством нефтеокисляющих бактерий является синтез ими биосурфактантов (биоПАВ), облегчающих поглощение углеводородов клетками бактерий за счет диспергирования нефтепродуктов и увеличения биодоступности углеводородов (Коронелли, Нестерова, 1990; Christofi, Ivshina, 2002). Сегодня биоПАВ конкурируют с синтетическими ПАВ, т.к. обладают неоспоримыми преимуществами: высокой селективностью и активностью в различных диапазонах температур, pH, солености, а также эти ПАВ – биологического происхождения (Mukherjee et al., 2006).

Наличие биоПАВ нередко определяют в жидких культурах бактерий, их супернатантах и в клеточных суспензиях, смытых с агара, по снижению уровня поверхностного натяжения, проявлению эмульгирующей активности, а также по ПГ клеток бактерий (Волченко, Карасева, 2006). Известен способ отбора бактерий-продуцентов экстрацеллюлярных биосурфактантов на кровяном агаре по наличию зоны просветления вокруг колоний, свидетельствующей о гемолизе эритроцитов (Plaza et al., 2006).

В ходе проведенных нами исследований было показано, что все бактерии проявили высокую эмульгирующую активность по отношению к нефти (рисунок 13), образовавшиеся нефтяные эмульсии обладали достаточной стабильностью. Эндогенная эмульгирующая активность через 24 часа составила у разных культур 55-97%, максимальная активность обнаруживалась у штамма *B. firmus* ОБР 3.1 (таблица 7). Через 48 часов активность также была высокой – 56-90%.

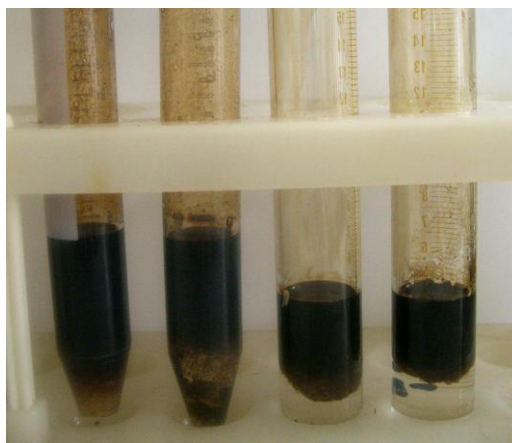


Рисунок 13 – Нефтяные эмульсии, образованные бактериями *B. firmus* ОБР 3.1 и *Halomonas* sp. ОБР 1, в сравнении с контрольным штаммом *D. maris* АМЗ (справа)

Экзогенная активность через 24 часа составляла 48-87%, через 48 часов – 40-85%. Следует отметить, что 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* АМЗ, полученный из коллекции непатогенных микроорганизмов ИБФРМ РАН (г. Саратов). Можно отметить, что эмульгирующая активность *D. maris* АМЗ была значительно ниже показателей эмульгирующей активности микроорганизмов, выделенных из БШ (рисунок 13).

Следует также подчеркнуть, что у всех изученных культур, выделенных из БШ, поверхностно-активные свойства (эмульгирующая активность) были связаны как с биомассой бактерий, так и с супернатантом культуральной жидкости. Уровень эмульгирующей активности супернатанта *Halomonas* sp. ОБР 1, *B. circulans* ОБР 3.3 и *B. circulans* НШ был близок уровню эмульгирующей активности жидкой культуры, позволяя предположить, что данное свойство этих бактерий обеспечивается и внеклеточными биоПАВ. Известно, что локализация биоПАВ указывает на физиологию взаимодействия бактерий с углеводородами и помогает выбрать направление биотехнологического производства культур-продуцентов сурфактантов (Волченко, 2006).

По данным Н.Н. Волченко (2006), в случае продукции бактериями экстрацеллюлярных биоПАВ, величины поверхностного натяжения и эмульгирующей активности культур или их супернатантов можно в определенной мере считать показателем концентрации сурфактантов в жидкой среде. В случае синтеза бактериями клеточно-связанных биоПАВ, прямая химическая аналогия невозможна, т.к. эти показатели опосредованы поверхностно-активными свойствами биомассы клеток. ПГ клеток в таком случае является важным параметром, отражающим сурфактантные свойства бактерий-продуцентов клеточно-связанных биоПАВ. Чем большей естественной гидрофобностью обладают бактерии, обусловленной наличием в клеточной поверхности липидных компонентов, тем более вероятно, что культура способна к эмульгированию и усвоению углеводов.

По отношению к ДТ 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 (рисунок 14). Описанные исследователями (Jaysree et al., 2001) биоПАВ, которые продуцировали бактерии *B. subtilis*, обладали эмульгирующей активностью (E_{24}) по отношению к ДТ и моторному маслу в размере 20 и 15%, бактерии *B. cereus* – 30 и 20% соответственно.

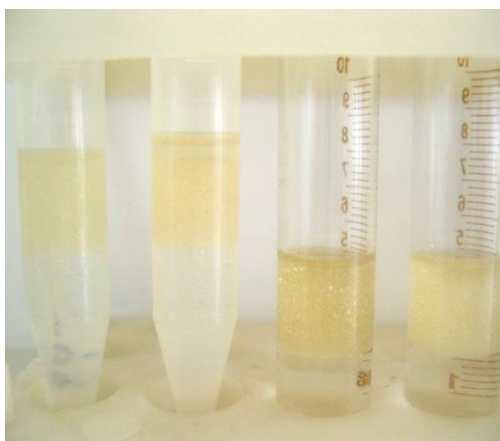


Рисунок 14 – Определение эмульгирующей активности *B. circulans* ОБР 3.3 по отношению к ДТ

Если обратиться к литературным данным, то нередко можно встретить сообщения о выделении биосурфактантов из бактерий рода *Bacillus*. Так, исследователи (Haghighat et al., 2008) выделили липопептиды, продуцируемые микроорганизмами *B. licheniformis* и *B. subtilis*. Данные бактерии были изолированы из почвы, загрязненной сырой нефтью, на нефтеперерабатывающем предприятии в Тегеране. Эмульгирующая активность по отношению к сырой нефти у описываемых бактерий составила порядка 90%. Еще одни авторы (Bayoumi et al., 2011) сообщали об исследовании бактерий, выделенных из загрязненных углеводородами почв в Саудовской Аравии. Было показано, что один из штаммов – *B. subtilis* KG82-KSA активно продуцировал биосурфактант, который может быть использован для очистки водной и почвенной среды от нефтяных загрязнений. А. Tabatabaee с коллегами (2005) описал микробный штамм *Bacillus* sp. № 4, выделенный из нефтяных скважин, который продуцировал биоПАВ (гликолипид) в широком диапазоне pH и температуры, а также был устойчив к повышенной концентрации соли. Авторы (Ghayoumi et al., 2012) сообщали, что из 160 бактерий, выделенных ими из нефтезагрязненных почв Ирана, были отобраны 2 штамма *Bacillus* sp. как наиболее активные продуценты биоПАВ. Данные бактерии снижали поверхностное натяжение на 30 мН/м по сравнению с контролем, эмульгирующая активность (E_{24}) по отношению к нефти составляла около 80%, они отличались высокой способностью к пенообразованию.

Таким образом, полученные нами результаты в соответствии с литературными данными свидетельствуют о возможных преимуществах микроорганизмов, выделенных из БШ, 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 БШ.

Дальнейшее исследование эколого-функциональных свойств у штамма *E. rhapontici* ОБР 4.1 не проводили, учитывая известные данные о наличии свойства

фитопатогенности у данного вида (Булахова, 2006), что может ограничивать его применение в технологиях детоксикации БШ.

5.2 Эколого-функциональные свойства выделенных бактерий

5.2.1 Исследование устойчивости бактерий к тяжелым металлам

Токсичность БШ обусловлена не только присутствием компонентов, входящих в состав буровых растворов (Бранулоу, 1984; Рыбина, 2004). Как показывают исследования А.П. Хаустовой и М.М. Рединой (2006), одними из главных токсикантов в шламах являются ТМ, которые поступают в них вместе с выбуренной породой. ТМ могут также усиливать токсическое действие других ксенобиотиков, в том числе, нефтяных углеводородов (Шепило, 2002). Кроме того, обладая ингибирующим действием на окислительные ферменты (Van, Clijsters, 1990), ТМ могут препятствовать деградации углеводородов.

Поэтому одним из определяющих условий использования микробиологического способа для детоксикации БШ является резистентность микроорганизмов-деструкторов к высоким концентрациям ТМ в окружающей среде. В настоящее время известно, что бактерии проявляют устойчивость практически ко всем ТМ (Silver, Phung, 1996; Nies, 1999). Исследования показали, что системы устойчивости к ТМ возникли задолго до явления техногенного загрязнения. В ходе эволюции микроорганизмы адаптировались к повышенному содержанию ионов металлов в окружающей среде (в местах залежей руд, в гидротермальных источниках и местах обитания вблизи действующих вулканов) (Янева, 2009).

Известны протекторные механизмы, которые способствуют поддержанию жизнеспособности бактерий при высоких концентрациях ионов металлов в среде обитания (Beveridge et al., 1997). Микроорганизмы способны за счет поглощения и связывания ТМ снижать их подвижность и токсичность. Некоторые микроорганизмы могут аккумулировать металлы в количествах, в десятки и сотни раз превышающих их содержание в питательной среде. Кроме того,

микроорганизмы могут участвовать в процессах перехода минеральных форм металлов в органические (алкилирование), а ионные формы превращать в соединения с нулевым зарядом. Одной из стратегий приспособления к действию ТМ является накопление полигидроксibuтирата (Камнев и др., 2007).

Известны углеводородоокисляющие микроорганизмы, устойчивые к ряду ТМ. Например, нефтеокисляющая культура, входящая в состав биопрепарата «Лессорб», *Mycobacterium flavescens* EX-91 имеет устойчивость к: Mn (II), Zn (II), Mo (II), Pb (II) (100 мг/л), Cr (IV), Cr (VII), Fe (II) (10 мг/л), Ni (II) (5 мг/л), Ag (II) (1 мг/л), Hg (II) (0,05 мг/л), Cu (II) (0,1 мг/л), а *Mycobacterium* sp. ИЖ4: Ni (II), Fe (II) (10 мг/л), Pb (II), Zn (II), Mo (II), Mn (II), Cu (II), Cr (IV), Cr (VII) - (1 мг/л) (Патент № 2193533, 1999). Нефтеокисляющий штамм бактерий *Pseudomonas alcaligenes* MEV устойчив к ионам ТМ: Zn (II), Mo (II), Pb (II), Cr (IV); *Pseudomonas stutzeri* MEV-S1 устойчив к ионам ТМ: Zn (II), Mo (II), Pb (II), Fe (II), Hg (II), что предполагает использование данных бактерий при комбинированном загрязнении углеводородами нефти и металлами (Патент № 2228953).

Проведенный нами анализ содержания ТМ в составе образцов исследуемых шламов (таблица 8) показал, что концентрация ТМ в образце БШ 2 значительно выше, чем в БШ 1. Такие различия обусловлены, прежде всего, составом выбуренной породы, входящей в шламы. Тонкодисперсные доломиты более обогащены ТМ, чем песчаники (Бранулоу, 1984). Подвижные формы ТМ способны мигрировать с буровыми сточными водами, вследствие нарушений гидроизоляции амбаров. В этом случае ТМ попадают в почвы, поэтому содержание ТМ оценивали, сравнивая их концентрацию с ПДК в почве (Предельно допустимые..., 2006). Содержание кадмия и свинца в обоих образцах БШ было значительно ниже, чем соответствующие ПДК в почве. В БШ 1 содержание Zn^{2+} и Ni^{2+} было значительно ниже, чем ПДК по этим металлам в почве, однако было отмечено высокое содержание Cu^{2+} , концентрация которого была в 12,6 раза выше ПДК. В БШ 2 содержание Zn^{2+} было в 1,4; Cu^{2+} – в 6,4; Ni^{2+} – в 7,6 раза выше, чем ПДК этих ТМ в почве.

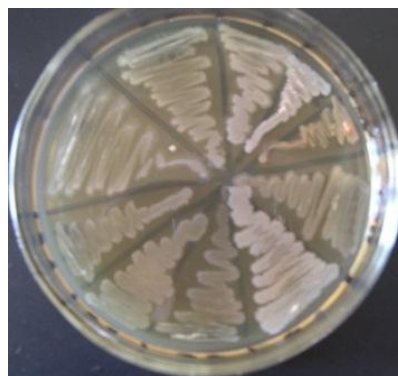
Таблица 8 – Результаты определения тяжелых металлов в буровых шлаках

Образцы	Содержание ионов тяжелых металлов в буровых шлаках, мг/кг				
	Cd^{2+} ПДК=0,5	Pb^{2+} ПДК=32	Zn^{2+} ПДК=23	Cu^{2+} ПДК=3	Ni^{2+} ПДК=4
БШ 1	0,13	3,6	11,8	37,8	3,2
БШ 2	0,14	10,7	31,8	19,3	30,6

Примечание: концентрации металлов сравниваются с ПДК соответствующих металлов в почве.

Л.Э. Гасымлы с соавт. (2005), описывая физико-химические свойства БШ, образующегося при бурении нефтяных скважин на море на месторождении Чираг, отмечал, что содержание ТМ в шламе было следующим, мг/кг: Cd^{2+} – 0,0005, Pb^{2+} – 4,89, Cu^{2+} – 24,60, Ni^{2+} – 18,98. Эти данные, за исключением концентрации Cd^{2+} , соответствовали значениям в исследованных нами образцах. Таким образом, исследованные нами образцы БШ содержали ТМ в пределах ПДК и выше, поэтому были проведены эксперименты по определению устойчивости выделенных микроорганизмов к ряду ТМ.

Устойчивость бактерий к действию ТМ определяли визуально по росту культур на МПА с добавлением диапазона концентраций следующих солей ТМ: CuCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, CdCl_2 , ZnSO_4 , NiSO_4 и FeSO_4 . В настоящем эксперименте мы исследовали на устойчивость к ТМ шесть изолированных из БШ микроорганизмов (глава 4) и микробный штамм *D. maris* AM3. Обнаружено, что все исследованные микроорганизмы хорошо росли на среде с Ni^{2+} (8-38 мг/л) (рисунок 15), Fe^{2+} (7-37 мг/л) и Pb^{2+} (25-375 мг/л), что свидетельствует о наличии перекрестной устойчивости изученных бактерий к данным ТМ.

Рисунок 15 – Рост бактерий на МПА с Ni^{2+} (38 мг/мл).

Для оценки уровня индивидуальной металлоустойчивости бактериальных штаммов была рассчитана МИК соли каждого металла. МИК – это показатель действия вещества на бактериальную культуру, равный его минимальной концентрации, при которой происходит полное угнетение роста бактерий (Теппер др., 2004). Результаты эксперимента представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Уровень металлоустойчивости бактерий

Штаммы	МИК ионов металлов, мг/л					
	Cu ²⁺	Pb ²⁺	Cd ²⁺	Zn ²⁺	Ni ²⁺	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

Высокая концентрация Zn²⁺ в среде (178 мг/л) ингибировала рост бактерий: *Halomonas* sp. ОБР 1 и *B. circulans* НШ (рисунок 16), при этом низкие и средние концентрации Zn²⁺ не угнетали рост этих микроорганизмов.

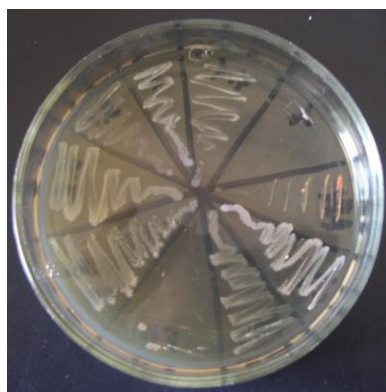


Рисунок 16 – Ингибирование роста штамма *Halomonas* sp. ОБР 1 (вверху справа) и *B. circulans* НШ (внизу) при внесении в МПА Zn²⁺ (178 мг/мл).

Остальные бактерии хорошо росли при всех концентрациях Zn²⁺ в среде. Бактериальный штамм *S. silvestris* ОБР 3.2 отличался от других изученных микроорганизмов отчетливым ростом на среде с повышенным содержанием Cu²⁺ (142 и 189 мг/л) и Cd²⁺ (43 и 61 мг/л). Рост всех остальных бактерий при

содержании в среде Cu^{2+} в количестве 94 и 142 мг/л ингибировался. Низкие концентрации Cd^{2+} в среде (12 и 24 мг/л) не влияли на рост всех изученных бактерий, а более высокие (43 и 61 мг/л) подавляли их рост, за исключением *S. silvestris* ОБР 3.2, *B. circulans* 3.1 (рисунок 17) и *B. circulans* НШ, которые были устойчивы к действию данного металла в различных дозах.

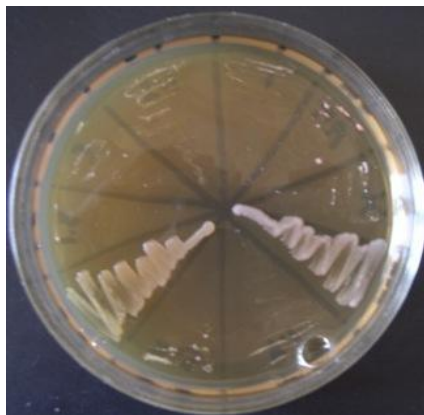


Рисунок 17 – Рост штамма *B. firmus* ОБР 3.1 (слева) и *S. silvestris* ОБР 3.2 (справа) на МПА с Cd^{2+} (61 мг/мл)

Таким образом, проведенные исследования показали, что все выделенные нами микроорганизмы обладают устойчивостью по отношению ко всем исследованным ТМ, наиболее распространенным в БШ. Тот факт, что штамм *D. maris* АМЗ также оказался устойчивым к исследованным ТМ, связан с источником его выделения. Так, *D. maris* АМЗ был выделен Плешаковой Е.В. из НШ (ОАО «Саратовский нефтеперерабатывающий завод») (Плешакова и др., 2010). В таких местообитаниях, как правило, содержатся ТМ (Аренс с соавт., 1999), что предполагает наличие устойчивости к ТМ у обитающих там микроорганизмов.

Обнаруженная у исследованных бактерий полирезистентность к ТМ, несомненно, 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. Кроме того, авторы сообщали, что микроорганизмы *Pseudomonas putida* ПИ Ко-1 и *P. fluorescens*, будучи активными деструкторами

углеводородных загрязнений при повышенном содержании ТМ, способствуют активации деструктивной активности других входящих в состав биопрепарата микроорганизмов (Патент № 2191643), что не исключено и в случае выделенных нами из БШ бактерий.

5.2.2 Рост бактерий в диапазоне рН и концентраций NaCl

Основной задачей данного раздела работы явилось изучение биологических свойств выделенных из БШ бактерий, позволяющих адаптироваться им к условиям среды обитания. При этом проводилось определение величин солености среды и рН.

Рост бактерий в жидкой питательной среде в интервале рН

В связи с тем, что исследуемые бактерии были выделены из среды с высоким значением рН, был проведен эксперимент по выявлению отношения этих микроорганизмов к щелочной питательной среде в интервале рН от 7 до 11.

Для поддержания рН среду готовили с использованием TRIS буфера (рН 8-9) и карбонатного буфера (рН 10-11) (Справочник биохимика..., 1991). Результаты этого эксперимента представлены в таблице 10. Как свидетельствуют полученные результаты, у всех исследованных бактерий обнаружен заметный рост при рН 8. Микробный штамм *B. circulans* НШ хорошо рос при рН 9 и 10, при рН 11 рост штамма был слабым и проявлялся в образовании небольшого осадка на дне пробирки. Штамм *B. firmus* ОБР 1.1 отличался значительным ростом при рН 9, при рН 10 и 11 рост штамма был слабым.

Другие бактерии не обнаруживали способность к росту при значениях рН выше 8. Таким образом, микроорганизмы *B. firmus* ОБР 1.1 и *B. circulans* НШ устойчивы к повышенной щелочности среды. Вместе с тем необходимо отметить, что данные микроорганизмы показали интенсивный рост в МПБ при рН 7, что свидетельствует о том, что они не являются строгими алкалофилами.

Таблица 10 – Оценка роста бактерий в МПБ при различных значениях pH и содержании NaCl

Микроорганизмы	Рост бактерий									
	pH					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.

Выявленные особенности роста данных микроорганизмов могут свидетельствовать об их приспособленности к щелочным условиям. Способность к росту при высоких значениях pH обеспечивает микроорганизмам определенные преимущества, т.к. в таких условиях мала конкуренция со стороны большинства других организмов. Как известно (Кашнер, 1981; Бухарин, 2005), устойчивость бактерий к высоким значениям pH связана с устойчивостью белоксинтезирующей системы. Повышение щелочности среды стимулирует образование бактериями дезаминаз аминокислот, что приводит к снижению pH. Белки алкалофилов обладают большой алкалостабильностью, а также имеют оптимум активности при щелочных значениях pH. Для осуществления процессов жизнедеятельности бактерии необходимо поддержание стабильного pH внутри клетки, несмотря на изменения pH в окружающей среде (Громов, Павленко, 1989). Ведущая роль в поддержании pH-гомеостаза принадлежит транспортным процессам, происходящих в клетках алкалофилов. Транспорт веществ в клетке основан на градиенте Na^+ , однако синтез АТФ происходит за счет функционирования протонной помпы (Бухарин, 2005).

Как показали последующие эксперименты, все исследованные нами алкалотолерантные микроорганизмы давали прирост биомассы (по сравнению с контролем) при культивировании их в течение 7 сут. в жидкой питательной среде

при значениях pH 7-8 (рисунок 18а). Среди исследованных бактерий по результатам предыдущего анализа выделялись 2 штамма: *B. firmus* ОБР 1.1 и *B. circulans* НШ, максимально устойчивые к повышенной щелочности среды. Из данных, представленных на рисунке 18б, видно, что при pH 7 наблюдался значительный прирост биомассы у обоих штаммов: *B. firmus* ОБР 1.1 в 2,3 и *B. circulans* НШ в 2,5 раза. При значениях pH среды от 8 до 10 прироста биомассы у *B. circulans* НШ не обнаруживалось, однако концентрация бактериальных клеток сохранялась на повышенном уровне, только при pH 11 наблюдался лизис клеток, у *B. firmus* ОБР 1.1 продолжался рост при pH 8, дальнейшее повышение pH негативно отражалось на жизнеспособности бактерии.

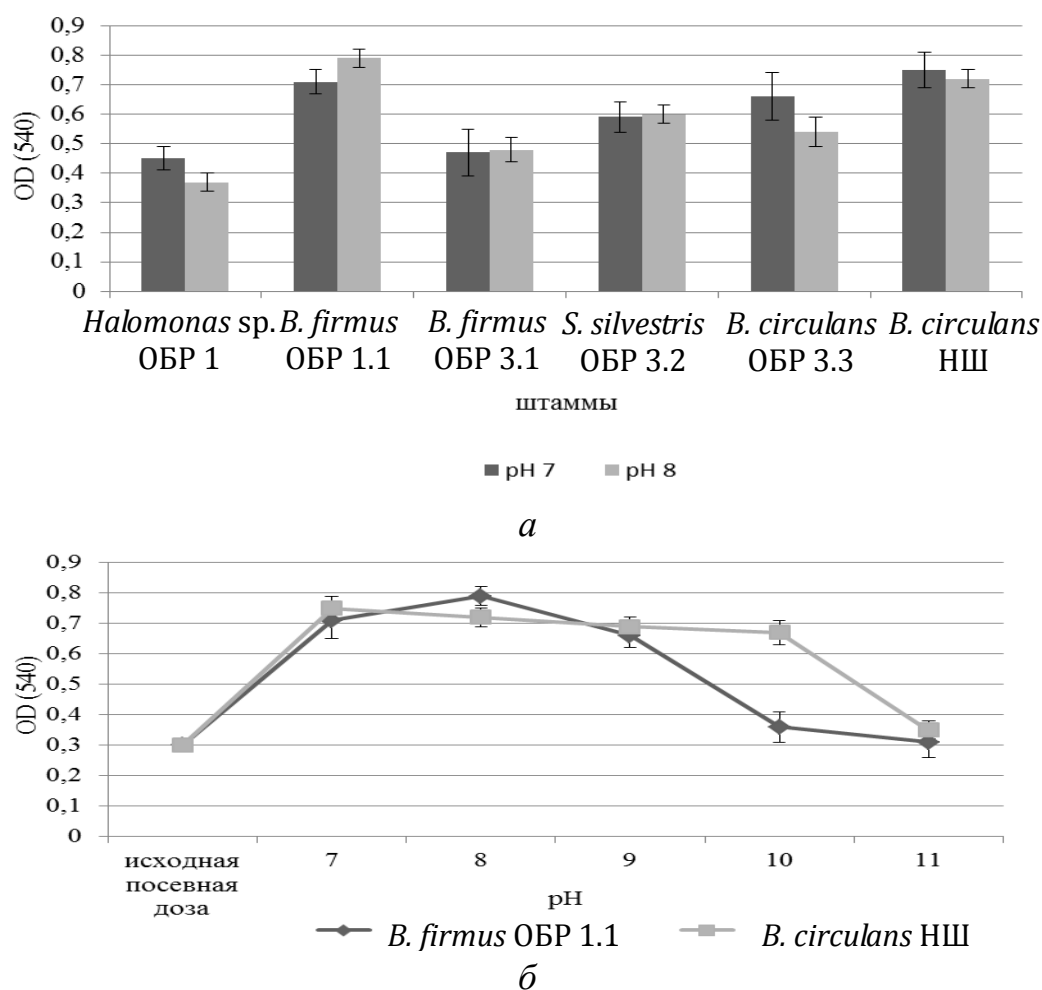


Рисунок 18 – Показатели роста микроорганизмов через 7 сут. культивирования в МПБ при исходной посевной дозе (OD₅₄₀=0,3 ед.): а – 6-ти исследованных штаммов (pH 7-8); б – 2-х максимально устойчивых к повышенной щелочности среды (pH 9-11)

Не так много известно о деградации углеводов алкалотолерантными микроорганизмами при значениях pH выше 9 (Margesin, Schinner, 2001). Авторами продемонстрирована биodeградация фенола в щелочных условиях микроорганизмами *Arthrobacter* sp., *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Micrococcus agilis* и *Pseudomonas putida* (Kanekar et al., 1999). Сообщалось о выделении уникального алкало- и галофильного микроорганизма *Nocardioides* sp., изолированного из загрязненного участка, расположенного рядом с щелочным (pH 9,5-10) и сильно засоленным (10% солености) озером (штат Орегон). Штамм обнаруживал широкий спектр деградации хлорфенолов (Maltseva, Oriel, 1997).

Исследование галотолерантности микроорганизмов, выделенных из буровых иламов

При изучении галотолерантности выделенных бактерий микроорганизмы выращивали в МПБ с различным содержанием NaCl: 3,5; 6,5; 10; 12 и 15%. Все исследованные бактерии хорошо росли в МПБ с 3,5 и 6,5%-ным содержанием NaCl (таблица 10). При 10%-ной концентрации NaCl наблюдался заметный рост у 4 микробных штаммов, не рос при этой концентрации соли *B. firmus* ОБР 3.1. Концентрация соли 12 и 15% была критична для роста штаммов *B. firmus* ОБР 3.1 и *B. circulans* ОБР 3.3. Все остальные бактерии росли с различной интенсивностью. Среди изученных микроорганизмов выделялись *S. silvestris* ОБР 3.2 и *B. circulans* НШ, которые характеризовались очень интенсивным ростом в питательной среде с 12 и 15%-ной концентрацией NaCl.

По результатам данного эксперимента можно сделать заключение, что все исследованные микроорганизмы являются галотолерантными, способными расти как при низких, так и при высоких концентрациях соли.

Исследования, проведенные авторами в течение 10 лет на нефтяных месторождениях (Борзенков и др., 2006), показали, что в нефти и пластовых водах разной минерализации (3-273 г/л) преобладали галотолерантные микроорганизмы. Полученные результаты показали, что грамположительные микроорганизмы

вместе с нефтью мигрируют по пластам от призабойных зон нагнетательных скважин к добывающим и обнаруживаются в извлекаемых пластовых жидкостях. По мнению исследователей, нефть является агентом, способствующим сохранению жизнеспособности и концентрированию клеток. Устойчивость микроорганизмов к высокой солености пластовых рассолов также способствует их выживанию. Выделенные из пластовых жидкостей и нефти скважины №367 Бондюжского месторождения (минерализация скважины 272 г/л) бактерии обладали высокой солеустойчивостью: рост штаммов *Micrococcus* (367-3 и БН) наблюдался при содержании NaCl в среде до 15%, *Arthrobacter* sp. 367-4 – до 13%, *R. maris* – до 12% (Милехина и др., 1998).

Вышеизложенное объясняет тот факт, что выделенные нами бактерии в большей степени проявляли галотолерантность (4 штамма из 6-ти), чем алкалотолерантность (2 штамма из 6-ти).

Молекулярные механизмы осмоадаптации основаны на аккумуляции хлорид-ионов и катионов калия, которые, в свою очередь, индуцируют биосинтез осмолитиков. Известно, что представители почвенных ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* способны адаптироваться к высокому содержанию солей в среде. Так, у наиболее толерантного штамма *A. halopraeferens*, проявляющего устойчивость к присутствию 3% NaCl, основной стратегией осмоадаптации является внутриклеточное накопление органических растворенных веществ, таких как бетаин и пролин (Bashan et al., 2004). В дополнение к этому осмопротекторному механизму для азоспирилл характерно увеличение клеточного роста и активности нитрогеназы (Choi, Gal, 1998). У нефтеокисляющего галотолерантного штамма *Dietzia* sp., выделенного из пластовых вод Ромашкинского нефтяного месторождения (республика Татарстан), идентифицировано осмопротекторное соединение – глицинбетаин (Журина, 2009). Можно предположить наличие подобных механизмов осмоадаптации у бактерий, выделенных нами из БШ.

Итак, по результатам изучения параметров роста выделенных из БШ бактерий, выделяются следующие культуры: *B. firmus* ОБР 1.1 (рост при pH 7-9), *B. circulans*

НШ (рост при pH 7-10; содержании NaCl до 15%), *S. silvestris* ОБР 3.2 (рост при содержании NaCl до 15%).

Известен диапазон органических загрязнителей, которые могут быть минерализованы или трансформированы микроорганизмами, способными расти в присутствии соли (Margesin, Schinner, 2001). Эубактерии, по мнению авторов, являются более перспективными деструкторами, чем археи, т.к. они имеют большие метаболические возможности. Концентрация соли внутри клеток у них низкая, и ферменты, участвующие в биodeградации, могут быть классическими (т.е. не требующими высокой минерализации среды). Имеются сообщения о микроорганизмах, способных окислять углеводороды нефти даже в присутствии 30% NaCl. Среди них такие нефтеокисляющие микроорганизмы как *Streptomyces alboxialis* (Kuznetsov et al., 1992), так и деструкторы *n*-алканов (C₁₀-C₃₀) – представители *Halobacterium* (Kulichevskaya и др., 1992).

Использование микроорганизмов, способных разлагать органические загрязнители в присутствии соли, может заменить дорогостоящие технологии, направленные на снижение солености или удаление соли путем обратного осмоса, ионного обмена или электродиализа перед практическим применением биологической очистки.

В целом, выявленный широкий диапазон роста изученных нами микроорганизмов может свидетельствовать об их адаптации к условиям повышенной щелочности и солености. Способность к росту при высоких значениях pH и высокой степени минерализации свидетельствует о перспективности данных микроорганизмов в детоксикации БШ.

5.2.3 Оценка экологической безопасности и конкурентной способности бактерий

В соответствии с Федеральным законом «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (2005) микроорганизмы, обладающие патогенностью, токсичностью или полирезистентностью к антибиотикам не могут быть включены

в состав биоремедиационных препаратов, т.к. несут угрозу здоровью человека и животных. Учитывая возможность использования выделенных бактерий для детоксикации буровых отходов, нами были проведены исследования по определению их безопасности для животных и человека.

Была изучена гемолитическая и лецитиназная активность бактерий, которая может свидетельствовать о наличии факторов патогенности у микроорганизмов. В первом случае на кровяном агаре отмечали наличие или отсутствие зон гемолиза вокруг колоний микроорганизмов (зона просветления агара вокруг колоний). Во втором – на желточно-солевом агаре отмечали наличие или отсутствие вокруг посева культур зоны просветления или помутнения среды (расщепление или преципитация лецитина).

Проведенные эксперименты показали, что все исследованные нами бактериальные штаммы: *B. circulans* НШ; *B. firmus* ОБР 1.1; *B. firmus* ОБР 3.1; *S. silvestris* ОБР 3.2, *B. circulans* ОБР 3.3 и *Halomonas* sp. ОБР 1 не обладали лецитиназной и гемолитической активностью, что косвенно свидетельствует об их непатогенности (Лабинская и др., 2005).

Моделирование экспериментальных инфекций у чувствительных животных – важный инструмент изучения патогенеза заболевания и характера взаимодействий внутри системы микроорганизм-макроорганизм (Инешина, Гомбоева, 2006). Наблюдая за клиническим состоянием подопытных беспородных белых крыс в эксперименте по выявлению вирулентности исследуемых бактерий, мы установили, что все протестированные шесть штаммов не оказывали летального действия на животных. Зараженные животные ничем не отличались по поведенческим реакциям от контрольной группы, никаких проявлений интоксикации или развития инфекционного процесса не наблюдалось.

В рамках проводимых исследований была изучена чувствительность 6-ти микробных штаммов к антибиотикам разных групп, наиболее часто и широко используемых в медицинской практике (таблица 11). В ходе исследований обнаружено, что бактерии обладают различным уровнем чувствительности к

антибиотикам, использованным в данном эксперименте. Так, все бактерии, за исключением *S. silvestris* ОБР 3.2, при росте на полноценной питательной среде проявили высокую и среднюю степень чувствительности к препарату пенициллинового ряда: ампициллину.

Таблица 11 – Оценка чувствительности бактерий к различным антибиотикам

Антибиотики	Степень чувствительности бактерий					
	<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
<u>Аминогликозиды</u>						
1. Мономицин	СЧ	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ
2. Стрептомицин	СЧ	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ	СЧ
<u>Пенициллины</u>						
1. Пенициллин	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ
2. Доксициклин	МЧ	НЧ	МЧ	НЧ	МЧ	МЧ
3. Ампициллин	ВЧ	СЧ	СЧ	НЧ	ВЧ	ВЧ
4. Бензилпенициллин	МЧ	НЧ	МЧ	НЧ	СЧ	НЧ
<u>Макролиды</u>						
1. Эритромицин	ВЧ	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ
2. Олеандомицин	МЧ	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ
Тетрациклин	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ	СЧ	НЧ
Левомецетин	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ
Полимиксин	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ	МЧ
Фузидин	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ	НЧ

Примечания: НЧ – не чувствителен (зона угнетения роста до 10 мм); МЧ – малочувствителен (до 15 мм); СЧ – среднечувствителен (до 20 мм); ВЧ – высокочувствителен (до 25 мм).

Бактерии *B. circulans* НШ и *Halomonas* sp. ОБР 1 отличались средним уровнем чувствительности к стрептомицину, а *Halomonas* sp. ОБР 1 еще и высоким уровнем чувствительности к другому антибиотику из группы аминогликозидов – мономицину. В целом, бактерия *Halomonas* sp. ОБР 1 характеризовалась максимальной чувствительностью к антибиотикам (рисунок 19), она также проявила высокую чувствительность к эритромицину, относящемуся к группе макролидов. Штамм *B. circulans* ОБР 3.3 обладал средней чувствительностью к бензилпенициллину и тетрациклину. И наиболее

устойчивым к протестированным антибиотикам оказался микроорганизм *S. silvestris* ОБР 3.2.

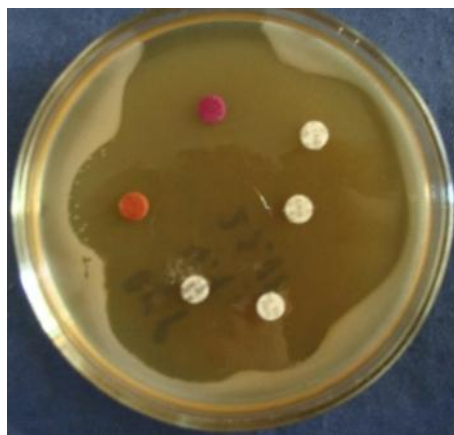


Рисунок 19 – Оценка степени чувствительности *Halomonas* sp. ОБР 1 к антибиотикам

Многие исследователи отмечают, что металлоустойчивые бактерии, выделенные из природных сред, характеризуются резистентностью к действию широкого спектра антибиотиков (Roane, Pepper, 2000; Безвербная и др., 2005). Нами также была обнаружена полиметаллическая резистентность у бактерий, выделенных из БШ. Особенно при этом выделялся *S. silvestris* ОБР 3.2, который был устойчив к действию высоких концентраций Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} и Fe^{2+} . К тому же, этот микроорганизм, как показали эксперименты, способен расти при 15%-ной концентрации NaCl.

Известно также, что гены, определяющие механизмы устойчивости к ТМ, находятся иногда в хромосоме, но чаще всего – в плазмидах и нередко соединены с генами устойчивости к антибиотикам (Roane, Pepper, 2000). Возможно, молекулярные механизмы, обеспечивающие осмоадаптацию и устойчивость к ТМ, связаны (сопряжены) с механизмами устойчивости к антибиотическим веществам. Общепризнанные наследуемые механизмы резистентности к антибиотикам включают: снижение проницаемости внешней оболочки бактерий для антибиотиков, наличие белков с высоким аффинитетом, что запускает процессы, приводящие к антимикробному эффекту, ферментативной инактивации (плазмидной или хромосомной) препаратов и др. (Беляков и др., 1990). Известно

о физиологических ненаследуемых формах устойчивости к антимикробным препаратам. Среди них: особенности роста бактерий, осмотическое давление среды в месте колонизации, связывание антибиотиков с посторонними материалами, влияющими на активность препаратов, pH среды, ее состав и парадоксальный эффект высоких концентраций. Известно также о способности родококков при росте на углеводородных субстратах повышать резистентность к широкому спектру антибиотических веществ (Куюкина и др., 2000). Авторы связывают это с увеличением содержания суммарных клеточных липидов и насыщенных прямоцепочечных жирных кислот, снижающих проницаемость клеточной оболочки бактерий для молекул антибиотиков.

Вероятно, те эколого-физиологические особенности, обнаруженные нами у исследованных бактерий: высокий уровень резистентности к ТМ, антибиотикам, повышенным концентрациям соли, коррелирующие с потреблением углеводов, связаны с определенными изменениями в липидной структуре клеточных оболочек, имеющими адаптационное значение.

Устойчивость к антибиотикам косвенно свидетельствует об устойчивости бактерий к микромицетам (продуцентам антибиотиков). Известно, что при нефтяном загрязнении значительно ухудшается санитарно-фитопатологическое состояние почвы из-за увеличения содержания микроскопических грибов, в том числе, фитопатогенов (Мязин, 2014). Поэтому резистентность выделенных нами бактерий к микромицетам, является важным свойством, необходимым при использовании этих бактерий в биоремедиационных технологиях.

В целом, в настоящих исследованиях не выявлена опасность выделенных нами из БШ бактерий, что является предпосылкой возможного их применения для детоксикации буровых отходов.

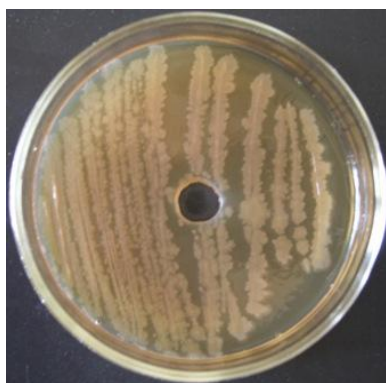
БШ состоит из целого ряда токсичных соединений, которые нуждаются в детоксикации (Булатов и др., 1997). Решением этой проблемы является создание специально адаптированных микробных сообществ, которые имеют преимущества перед монокультурами, заключающиеся, главным образом, в более эффективной и более глубокой утилизации различных субстратов (Печуркин,

1981). Одним из определяющих условий практического использования микробных сообществ является отсутствие конкурентных взаимоотношений между штаммами-деструкторами.

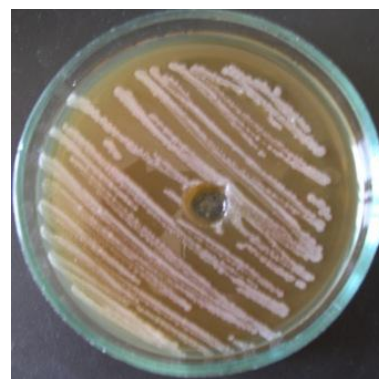
С целью оценки конкурентной способности изучаемых бактерий по отношению друг к другу двумя методами были проведены исследования по определению их экологической взаимосвязи (раздел 2.4). В настоящих экспериментах мы исследовали также конкурентноспособность выделенных из БШ бактерий по отношению к *D. maris* АМЗ – деструктору нефтяных углеводов, перспективному для использования в биотехнологии утилизации БШ.

При определении экологической взаимосвязи бактерий методом перекрестного посева визуализировали особенности роста культур в местах их пересечения. При этом было обнаружено полное отсутствие какого-либо угнетения роста всех исследованных бактерий.

С помощью метода лунок рост каждой культуры оценивался по отношению к одному из бактериальных штаммов в отдельной чашке Петри в прямом и перекрестном варианте. Ни в одном из вариантов не наблюдалось подавления роста культур на всей поверхности агаризованной питательной среды, включая область вокруг лунки (рисунок 20).



а



б

Рисунок 20 – Результат оценки конкурентной способности: а – *S. silvestris* ОБР 3.2 по отношению к *B. circulans* ОБР 3.3 (в лунке); б – *Halomonas* sp. ОБР 1 по отношению к *B. circulans* НШ (в лунке)

Таким образом, данные исследования показали, что все выделенные из БШ микробные штаммы обладали высокой конкурентной способностью как по отношению друг к другу, так и к бактериальному штамму *D. maris* AM3. Эти результаты, свидетельствующие об отсутствии антагонистических взаимоотношений между микроорганизмами, явились одной из предпосылок создания из данных бактерий модельных ассоциаций для возможного использования в биоутилизации компонентов БШ.

5.3 Оценка степени деструкции нефти модельными ассоциациями бактерий и составляющими их штаммами в экстремальных и нормальных условиях

Известно, что при применении ассоциаций микроорганизмов биodeградация нефтепродуктов происходит полнее и за меньшие сроки, чем при использовании индивидуальных микроорганизмов (Суржко и др., 1995; Карасева и др., 2012; Vinas et al., 2002; 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 (Карасева и др., 2012).

В предыдущих исследованиях мы показали, что все выделенные нами из БШ микроорганизмы обладают оригинальными эколого-функциональными особенностями и деструктивным потенциалом по отношению к углеводородам. Для создания ассоциации микроорганизмов-деструкторов компонентов БШ 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 солености среды до 15%, был устойчив к действию практически всех исследованных ТМ в диапазоне концентраций, а также имел высокий деструктивный потенциал по отношению к нефти, ДТ и минеральному маслу. Штамм *S. silvestris* ОБР 3.2 был также

галотолерантен, хорошо рос при солености среды 15%, отличался наибольшей устойчивостью ко всем исследованным ТМ, обладал высокой деструктивной активностью по отношению к нефти.

Отобранные бактерии использовали в сочетании с активным деструктором углеводов *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.

Выбранные нами бактерии и модельные ассоциации культивировали при различной концентрации соли и значениях pH в минеральной среде М9 с нефтью в качестве единственного источника углерода и энергии (1% по весу) в условиях аэрации на круговой качалке при 160 об/мин и температуре 24°C в течение 10 сут. Варианты ассоциаций и условий культивирования отображены в таблице 12.

В качестве посевного материала использовали смыв суточной культуры бактерий (в случае *D. maris* AM3 – 3-х суточной) с МПА физиологическим раствором. Оптическая плотность посевной дозы составляла 1,0 ед. при длине волны 540 нм. Деструктивную активность монокультур и созданных ассоциаций определяли по остаточному содержанию нефтяных углеводов в минеральной среде газовой хроматографией (Хроматографический анализ..., 1979; Другов, Родин, 2007). Деструктивную активность опытных образцов рассчитывали в процентах по отношению к абиотическому контролю (минеральная среда с нефтью без бактерий).

В данном эксперименте мы оценивали степень деструкции нефти монокультурами при обычных и экстремальных условиях для того, чтобы сравнить полученные показатели с эффективностью биodeградации нефти смешанными культурами и выявить те или иные преимущества.

Согласно полученным результатам, через 10 сут. культивирования бактерий при нейтральных значениях pH и нормальном содержании соли (0,5%) в минеральной среде степень деструкции нефти *B. circulans* НШ составляла 46, *S. silvestris* ОБР 3.2 – 32, *D. maris* AM3 – 40% (таблица 12). Эти данные согласуются с результатами, полученными нами ранее гравиметрическим методом анализа

(глава 4). Таким образом, выделенные нами из БШ бактерии и нефтеокисляющий микроорганизм *D. maris* АМЗ сходным образом деградировали нефть в обычных условиях.

Таблица 12 – Деструкция нефти бактериями и модельными ассоциациями через 10 сут. культивирования в жидкой среде (по данным газовой хроматографии)

Варианты	Значение рН	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> АМЗ	7	0,5	40±3,7
<i>S. silvestris</i> ОБР 3.2	7	15	33±1,9
<i>D. maris</i> АМЗ	7	15	6±0,9
<i>S. silvestris</i> ОБР 3.2 + <i>D. maris</i> АМЗ	7	15	41±2,8
<i>D. maris</i> АМЗ	9	15	39±1,3
<i>B. circulans</i> НШ	9	15	47±3,9
<i>B. circulans</i> НШ + <i>D. maris</i> АМЗ	9	15	59±4,1

Следует отметить, что все микробные штаммы проявили деструктивную активность по отношению к лигроиновой (C_{12} - C_{14}), керосиновой (C_{12} - C_{18}) и газойлевой (C_{19} - C_{28}) фракциям нефти. Штамм *S. silvestris* ОБР 3.2 в равной степени осуществлял деструкцию всех оцениваемых фракций нефти (21-39%).

Деструктивная активность *B. circulans* НШ и *D. maris* АМЗ по отношению к фракциям нефти несколько отличалась (рисунок 21). Штамм *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% соответственно. Степень деструкции керосиновой и лигроиновой фракции *D. maris* АМЗ составила 41 и 49% соответственно. Газойлевая фракция данным микроорганизмом разрушалась меньше по сравнению с *B. circulans* НШ.

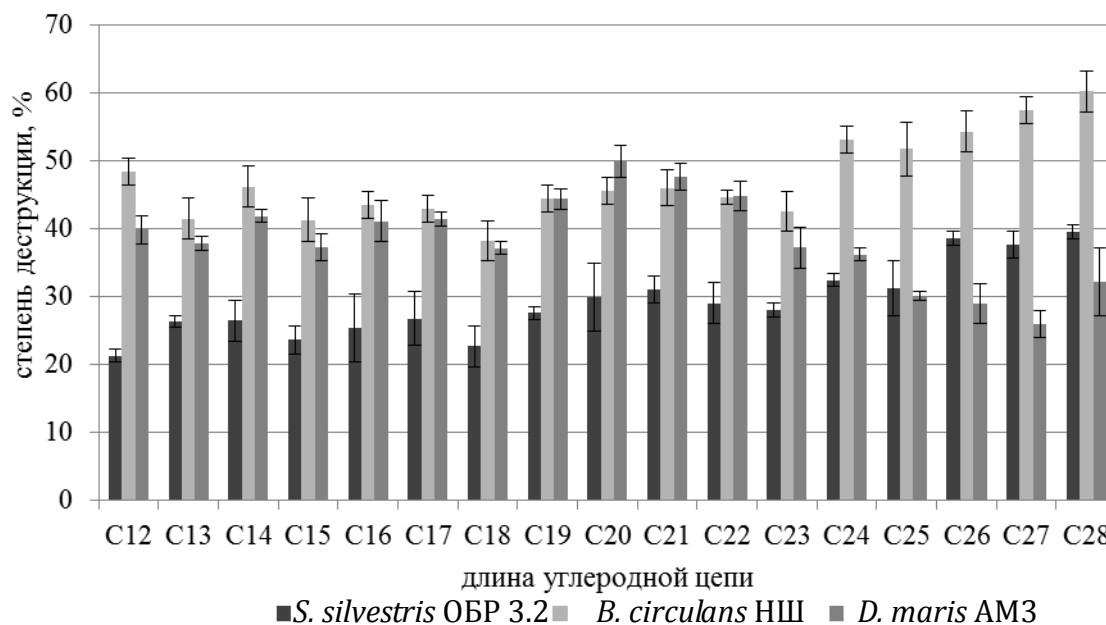


Рисунок 21 – Деградация нефти бактериями в жидкой среде в течение 10 сут. в нормальных условиях (газовая хроматография)

Культивирование *B. circulans* НШ и *S. silvestris* ОBP 3.2 с нефтью в экстремальных условиях показало, что их деструктивная активность была сравнима с активностью, проявленной данными бактериями в обычных условиях, что свидетельствует об устойчивости исследованных микроорганизмов к данным условиям, о которой сообщалось в главе 4 и 5. Изменение экологических условий никак не повлияло на деструктивную активность штаммов по отношению к различным фракциям нефти. 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* AM3, что может свидетельствовать об ингибирующем влиянии соли на жизнедеятельность и метаболическую активность данного микроорганизма. Однако в условиях повышенной солености и щелочности среды деструктивная активность данного штамма составила 39% и была сопоставима с активностью *D. maris* AM3 при культивировании в обычных условиях (таблица 12). 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^+ . Так, авторы (Громов, Павленко, 1989) сообщали о подобных экспериментах с *B. firmus*, в которых бактерии, помещенные в буферный раствор с pH 10,5 в отсутствии Na^+ , быстро погибали, а в присутствии Na^+ значение pH среды никак не влияло на жизнедеятельность данных бактерий.

Несмотря на то, что штамм *D. maris* АМЗ проявил низкую деструктивную активность в условиях солености среды, в ассоциации с *S. silvestris* ОБР 3.2 деструктивная активность в условиях солености среды 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. Так, М.В. Журина (2009) установила, что галофильный спутник оказывает защитное действие против осмотического шока на входящий с ним в общую ассоциацию нефтеокислитель. Был расшифрован механизм этого защитного действия, состоящий в образовании осмопротекторного вещества эктоина, обеспечивающего рост нефтеокислителя при ингибиторных уровнях соли. На основании проведенных исследований автор рекомендовала вводить в биопрепараты, предназначенные для очистки от нефтяных загрязнений, микроорганизмы-спутники, повышающие активность нефтеокислителей и/или защищающие последние от стрессовых факторов среды.

Максимальная степень деструкции нефти в условиях повышенной солености и щелочности среды обнаруживалась у ассоциации бактерий: *B. circulans* НШ и *D. maris* АМЗ (рисунок 22).

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

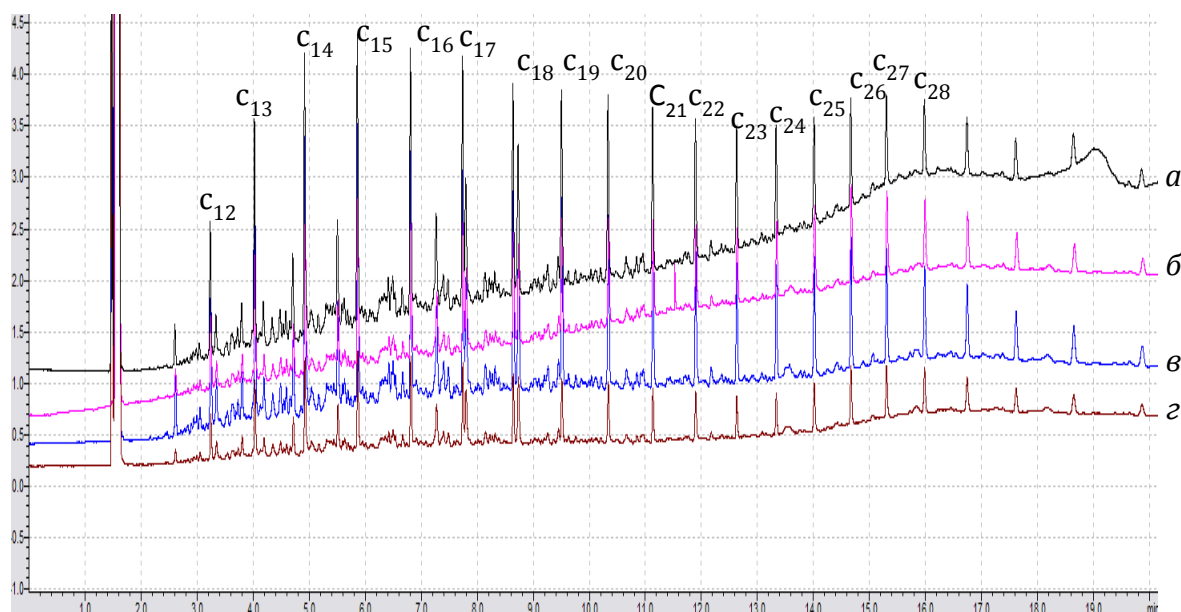


Рисунок 22 – Газовая хроматография экстрактов нефти: *а* – контроль без добавления бактерий, *б* – *B. circulans* НШ, *в* – *D. maris* AM3, *г* – ассоциация *B. circulans* НШ + *D. maris* AM3 (pH 9; 15% NaCl)

Сравнивая фракционный состав нефти после 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}) (рисунок 23), 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 позволяют нам говорить, 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. Эффективность деструкции нефти ассоциацией: *B. circulans* НШ + *D. maris* AM3 выше, чем монокультурой, что может быть связано с процессами кометаболизма, что, отчасти, подтверждается выявленными различиями в утилизации фракций нефти разными штаммами.

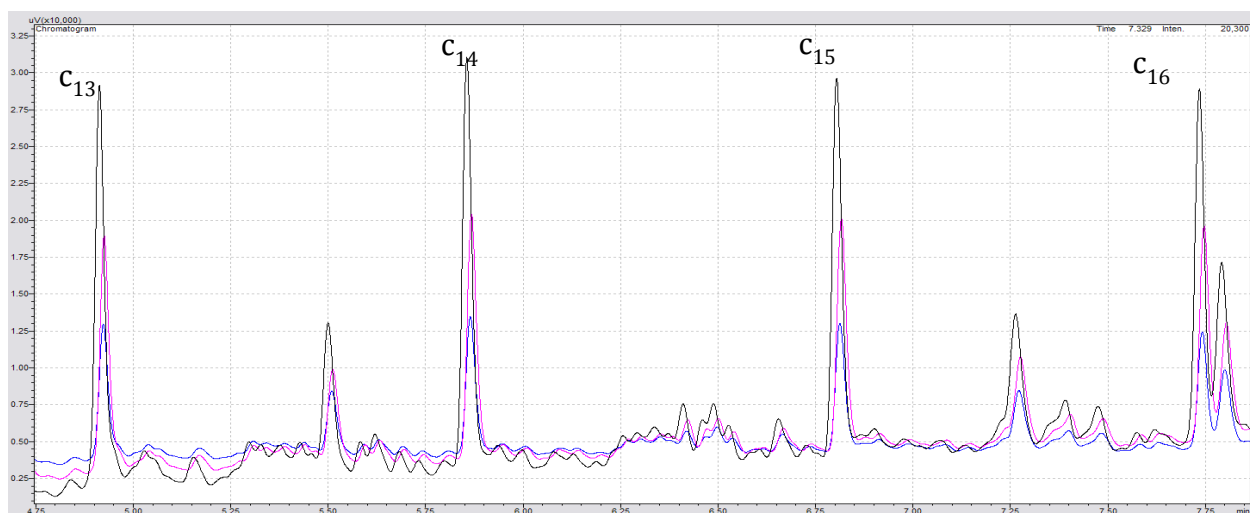


Рисунок 23 – Фрагмент диаграммы газовой хроматографии экстрактов нефти: *черная полоса* – контроль без добавления бактерий, *розовая* – *D. maris* AM3, *синяя* – ассоциация *B. circulans* HШ + *D. maris* AM3 (pH 9; 15% NaCl)

Полученные характеристики бактерий позволяют рассматривать их как потенциальных интродуцентов для использования в технологиях очистки буровых отходов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы доля применения РУО при строительстве газо- и нефтедобывающих скважин на суше сильно растет. При использовании таких растворов существует опасность загрязнения окружающей среды компонентами, входящими в их состав, среди которых основными токсикантами являются углеводороды (Рязанов, 2005). БШ, составной частью которых являются РУО, в частности, ИЭР, а также целый комплекс других токсичных реагентов, могут нанести серьезный вред окружающей среде (Калашник, Барахнина, 2009), особенно, почве. В то же время, проблема токсического действия ИЭР и их компонентов на почву недостаточно изучена.

Нами проведена комплексная оценка токсического действия ИЭР и составляющих их реагентов с помощью организмов разных систематических групп (высшие растения, почвенные беспозвоночные и микроорганизмы). При сравнении результатов, полученных с помощью трех приемов биотестирования, были установлены сходные тенденции. Из всех 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 заметное ингибирование корней проростков редиса в почве с минеральным маслом, что, скорее всего, связано с нарушением под влиянием этого загрязнителя агрофизических свойств почвы.

Показано, что все исследованные буровые растворы по всем показателям биотестов обладали высоким уровнем токсического действия на почву, который незначительно снижался через 30 сут. экспозиции. ИЭР на основе нефти и ДТ, в дисперсионной среде которых содержались ароматические соединения и циклические углеводороды в средней и высокой концентрации, были более токсичны по отношению к тест-организмам по сравнению с ИЭР на основе минерального масла. Полученные данные позволяют рекомендовать

использование минерального масла в качестве углеводородной основы ИЭР как наименее токсичной дисперсионной среды.

Результаты микробного теста показали, что активность дегидрогеназ *D. maris* AM3 в почве с различными типами ИЭР была значительно ниже, чем в почве с соответствующими дисперсионными средами, свидетельствуя о большей токсичности ИЭР, которая, вероятно, обусловлена известным сочетанным действием соединений. В то же время по результатам фито- и вермитестирования токсичность ИЭР и их дисперсионных сред (нефть, ДТ) существенно не отличалась. В ходе биотестирования установлено, что из реагентов, входящих в состав исследованных ИЭР, максимальным токсическим воздействием на почву обладали хлорид кальция и сульфол, минимальным – известь и барит.

Как показали наши исследования, тест-организмы характеризовались разной чувствительностью к поллютантам, что свидетельствует о необходимости использования нескольких биотестов для адекватной оценки токсичности почв.

В ходе исследований нами апробирован комплекс тест-организмов для экотоксикологической оценки почв, загрязненных компонентами БШ, состоящий из высших растений, микроорганизмов и почвенных беспозвоночных. Показанная корреляция результатов биотестирования является доказательством надежности данного комплекса биотестов, который может быть рекомендован для практического использования.

В целом, тремя способами биотестирования было доказано негативное влияние на почву исследованных буровых растворов 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.

Известно, что БШ могут служить селективными агентами для образования УОМ, а также бактерий-деструкторов различных компонентов буровых растворов (Калужин, 2009; Benka-Coker, Olumagin, 1995). Поэтому для разработки микробиологического способа детоксикации БШ нами было изучено два образца БШ, отобранных из нефтяных скважин с высоким значением pH (pH 9) и высокой

степенью минерализации (15%) для выявления микроорганизмов-деструкторов химических реагентов, входящих в состав БШ.

Было показано, что аэробные гетеротрофные бактерии содержались в БШ в разных количествах (численность в БШ 1 – 1×10^3 , БШ 2 – $8,9 \times 10^3$ кл/г, определенная при прямом высеве), что обусловлено, вероятно, особенностями условий окружающей среды, а также различным составом выбуренной породы и, как следствием, наличием различных источников питательных веществ. Среди бактерий, входящих в сообщества БШ, преобладали УОМ и микроорганизмы, гидролизующие крахмал. Так, в образце БШ 2 содержалось: УОМ – $6,1 \times 10^3$ и $8,8 \times 10^2$ кл/г микроорганизмов, гидролизующих крахмал. При этом надо отметить, что в БШ не обнаруживались микроорганизмы-деструкторы ПАВ: (синтанола АЦСЭ-12 и сульфонола) и КМЦ.

Добавление в среду культивирования селективных источников питания – модельных буровых растворов с различными дисперсионными средами способствовало увеличению количества бактерий, высеваемых из БШ, особенно, группы УОМ.

Полученные результаты создают предпосылки для выделения из подобных микробных сообществ активных деструкторов реагентов БШ и буровых растворов, в том числе, опасных для окружающей среды.

Из образцов БШ прямым высевом и с помощью накопительного культивирования было выделено 7 чистых культур, которые на основании изученных морфологических, культуральных и биохимических свойств и молекулярных критериев систематики идентифицированы как: *B. circulans* НШ; *B. firmus* ОБР 1.1; *B. firmus* ОБР 3.1; *S. silvestris* 3.2, *B. circulans* ОБР 3.3, *Halomonas* sp. ОБР 1 и *E. rhapontici* ОБР 4.1. Преобладание представителей рода *Bacillus* среди выделенных нами из БШ бактерий, скорее всего, связано с их широким адаптационным потенциалом, которому способствует спорообразование у данных микроорганизмов.

Был изучен деструктивный потенциал выделенных бактерий в отношении нефтепродуктов и индивидуальных углеводов. Отмечено, что все

исследованные микробные штаммы хорошо росли на минеральной среде с буровым раствором, основой которого было минеральное масло, на среде с нефтью и подавляющее большинство – на средах с ДТ и вазелиновым маслом. Среди изученных бактерий можно выделить несколько культур (*B. firmus* ОБР 1.1; *B. firmus* ОБР 3.1; *B. circulans* ОБР 3.3 и *B. circulans* НШ), которые активно использовали для роста все тестируемые нами нефтепродукты и индивидуальные углеводороды.

Количественно (с помощью гравиметрического анализа) оценивалась деструктивная активность выделенных микроорганизмов по отношению к наиболее встречаемым в буровых растворах дисперсионным средам: нефти, ДТ и минеральному маслу (Соловьев, 2003; Смирнова, 2011; Young, 1994). Согласно полученным результатам, у всех изученных микроорганизмов обнаруживалась деструктивная активность по отношению к нефти, которая составила 28-40% за 10 сут. культивирования. По отношению к ДТ заметную деструктивную активность проявили *B. circulans* ОБР 3.3 и *B. circulans* НШ. Общее содержание углеводов при культивировании данных микроорганизмов снизилось на 35,5 и 25%, соответственно. 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. Проявленная деструктивная активность выделенных нами микроорганизмов в отношении нефтяных углеводов была сравнима с литературными данными (Караулов, Худолий, 2000; Логинов и др., 2004; Ключанова, 2009; Плотникова, 2010; Ilyina et al., 2003).

В целом, эта серия экспериментов показала, что все выделенные из БШ бактерии хорошо усваивают нефть в качестве единственного источника углерода и энергии, что может быть связано с источниками их выделения (нефтяные скважины) и, как следствием, их многолетней адаптацией к данному субстрату как источнику питания.

Взаимодействуя с углеводородным субстратом, нефтеокисляющие бактерии способны к непосредственному контакту с углеводородом за счет гидрофобной

клеточной поверхности, обусловленной наличием в ней липидных компонентов (Zhang, Miller, 1995). Как показали эксперименты, исследованные культуры характеризовались различными значениями гидрофобности клеточной поверхности. Согласно нашим результатам, ПГ у бактерий, относящихся к роду *Bacillus*: *B. firmus* ОБР 1.1, *B. firmus* ОБР 3.1, *B. circulans* ОБР 3.3 и *B. circulans* НШ, при культивировании их на питательной среде составлял от 23,7 до 36,8%, при выращивании их в минеральной среде с глицерином ПГ был значительно выше – 57,3-65,5%. Аналогичное увеличение ПГ после культивирования на гидрофобном источнике углерода наблюдалось у *Solibacillus silvestris* ОБР 3.2 – от 18,7 до 66,2%, что связано, по всей видимости, с вариациями в составе клеточных стенок бактерий. В связи с этим, обнаруженные нами изменения у исследованных микроорганизмов при смене источника углерода в среде культивирования могут свидетельствовать о возможном направленном синтезе биоПАВ.

Способность микроорганизмов расти на углеводородном субстрате, как правило, связано с синтезом ими биоПАВ, облегчающих поглощение углеводородов клетками бактерий за счет диспергирования нефтепродуктов и увеличения биодоступности углеводородов (Коронелли, Нестерова, 1990; Christofi, Ivshina, 2002). В ходе проведенных нами исследований было показано, что все бактерии проявили высокую эндогенную ($E_{24}=55-97$; $E_{48}=56-90\%$) и экзогенную ($E_{24}=40-87$; $E_{48}=40-85\%$) эмульгирующую активность по отношению к нефти. Следует также подчеркнуть, что у всех изученных культур, выделенных из БШ, поверхностно-активные свойства (эмульгирующая активность) связаны как с биомассой бактерий, так и с супернатантом культуральной жидкости. Уровень эмульгирующей активности супернатанта *Halomonas* sp. ОБР 1, *B. circulans* ОБР 3.3 и *B. circulans* НШ был близок уровню эмульгирующей активности жидкой культуры, позволяя предположить, что данное свойство этих бактерий обеспечиваются и внеклеточными биоПАВ. По отношению к ДТ все изучаемые культуры проявили сходную эндогенную и экзогенную эмульгирующую активность, порядка 40% через 24 и 48 ч., что сравнимо с соответствующими

показателями для контрольного нефтеокисляющего микроорганизма *D. maris* AM3.

Таким образом, полученные нами результаты в соответствии с литературными данными свидетельствуют о возможных преимуществах микроорганизмов, выделенных из БШ, 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 БШ.

Однако использование биотехнологического метода для детоксикации БШ осложняется не только многокомпонентным составом пропитывающих их буровых растворов, но и наличием в шламах ТМ, являющихся опасными экотоксикантами, а также экстремальными экологическими условиями для микроорганизмов-деструкторов, которые характерны для такого комплексного загрязнения. Так, БШ отличаются, например, от НШ, высокими значениями pH и высокой степенью минерализации. В связи с этим, мы исследовали изолированные из БШ микроорганизмы не только на способность к деструкции компонентов БШ, но также на устойчивость к экстремальным экологическим условиям.

Как показали исследования, все выделенные нами бактерии отличались полирезистентностью в отношении самых распространенных в БШ ТМ: Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} и Fe^{2+} . Исследованные микроорганизмы хорошо росли на среде с Ni^{2+} (8-38 мг/л), Fe^{2+} (7-37 мг/л) и Pb^{2+} (25-375 мг/л). Бактериальный штамм *S. silvestris* ОБР 3.2 отличался от других изученных микроорганизмов отчетливым ростом на среде с повышенным содержанием Cu^{2+} (142 и 189 мг/л) и Cd^{2+} (43 и 61 мг/л).

Обнаруженная у исследованных бактерий полирезистентность к ТМ, несомненно, 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.

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. Как свидетельствуют полученные результаты, у всех исследованных бактерий обнаружен заметный рост при pH 8. Микробный штамм *B. circulans* НШ хорошо рос при pH 9 и 10, при pH 11 рост штамма был слабым и проявлялся в образовании небольшого осадка на дне пробирки. *B. firmus* ОБР 1.1 отличался значительным ростом при pH 9, при pH 10 и 11 рост штамма был слабым.

Концентрация соли 12 и 15% была критична для роста бактерий *B. firmus* ОБР 3.1 и *B. circulans* ОБР 3.3. Все остальные микроорганизмы росли с различной интенсивностью. Среди них выделялись *S. silvestris* ОБР 3.2 и *B. circulans* НШ, которые характеризовались очень интенсивным ростом в питательной среде с 12 и 15%-ной концентрацией NaCl.

Результаты данного эксперимента показали, что выявленный широкий диапазон роста изученных нами микроорганизмов может свидетельствовать об их адаптации к условиям повышенной щелочности и солености. Способность к росту при высоких значениях pH и высокой степени минерализации свидетельствует о перспективности данных микроорганизмов в детоксикации БШ.

Учитывая возможность использования выделенных бактерий для утилизации отходов бурения, были проведены исследования по определению их экологической безопасности. Показано, что все исследованные нами бактериальные штаммы: *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 обладают лецитиназной и гемолитической активностью, что могло косвенно свидетельствовать об их непатогенности. Все протестированные шесть штаммов не оказывали летального действия на беспородных белых крыс. Зараженные животные ничем не отличались по поведенческим реакциям от контрольной группы, никаких проявлений интоксикации или развития инфекционного процесса не наблюдалось.

С целью создания эффективных ассоциаций бактерий-деструкторов компонентов БШ предварительно изучалась конкурентная способность бактерий по отношению друг к другу и к нефтеокисляющему штамму *D. maris* AM3. Установлено, что все микробные штаммы обладали высокой конкурентной способностью. Эти результаты, свидетельствующие об отсутствии антагонистических взаимоотношений между микроорганизмами, явились одной из предпосылок создания из данных бактерий модельных ассоциаций для возможного использования в биоутилизации компонентов БШ.

Одним из подходов к повышению эффективности биопрепаратов-нефтедеструкторов является переход от монобактериальных к полибактериальным препаратам (Wenderoth et al., 2003). Включение нескольких штаммов обеспечивает расширение спектра окисления, большую вариабельность культур в различных условиях (Карасева и др., 2012). Поэтому мы сравнивали степень деструкции нефти монокультурами при обычных и экстремальных условиях (pH 9, 15% NaCl) с эффективностью деструкции нефти смешанными культурами для выявления тех или иных преимуществ. Для создания ассоциации микроорганизмов-деструкторов компонентов БШ мы выбрали два наиболее перспективных из выделенных нами штаммов: *B. circulans* НШ и *S. silvestris* ОБР 3.2 в сочетании с активным деструктором углеводов *D. maris* AM3 (Плешакова и др., 2008).

Согласно полученным результатам, через 10 сут. культивирования *B. circulans* НШ и *S. silvestris* ОБР 3.2 с нефтью в минеральной среде при экстремальных условиях деструкция нефти составила 47 и 33%, соответственно, что сравнимо с деструктивной активностью, проявленной данными бактериями в обычных условиях. Следует отметить, что все микробные штаммы проявили деструктивную активность по отношению к лигроиновой (C_{12} - C_{14}), керосиновой (C_{12} - C_{18}) и газойлевой (C_{19} - C_{28}) фракциям нефти.

Несмотря на то, что штамм *D. maris* AM3 проявил низкую деструктивную активность в условиях солености среды, в ассоциации с *S. silvestris* ОБР 3.2 деструктивная активность в условиях солености среды 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, вероятно, благодаря наличию галофитного спутника, оказывающего защитное действие против осмотического шока на входящий с ним в общую ассоциацию нефтеокислитель (Жукова, 2009). Максимальная степень деструкции нефти в условиях повышенной солености и щелочности среды обнаруживалась у ассоциации бактерий: *B. circulans* НШ и *D. maris* АМЗ. Так, через 10 сут. культивирования общее содержание углеводородов снизилось на 59% по сравнению с контролем. Деструктивная активность ассоциации была на 20 и 12% выше, чем активность индивидуальных штаммов *D. maris* АМЗ и *B. circulans* НШ, выращенных в аналогичных условиях.

Таким образом, полученные данные позволяют нам утверждать, 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* АМЗ. Эффективность деструкции нефти ассоциацией: *B. circulans* НШ + *D. maris* АМЗ выше, чем монокультурой, что может быть связано с процессами кометаболизма, что, отчасти, подтверждается выявленными различиями в утилизации фракций нефти разными штаммами.

Итак, перечисленные выше свойства бактерий, выделенных из БШ, свидетельствуют об их уникальности и конкурентноспособности в условиях комплексного загрязнения. Полученные данные открывают перспективу практического использования выделенных бактерий, как в отдельности, так и в сочетании друг с другом или другими активными микроорганизмами-деструкторами. Это позволяет рекомендовать данные штаммы для создания основы биопрепаратов для детоксикации БШ.

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 9×10^3 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: Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} и Fe^{2+} , для четырех штаммов – галотолерантность, двух – алкалотолерантность. Микроорганизмы способны расти в экстремальных условиях: *B. firmus* ОБР 1.1 (pH 7-9), *B. circulans* НШ (pH 7-10; 15% NaCl), *S. silvestris* ОБР 3.2 (15% NaCl; высокие концентрации Cu^{2+} (189 мг/л) и Cd^{2+} (61

мг/л)). Все бактерии обладают конкурентной способностью и экологической безопасностью.

5. В условиях повышенной солености (15%) и щелочности среды (pH 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.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АПAB – анионоактивные поверхностно-активные вещества

БШ – буровые шламы

ВНИИСБТ – Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии

ДТ – дизельное топливо

ИТФ – индекс токсичности фактора

ИЭР – инвертно-эмульсионные буровые растворы

КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза

КОЕ – колониеобразующие единицы

КПАВ – катионоактивные поверхностно-активные вещества

НПАВ – неионогенные поверхностно-активные вещества

НШ – нефтешламы

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

МПА – мясо-пептонный агар

МПБ – мясо-пептонный бульон

ОБР – отработанный буровой раствор

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ПАУ – полициклические ароматические углеводороды

ПГ – показатель гидрофобности

ПДК – предельно допустимая концентрация

РУО – буровые растворы на углеводородной основе

ТМ – тяжелые металлы

ТТХ – 2,3,5-трифенилтетразолийхлорид

ТФФ – 2,3,5-трифенилформазан

УОМ – углеводородокисляющие микроорганизмы

LB – среда Luria-Bertani

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абалаков, Д.А. Геоэкология кустового безамбарного бурения нефтегазовых месторождений / Д.А. Абалаков, В.П. Половкин, А.Г. Вахромеев. – Иркутск: Изд-во Арт-Пресс, 2003. – 334 с.
2. Акопов, Г.С. Опыт применения биопрепарата «Деворойл» для очистки торфяно-глеевых почв на объектах ГП «Тюментрансгаз» от углеводородного загрязнения / Г.С. Акопов, Е.В. Сидорова, Д.Г. Сидоров // Освоение Севера и проблемы рекультивации: Тез. докл. междунар. конф. – Сыктывкар: Изд-во СГУ, 1996. – С. 3-4.
3. Аксентий, Р.В. Опыт экологически безопасной эксплуатации месторождения нефти в условиях водоохранных зон / Р.В. Аксентий // Проблемы экологической безопасности нефтегазового комплекса Среднего Приобья: Избранные науч.-практ. мат. – Нижневартовск: Изд-во НГУ, 1999. – С. 91-96.
4. Ананько, Г.Г. Устойчивость нефтеокисляющих микроорганизмов к низким температурам / Г.Г. Ананько, В.Г. Пугачёв, О.Д. Тотменина // Биотехнология. – 2005. – № 5. – С. 63-69.
5. Андреева, И.С. Психротолерантные штаммы-нефтедеструкторы для биоремедиации почв и водной среды / И.С. Андреева, И.К. Емельянова, С.Н. Загребельный // Биотехнология. – 2006. – № 1. – Р. 46-48.
6. Аренс, В.Ж. Очистка окружающей среды от углеводородных загрязнений / В.Ж. Аренс, А.З. Саушин, О.М. Гридин. – М.: Интербук, 1999. – 370 с.
7. Астафьева, Л.С. Экологическая химия: Учеб. пособие / Л.С. Астафьева. – М.: Издательский центр «Академия», 2006. – 224 с.
8. Астрова, Н.Г. Разработка биоконверсионной очистки нефтесодержащих сточных вод по системе Каскад-Стар. / Н.Г. Астрова, Л.В. Мойсеева, В.В. Астров // Сб. мат. междунар. науч.-практ. конф. "Вода и здоровье – 98". – Одесса: Изд-во ОГУ, 1998. – С. 213-217.

9. Багаева, Т.В. Микробиологическая ремедиация природных систем от тяжелых металлов: Учеб. пособие / Т.В. Багаева, Н.Э. ИONOва, Г.В. Надеева. – Казань: Изд-во КГУ, 2013. – 56 с.
10. Балаба, В.И. Обеспечение экологической безопасности строительства скважин на море / В.И. Балаба // Бурение и нефть. – 2004. – № 1. – С. 18-21.
11. Барахнина, В.Б. Усовершенствование методов очистки почвы и воды от нефти, нефтепродуктов и отработанных буровых реагентов: автореф. дис. ... канд. тех. наук: 03.00.23 / Барахнина Вера Борисовна. – Уфа, 1999. – 18 с.
12. Безвербная, И.П. Металлоустойчивые гетеротрофные бактерии / И.П. Безвербная, Л.С. Бузолева, Н.К. Христофорова // Микробиология. – 2005. – Т. 31, № 2. – С. 89-93.
13. Беляков, В.Д. Псевдомонады и псевдомонозы / В.Д. Беляков, Л.А. Ряпис, В.И. Илюхин. – М.: Медицина, 1990. – 224 с.
14. Биоремедиация нарушенных углеводородами и тяжелыми металлами почв с использованием *Rhodococcus*-биосурфактантов и иммобилизованных родококков / И.Б. Ившина [и др.] // Аграрный вестник Урала. – 2012. – № 8. – С. 65-68.
15. Биотестирование почвы и воды, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, с помощью растений / В.Н. Петухов [и др.] // Прикл. биохим. и микробиол. – 2000. – Т. 36, № 6. – С. 652-655.
16. Болдырев, В.А. Полевые исследования морфологических признаков почв: Учеб. пособие / В.А. Болдырев, В.В. Пискунов. – Саратов: Изд-во СГУ, 2006. – 60 с.
17. Бранулоу, А.Х. Геохимия / А.Х. Бранулоу. – М.: Недра, 1984. – 304 с.
18. Булатов, А.И. Охрана окружающей среды / А.И. Булатов, П.П. Макаренко, В.Ю. Шеметов. – М: Недра, 1997. – 484 с.
19. Булатов, А.И. Буровые промывочные и тампонажные растворы. Учеб. пособие для вузов / А.И. Булатов, П.П. Макаренко, Ю.М. Проселков. – М.: Изд-во Недра, 1999. – 424 с.

20. Булахова, Н.С. Микотоксинообразующая микрофлора зерна озимой ржи в Калужской области / Н.С. Булахова // Известия Калужского общества изучения природы. – 2006. – № 1. – С. 31-39.
21. Быков, И.Ю. Охрана окружающей среды при строительстве скважин / И.Ю. Быков, А.С. Гуменюк, В.И. Литвиенко // ВНИИОЭНГ. – 1985. – № 1. – С. 31-60.
22. Ветрова, А.А. Биodeградация углеводов нефти плазмидсодержащими микроорганизмами деструкторами: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06 / Ветрова Анна Андрияновна. – М., 2010. – 47 с.
23. Влияние состава клеточных липидов на формирование неспецифической антибиотикорезистентности алканотрофных родококков / М.С. Куюкина [и др.] // Микробиология. – 2000. – Т. 69, № 1. – С. 62-69.
24. Волченко, Н.Н. Влияние условий культивирования на поверхностно-активные свойства углеводородокисляющих актинобактерий: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Волченко Никита Николаевич. – Ставрополь, 2006. – 20 с.
25. Волченко, Н.Н. Скрининг углеводородокисляющих бактерий – продуцентов поверхностно-активных веществ биологической природы и их применение в опыте по ремедиации нефтезагрязненной почвы и нефтешлама / Н.Н. Волченко, Э.В. Карасева // Биотехнология. – 2006. – № 2. – С. 57-62.
26. Воробейчик, Е.Л. Население дождевых червей (Lumbricidae) лесов Среднего Урала в условиях загрязнения выбросами медеплавильных комбинатов / Е.Л. Воробейчик // Экология. – 1998. – № 2. – С. 102-108.
27. Восканов, М.В. Гематологическая реакция севанской форели на растворы HCl и КОН / М.В. Восканова // Тр. 5 всесоюз. конф. по общей токсикологии. – Одесса: Изд-во ОГУ, 1988. – С. 107-108.
28. Выбор и характеристика активных психротрофных микроорганизмов-деструкторов нефти / И.А. Пырченкова [и др.] // Прикл. биохим. и микробиол. – 2006. – Т. 42, № 3. – С. 298-305.

29. Галиев, Р.А. Фиторемедиация нефтешлама: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Галиев Ринат Александрович. – Казань, 2007. – 19 с.
30. Гараев, Л.А. Прямые и обратные эмульсии на основе неонолов и синтанолов для повышения нефтеотдачи пластов: автореф. дис. ... канд. тех. наук: 02.00.11 / Гараев Ленар Азгарович. – Казань, 2005. – 171 с.
31. Гасымлы, Л.Э. Биоремедиация бурового шлама в процессе химической фиксации / Л.Э. Гасымлы, Н.А. Ибалдов, Ф.К. Касумов // Междунар. науч. журнал «Альтернативная энергетика и экология». – 2005. – № 4. – С. 86-90.
32. Герасимова, М.С. Выбор технологии обезвреживания и утилизации отработанных буровых растворов / М.С. Герасимова // Охрана окружающей среды и экология: Мат. II междунар. науч. студ. конф. – Ставрополь: Изд-во СевКавГТУ, 2008. – С. 180.
33. Гетерогенность *Rhodococcus opacus* 1CP как ответ на стрессовое воздействие хлорфенолов / М.П. Коломынцева [и др.] // Прикл. биохим. и микробиол. – 2005. – Т. 41, № 5. – С. 541-546.
34. Гигиенические нормативы ГН 2.1.7.2041-06: Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве. – М., 2006. – 20 с.
35. Горбунова, А.В. Влияние повышенной мутности на планктонных фильтраторов / А.В. Горбунова // I всесоюз. конф. по рыбохозяйственной токсикологии. – Рига: Изд-во РГУ, 1988. – С. 45-46.
36. Горлатов, С.Н. Аэробная микрофлора нефтяного месторождения и способность ее к деструкции нефти / С.Н. Горлатов, С.С. Беляев // Микробиология. – 1984. – Т. 53, № 5. – С. 843-849.
37. Госманов, Г.Р. Микробиология / Г.Р. Госманов, А.К. Галиуллин, А.Х. Волков. – М.: Изд-во Лань, 2011. – 496 с.
38. Грей, Д.Р. Состав и свойства буровых агентов (промывочных жидкостей) / Д.Р. Грей, Г.С. Дарли. – М.: Недра, 1985. – 509 с.
39. Григориади, А.С. Загрязнение урбанизированных территорий дизельным топливом и метод их реабилитации / А.С. Григориади // Сб. науч. тр. по мат. 6-

- й Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием «Экологические проблемы промышленных городов». – Саратов: Изд-во СГТУ, 2013. – С. 120-123.
40. Григорьева, Л.В. Влияние поверхностно-активных веществ на выживаемость в воде кишечных бактерий, фагов и бделловидных / Л.В. Григорьева, Г.И. Корчак, Т.В. Бей // Кишечные инфекции. – 1979. – № 11. – С.104-107.
 41. Грищенко, Н.Ф. Действие некоторых поверхностно-активных веществ на санитарно-показательную и патогенную микрофлору в речной воде / Н.Ф. Грищенко, Р.И. Грищенко, Н.Н. Сакаль // Гигиена масел. – 1980. – Т. 19, № 7. – С. 26-29.
 42. Громов, Б.В. Экология бактерий: Учеб. пособие / Б.В. Громов, Г.В. Павленко. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1985. – 248 с.
 43. Гусейнов, Т.Н. Безвредные концентрации токсикантов / Т.Н. Гусейнов, Р.Ю. Касымов // Газовая промышленность. – 1986. – № 3. – С. 26.
 44. Давыдова, С.Л. Нефть и нефтепродукты в окружающей среде: Учеб. пособие / С.Л. Давыдова, В.И. Тагасов. – М.: Изд-во РУДН, 2004. – 163 с.
 45. Детоксикация нефтешлама с использованием целлюлозосодержащих субстратов / Н.А. Киреева [и др.] // Вестник Башкир. ун-та. – 2008. – Т. 13, № 1. – С. 47-48.
 46. Джамбетова, П. М., Реутова Н. В., Ситников М. Н. Влияние нефтезагрязнений на морфологические и цитогенетические характеристики растений / П.М. Джамбетова, Н.В. Реутова, М.Н. Ситников // Экологическая генетика. – 2005. – Т. 3, № 4. – С. 5-10.
 47. Добровольский, В.В. География почв с основами почвоведения / В.В. Добровольский. – М.: Изд-во Владос, 2001. – 320 с.
 48. Донец, Е.В. Влияние нефти на прорастание семян хвойных лесообразующих видов древесных растений подзоны южной тайги Омской области: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16 / Донец Евгений Владимирович. – Омск, 2009. – 148 с.

49. Другов, Ю.С. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов, практическое руководство / Ю.С. Другов, А.А. Родин. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. – 270 с.
50. Думанская, Т.У. Поверхностные свойства клеток некоторых углеводородокисляющих бактерий при росте на гидрофильном и гидрофобном субстратах / Т.У. Думанская, Т.М. Ногина, В.С.Подгорский // Проблемы биодеструкции техногенных загрязнителей окружающей среды: Тез. докл. междунар. конф. – Саратов: Изд-во Наука, 2005. – С. 17.
51. Егорова, Д.О. Грамположительные бактерии – деструкторы хлорированных бифенилов, перспективные для использования при биоремедиации загрязненных почв / Д.О. Егорова, Е.Г. Плотникова // Биотехнология. – 2009. – № 3. – С. 72-79.
52. Журина, М.В. Взаимодействие нефтеокисляющих микроорганизмов с хемоорганотрофными бактериями-спутниками, неспособными к окислению углеводородов, в структурированных микробных сообществах (Биопленках): автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Журина Марина Владимировна. – М., 2009. – 27 с.
53. Захаров, А.П. Регенерирующие установки для очистки и переработки шлама, образующегося при бурении скважин / А.П. Захаров // ЭИ Бурение. – 1983. – № 14. – С. 6-9.
54. Захваткин, Ю.А. Основы общей и сельскохозяйственной экологии / Ю.А. Захваткин. – Санкт-Петербург: Мир, 2003. – 360 с.
55. Зенова, Г.М. Практикум по биологии почв / Г.М. Зенова, А.Л. Степанов, А.А. Лихачева. – М.: Изд-во МГУ, 2002. – 120 с.
56. Иваненко, Н.В. Экологическая токсикология. Учебное пособие / Н.В. Иваненко. – Владивосток: Изд-во ВГУЭС, 2006. – 90 с.
57. Фенотипическая характеристика алканотрофных родококков из различных экосистем / И.Б. Ившина [и др.] // Микробиология. – 1995. – Т. 64, № 4. – С. 507-513.

58. Игонин, А.М. Как повысить плодородие почвы в десятки раз с помощью дождевых червей / А.М. Игонин. – М.: ИВЦ "Маркетинг", 1995. – 88 с.
59. Изжеурова, В.В. Влияние некоторых экологических факторов на биоокислительные процессы в нефтесодержащих сточных водах / В.В. Изжеурова, Н.И. Павленко, Л.М. Хенкина // Химия и технология воды. – 1993. – Т. 15, № 5. – С. 393-397.
60. Изменение липидного состава клеток R- и S-вариантов *Rhodococcus erythropolis* при длительном хранении на лабораторной среде / Т.В. Коронелли [и др.] // Микробиология. – 1998. – Т. 67, № 5. – С. 718-720.
61. Ильина, Е.Г. Разработка технологии биоочистки нефтяных и буровых отходов: дис. ... канд. тех. наук: 03.00.23 / Ильина Елена Геннадьевна. – Уфа, 2002. – 185 с.
62. Инешина, Е.Г. Санитарная микробиология / Е.Г. Инешина, С.В. Гомбоева. – Улан-Удэ: ВСГТУ, 2006. – 45 с.
63. Исламов, Х.М. Геоэкологическая безопасность применения химических реагентов для обработки буровых растворов / Х.М. Исламов // Геология, география и глобальная экология. – 2011. – № 3. – С. 174-179.
64. ИСО 11268-1 Определение загрязнения по острой летальной токсичности у земляных червей. Международный стандарт. – М., – 1998. – 7 с.
65. Использование бактерий *Azotobacter* при биоремедиации нефтезагрязненных почв / Н.Б. Градова [и др.] // Прикл. биохим. и микробиол. – 2003. – Т. 39, № 3. – С. 318-321.
66. Использование биотестирования для контроля токсичности компонентов буровых растворов и бурового шлама / М.Н. Саксонов [и др.] // Нефть и газ. – 2008. – №6. – С. 32-38.
67. Исследование способности нефтеокисляющих бактерий утилизировать углеводороды нефти / Ф.М. Хабибулина [и др.] // Биотехнология. – 2002. – № 6. – С. 57-62.

68. Кабиров, Р.Р. Разработка и использование многокомпонентной тест-системы для оценки токсичности почвенного покрова городской территории / Р.Р. Кабиров, А.Р. Сагитова, Н.В. Суханова // Экология. – 1997. – № 6. – С. 45-48.
69. Калашник, Н.А. Биоиндикация токсичности буровых отходов после их очистки микробиологическим способом / Н.А. Калашник, В.Б. Барахнина // Вестник Оренбург. гос. ун-та. Спецвыпуск по мат. IV Всерос. науч.-практ. конф. «Проблемы экологии Южного Урала». – 2009. – № 5. – С. 449-451.
70. Калюжин, В.А. Очистка грунта и воды от органических присадок к буровым растворам при помощи аборигенной культуры микроорганизмов / В.А. Калюжин // Вестник Томск. гос. ун-та. – 2009. – № 325. – С. 174-175.
71. Камнев, А.А. Эндофитный и эпифитный штаммы *Azospirillum brasilense* по-разному отвечают на стресс, вызываемый тяжелыми металлами / А.А. Камнев, А.В. Тугарова, Л.П. Антонюк // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 6. – С. 908-911.
72. Капелькина, Л.П. Биотестирование как интегральный метод оценки нефтезагрязненных почв и буровых шламов / Л.П. Капелькина, Т.В. Бардина, М.В. Чугунова // Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред: Тез. докл. междунар. конф. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. – С. 89.
73. Капотина, Л.Н. Способ очистки объектов окружающей среды от нефти и масел / Л.Н. Капотина, Г.Н. Марщаклова, С.А. Дедовец // Экологические системы и приборы – 2001. – № 7. – С. 67-68.
74. Караулов, А.К. Автомобильные масла. Моторные и трансмиссионные. Ассортимент и применение / А.К. Караулова, Н.Н. Худолий. – Курск: Радуга, 2000. – 436 с.
75. Киреева, Н.А. Разнообразие спорообразующих микроорганизмов в условиях нефтяного загрязнения почвы / Н.А. Киреева, Г.Ф. Рафикова // Тез. междунар. конф. «Микроорганизмы и биосфера». – Москва, 2007. – С. 58-59.
76. Классификация и диагностика почв СССР. – М.: Колос, 1977. – 220 с.

77. Ключанова, М.А. Разработка основы биопрепарата для деградации нефти при загрязнении природных сред: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Ключанова Мария Александровна. – Уфа, 2009. – 29 с.
78. Ковальчук, Л.В. Стимуляция микрофлоры углеводородозагрязненных почв консорциумом нефтеокисляющих микроорганизмов / Л.В. Ковальчук, В.Г. Алехин, А.И. Фахрутдинов // Биология: Теория, практика, эксперимент: Мат. междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения д-ра. биол. наук, проф. Сапожниковой Е.В. – Саранск, 2008. – Кн. 2. – С. 213-216.
79. Козак, Н.В. Поведенческие реакции рыб при действии буровых растворов и их компонентов / Н.В. Козак, Ю.Б. Проценко // Тр. 1 всесоюз. конф. по рыбохозяйственной токсикологии. – Рига, 1988. – С. 88-89.
80. Кондакова, Г.В. Особенности функционирования микроорганизмов в подземной гидросфере / Г.В. Кондаков, О.В. Иванова // Стратегия взаимодействия микроорганизмов с окружающей средой: Мат. второй регион. конф. молодых ученых. – Саратов: Научная книга, 2004. – С. 41-42.
81. Колесников, С.И. Биодиагностика экологического состояния почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами / С.И. Колесников, К.Ш. Казеев, В.Ф. Вальков. – Ростов-на-Дону: Изд-во Ростиздат, 2007. – 192 с.
82. Комплексный метод восстановления нефтешламов / В.С. Овсянникова [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. – 2013. – Т. 21, № 2. – С. 165-172.
83. Конон, А.Д. Очистка экосистем от нефтяных загрязнений при помощи клеток и поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* К-8 / А.Д. Конон, А.А. Боровик, Н.А. Гриценко // Сб. науч. тр. 5-ой Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием «Экологические проблемы промышленных городов». – Саратов: Изд-во Наука, 2011. – С. 129-132.
84. Король, В.В. Утилизация отходов бурения скважин / В.В. Король, Г.Н. Позднышев, В.Н. Манырин // Экология и промышленность России. – 2005. – № 1. – С. 40-42.

85. Коронелли, Т.В. Экологическая стратегия бактерий, использующих гидрофобный субстрат / Т.В. Коронелли, Е.Д. Нестерова // Микробиология. – 1990. – Т. 59, № 6. – С. 993-997.
86. Коронелли, Т.В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводов в окружающей среде / Т.В. Коронелли // Прикл. биохимия и микробиол. – 1996. – Т. 32, № 6. – С. 579-586.
87. Коскова, Л.А. Токсичность синтетических поверхностно-активных веществ и моющих средств для водных животных / Л.А. Коскова, В.И. Козловская // Гидробиологический журнал. – 1979. – Т. 15, № 1. – С. 77-84.
88. Кофман, Д.И. Термическое уничтожение и обезвреживание отходов / Д.И. Кофман, М.М. Востриков. – СПб.: НПО «Профессионал», 2013. – 340 с.
89. Кремлева, Е.П. Эколого-физиологическое оценка влияния формальдегида на древесные растения / Е.П. Кремлева // Экологические проблемы западного региона Беларуси: Сб. науч. статей. – Гродно: ГрГУ, 2007. – С. 300-302.
90. Крючков, В.Н. Оценка влияния отходов бурения на гидробионтов / В.Н. Крючков, А.А. Курапов // Вестник Астрахан. гос. тех. ун-та. Серия: Рыбное хозяйство. – 2012. – № 1. – С 61-65.
91. Кузнецова, В.А. Влияние температуры на развитие микроорганизмов из заводняемых пластов Ромашкинского нефтяного месторождения / В.А. Кузнецова, В.М. Горленко // Микробиология. – 1965. – Т. 34, № 2. – С. 329-334.
92. Кузнецов, А.Е. Научные основы экобиотехнологии / А.Е. Кузнецов, Н.Б. Градов. – М.: Мир, 2006. – 504 с.
93. Кузьмина, Л.Ю. Аэробные спорообразующие бактерии – продуценты биоэмульгаторов для процессов биоремедиации / Л.Ю. Кузьмина, Г.Э. Актуганов // Вестник ОГУ: Мат. IV Всерос. науч.-практ. конф. «Проблемы экологии Южного Урала». – Пермь: Изд-во ПГУ, 2009. – С. 479-481.
94. Куюкина, М.С. Адгезионная активность клеток родококков в отношении жидких углеводов / М.С. Куюкина, Е.В. Рубцова, И.Б. Ившина //

- Микроорганизмы и биосфера: Мат. междунар. науч. конф. – М.: МАКС Пресс, 2007. – С. 76-78.
95. Лабинская, А.С. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская, Л.П. Блинкова, А.С. Ещина. – М.: Изд-во Медицина, 2004. – 600 с.
96. Лесюк, И.И. Оценка чувствительности рыб в различные периоды онтогенеза к действию некоторых ПАВ / И.И. Лесюк // 1 всесоюз. конф. по рыбохозяйственной токсикологии. – Рига: Изд-во РГУ, 1988. – С. 26-27.
97. Лисовицкая, О.В. Фитотестирование: основные подходы, проблемы лабораторного метода и современные решения / О.В. Лисовицкая, В.А. Терехова // Докл. по экологическому почвоведению. – 2010. – № 1. – С. 1-18.
98. Логинов, О.Н. Биопрепарат «Ленойл» на основе микроорганизмов-нефтедеструкторов / О.Н. Логинов, Е.А. Данилова, Т.Ф. Бойко // Химические реактивы, реагенты и процеммы малотоннажной химии: Тез. докл. междунар. конф. – Уфа: Изд-во УГУ, 2002. – С. 179-180.
99. Лозановская, Н.И. Экология и охрана биосферы при химическом загрязнении / Н.И. Лозановская, Д.С. Орлов, Л.К. Садовников. – М.: Высшая школа, 1998. – 287 с.
100. Майстренко, В.Н. Эколого-аналитический мониторинг стойких органических загрязнителей / В.Н. Майстренко, Н.А. Ключев. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2004. – 323 с.
101. Максимова, С.В. Биотестирование почвогрунтов при разном содержании фосфорно-калийных компонентов и засолении по реакции дождевых червей *Aporrectodea rosea* / С.В. Максимова, А.В. Степачев, Д.Б. Домашнев // Бюллетень Моск. общества испытателей природы. – 2009. – Т. 114, № 3. – С. 46-50.
102. Маячкина, Н.В. Особенности биотестирования почв с целью их экотоксикологической оценки / Н.В. Маячкина, М.В. Чугунова // Вестник Нижегород. ун-та им. Н.И. Лобачевского. – 2009. – № 1. – С. 84-93.

103. Мельников, Д.А. Распределение признаков деградации углеводов среди гетеротрофной микрофлоры, выделенной из почвы и нефтешламов / Д.А. Мельников, Э.В. Карасева // Политематический сетевой электронный науч. журнал КубГАУ. – 2005. – № 2. – С. 1-13.
104. Меремкулова, Р.Н. Методические указания к лабораторным и практическим занятиям студентам аграрного института / Р.Н. Меремкулова, Ф.Н. Саитова, О.В. Абалмасова. – Черкесск: Изд-во ЧГУ, 2010. – 46 с.
105. Метаногенез в высокоминерализованных пластовых водах Бондюжского нефтяного месторождения / И.А. Борзенков [и др.] // Микробиология. – 1997. – Т. 66, № 1. – С. 122-129.
106. Методические указания по санитарно-микробиологическому исследованию почвы. Утв. Минздравом СССР 19.02.1981 № 2293-81.
107. Методы общей бактериологии. В 3-х Т. / Под ред. Ф. Герхардта. – М.: Мир, 1984. – 81 с.
108. Микроорганизмы, разлагающие нефтяные углеводороды при пониженной температуре / Т.Ю. Коршунова [и др.] // Известия Уфим. науч. центра РАН. – 2012. – № 3. – С. 76-82.
109. Милехина, Е.И. Эколого-физиологические особенности аэробных эубактерий из нефтяных месторождений Татарстана / Е.И. Милехина, И.А. Борзенков, И.С. Звягинцев // Микробиология. – 1998. – Т. 67, № 2. – С. 208-214.
110. Миннигалимов, Р.З. Совершенствование технологии переработки нефтяных шламов / Н.Р. Миннигалимов, Р.А. Нафикова // Экологическая и промышленная безопасность. – 2008. – №4. – С. 105-107.
111. Милько, Е.С. Гетерогенность популяций бактерий и процесс диссоциации / Е.С. Милько, Н.С. Егоров. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 144 с.
112. Митусова, Т.Н. Современные дизельные топлива и присадки к ним / Т.Н. Митусова, Е.В. Полина, М.В. Калинина. – М.: Изд-во Техника, 2002. – 64 с.
113. Михайлова, Л.В. Некоторые реакции бентосной олигохеты лимнодрилус гофмейстери на токсические воздействия / Л.В. Михайлова, В.Б. Касинов //

- Тр. 5 всесоюз. конф. по общей токсикологии. – Одесса: Изд-во ОГУ, 1988. – С. 137-138.
114. Мовсумов, А.Д. Исследование токсичности химических реагентов, применяемых при бурении, и пути их нейтрализации / А.Д. Мовсумов, Г.И. Гусейнов // Газовая промышленность. – 1986. – № 3. – С. 117.
115. Мойсейченко, Г.В. Резистентность молоди лососёвых и их кормовой базы к воздействию буровых компонентов / Г.В. Мойсейченко, В.Д. Абрамов // Мат. V Всерос. совещания по систематике, биологии и разведению лососевых рыб. – С.: Изд-во Мир, 1994. – С. 126-127.
116. Морозов, В.И. Экологические проблемы освоения нефтегазового потенциала Восточной Сибири и Дальнего Востока / В.И. Морозов, А.В. Федоров, Г.М. Гейшерик // Минеральные ресурсы России. Экономика и управление. – 2004. – № 1. – С. 64-73.
117. Муратова, А.Ю. Микробная деструкция минеральных масел: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Муратова Анна Юрьевна. – Саратов, 1997. – 187 с.
118. Муратова, А.Ю. Растительно-микробные ассоциации в условиях углеводородного загрязнения: автореф. дис. ... д-ра. биол. наук: 03.00.07 и 03.01.06 / Муратова Анна Юрьевна. – Саратов, 2013. – 47 с.
119. Мязин, В.А. Разработка способов повышения эффективности биоремедиации почв кольского севера при загрязнении нефтепродуктами (в условиях модельного эксперимента): дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Мязин Владимир Александрович. – Апатиты, 2014. – 159 с.
120. Назаров, А.В. Изучение причин фитотоксичности нефтезагрязненных почв / А.В. Назаров, С.А. Иларионов // Письма в междунар. науч. журнал «Альтернативная энергетика и экология». – 2005. – № 1. – С. 60-65.
121. Назина, Т.Н. Филогенетическое разнообразие и активность анаэробных микроорганизмов высокотемпературных горизонтов нефтяного месторождения Даган (КНР) / Т.Н. Назина, Н.М. Шестаков, А.А. Григорьян // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 1. – С. 70-81.

122. Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук. – М.: Изд-во Академия, 2005. – 608 с.
123. Нетрусов, А.И. Микробиология / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – М.: Изд-во Академия, 2006. – 565 с.
124. Нефтеокисляющий штамм *Rhodococcus erythropolis* В2 как основа создания биопрепарата для ликвидации углеводородных загрязнений и рекультивации земель [Электронный ресурс] / Э.В. Карасева [и др.] // Науч. журнал КубГАУ. – 2012. – № 83. – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2012/09/pdf/34.pdf>.
125. Никитина, Е.В. Физиологическое состояние микроорганизмов нефтехимического шлама / Е.В. Никитина, О.И. Якушева, А.В. Гарусов // Стратегия взаимодействия микроорганизмов с окружающей средой: Мат. второй регион. конф. молодых ученых. – Саратов: Изд-во «Научная книга», 2004. – С. 47-48.
126. Никитина, Е.В. Биоремедиация отходов нефтехимического производства с использованием компостирования / Е.В. Никитина, О.И. Якушева, А.В. Гарусов // Биотехнология. – 2006. – № 1. – С. 53-61.
127. Никовская, Г.Н. Гидрофильно-гидроофобные свойства микроорганизмов при различных условиях культивирования / Г.Н. Никовская, А.С. Гордиенко, Л.Н. Глоба // Микробиология. – 1989. – Т. 58, № 3. – С. 448-451.
128. Николаев, А.Я. Биологическая химия / А.Я. Николаев. – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – 565 с.
129. Оборин, А.А. Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем / А.А. Оборин, И.Г. Калачникова, Т.А. Масливец. – М.: Наука, 1988. – С. 140-159.
130. Овсеенко, Ю.В. Изучение обмена кальция, фосфора и магния у лактирующих коров: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.13 / Овсеенко Юрий Валентинович. – М., 1983. – 154 с.
131. Определитель бактерий Берджи: В 2 т. / Дж. Хоулт., Н. Криг, П. Снит и др. – М.: Мир, 1997. – 1232 с.
132. О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения: [федер. закон: принят Гос. думой 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ с изменениями от 30.12.2001 г.,

- 10.01.2003 г., 30.06.2003 г., 22.0.2004 г., 09.05.2005 г.] – С.-Пб.: Изд-во «Деан», 2005. – 10 с.
133. Остроумов, С.А. Некоторые аспекты оценки биологической активности ксенобиотиков / С.А. Остроумов // Вестник Моск. ун-та. Сер. 16, Биология. – 1990. – № 2. – С. 27-34.
 134. Остроумов, С.А. Биологическая активность вод, содержащих ПАВ / С.А. Остроумов // Химия и технология воды. – 1991. – Т. 13, №. 3. – С. 270-283.
 135. Оценка гидрофобных свойств бактериальных клеток по адсорбции на поверхности капель хлороформа / Е.В. Серебрякова [и др.] // Микробиология. – 2002. – Т. 71, № 2. – С. 237-239.
 136. Панов, А.В. Изменение состава сообществ бактерий-деструкторов в условиях загрязнения устойчивыми органическими соединениями: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.13 / Панов Андрей Владимирович. – Пушино, 2013. – 24 с.
 137. 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.
 138. Пат. 2191643 Российская Федерация, МПК: B09C1/10 C12N1/20 C12N1/20 C12R1:01. Способ очистки почвы от загрязнений нефтью и нефтепродуктами / Саксонов В.М., [и др.]; заявитель и патентообладатель Закрытое акционерное общество «Полиинформ». – N 2001119562/13; заявл. 09.07.2001; опубл. 27.10.2002.
 139. Пат. 2193533 Российская Федерация, МПК: C02F3/34 C12R1:32 B09C1/10 C12N1/20 C12N1/20 C12R1:01 C12N1/20. Биопрепарат для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов / Чугунов В.А., [и др.]; заявитель и патентообладатель Государственный научный центр прикладной микробиологии. – N 99120414/13; заявл. 27.09.1999; опубл. 27.11.2002.
 140. Пат. 2058737 Российская Федерация, МПК: A01K67/033 C05F11/00 C05F17/00. Способ получения технологических (специализированных) пород компостного дождевого червя *Eisenia foetida* / Игонин А.М.; заявитель и

- патентообладатель Игонин А.М. – N 5025888/15; заявл. 29.10.1991; опубл. 27.04.1996.
141. Пат. 2228953 Российская Федерация, МПК: C12N1/20 C02F3/34 B09C1/10 C12N1/20 C12R1:38. Штамм бактерий *Pseudomonas Alcaligenes* MEV, используемый для очистки почв, грунтовых и поверхностных вод от нефти и продуктов ее переработки / Марченко А.И., [и др.]; заявитель и патентообладатель Научно-исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов. – N 2002122613/132002122613/13; заявл. 23.08.2002; опубл. 20.05.2004.
 142. Пат. 2340647 Российская Федерация, МПК: C09K8/20 B09B3/00 C12N1/14. Способ очистки отработанных буровых растворов от нефти и полимерных реагентов / Ягафарова Г.Г., [и др.]; заявитель и патентообладатель Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уфимский государственный нефтяной технический университет». – N 2006138249/03; заявл. 14.10.2009; опубл. 28.08.2013.
 143. Патин, С.А. Добыча нефти и газа на морском шельфе: эколого-рыбохозяйственный анализ / С.А. Патин // Рыбное хозяйство. – 1994. – № 5. – С. 30-33.
 144. Первый опыт проектирования в России установки по закачке буровых отходов в пласт / Г.П. Любин [и др.] // Нефтяное хозяйство. – 2009. – № 9. – С. 66-67.
 145. Петерсон, А.М. Практические рекомендации для индификации сапрофитных и условно-патогенных бактерий по фенотипическим признакам / А.М. Петерсон, П.А. Чиров. – Саратов: Изд-во Саратовского ун-та, 2005. – 24 с.
 146. Печуркин, Н.С. Смешанные проточные культуры микроорганизмов / Н.С. Печуркин. – Новосибирск: Наука, 1981. – 200 с.
 147. Пиковский, Ю.И. Природные и техногенные потоки углеводородов в окружающей среде / Ю.И. Пиковский. – М.: Изд-во МГУ, 1993. – 208 с.
 148. Плешакова, Е.В. Деградация минерального масла штаммом *Acinetobacter calcoaceticus* / Е.В. Плешакова, А.Ю. Муратова, О.В. Турковская // Прикл. биохим. и микробиол. – 2001. – Т. 37, № 4. – С. 398-405.

149. Плешакова, Е.В. Сравнение эффективности интродукции нефтеокисляющего штамма *Dietzia maris* и стимуляции естественных микробных сообществ для ремедиации загрязненной почвы / Е.В. Плешакова, Е.В. Дубровская, О.В. Турковская // Прикл. биохим. и микробиол. – 2008. – Т. 44, № 4. – С. 430-437.
150. Плешакова, Е.В. Нефтеокисляющий штамм *Dietzia maris* и возможности его использования для биоремедиации загрязненной почвы / Е.В. Плешакова, Л.Ю. Матора, О.В. Турковская // Вестник МГОУ. Серия Естественные науки. – 2010. – № 4. – С. 82-89.
151. Плотникова, Е.Г. Бактерии-деструкторы ароматических углеводов и их хлорпроизводных: разнообразие, особенности метаболизма, функциональная геномика: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.02.03 / Плотникова Елена Генриховна. – Пермь, 2010. – 39 с.
152. Полонский, В.И. Экспресс-метод оценки фитотоксичности почвы, загрязненной нефтью / В.И. Полонский, Д.Е. Полонская // Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред: Тез. докл. междунар. конф. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. – С. 89.
153. Пономарев, В.Т. Очистка сточных вод нефтеперерабатывающих заводов / В.Т. Пономарев, Э.Г. Иоакилин, И.Л. Мошайт. – М.: Химия, 1985. – 255 с.
154. Приказ № 511 Об утверждении критериев отнесения опасных отходов к классу опасности для окружающей природной среды. МПР России от 15.06.2001.
155. Разработка, опыт применения и перспективы повторного использования инвертно-эмульсионных буровых растворов / О.В. Гаршина [и др.] // Бурение скважин. – 2011. – № 10. – С. 56-59.
156. РД 52.18.647-2003. Методические указания определение массовой доли нефтепродуктов в почвах. Методика выполнения измерений гравиметрическим методом / Разр. «Тайфун». Утв. Росгидрометом 18.03.2003. Введен. 01.06.2003. – 16 с.
157. Розанова, Е.П. Микрофлора нефтяных месторождений / Е.П. Розанова, С.И. Кузнецова. – М.: Наука. – 1974. – 197 с.

158. Розанова, Е.П. Углевородоксиляющие бактерии и их активность в нефтяных пластах / Е.П. Розанова, Т.Н. Назина // Микробиология. – 1982. – Т. 51, № 2. – С. 342-348.
159. Романов, В.В. Биотестирование экологического состояния почв несанкционированных свалок ТБО на территории Ульяновской области / В.В. Романов, В.Н. Любовирова // Вестник Ульянов. гос. сельскохозяйственной академии. – 2009. – № 2. – С. 72-75.
160. Ротмистров, М.Н. Микробиологическая очистка воды / М.Н. Ротмистров, П.И. Гвоздяк, С.С. Ставская. – Киев: Наукова думка, 1978. – 265 с.
161. Рыбальский, Н.П. Биотехнологический потенциал консорциумов микроорганизмов в народном хозяйстве / Н.П. Рыбальский, С.П. Лях. – М.: ВНИИПИ, 1990. – 200 с.
162. Рыбина, Г.Е. Токсичность буровых шламов разного состава нефтепромыслов Западной Сибири для пресноводных гидробионтов: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.18 / Рыбина Галина Евгеньевна. – Борок, 2004. – 184 с.
163. Рядинский, В.Ю. Способы утилизации буровых отходов / В.Ю. Рядинский, Ю.В. Денеко // Горные ведомости. – 2004. – № 4. – С.82-90.
164. Рязанов, Я.А. Энциклопедия по буровым растворам / Я.А. Рязанов. – Оренбург: Изд-во «Летопись», 2005. – 664 с.
165. Саблина, И.Ф. Влияние различных концентраций нефти на скорость развития культур морских водорослей / И.Ф. Саблина // Тр. 1 всесоюз. конф. по рыбохозяйственной токсикологии. – Рига: Изд-во РГУ, 1988. – С. 105-112.
166. Садовникова, Л.К. Экология и охрана окружающей среды при химическом загрязнении: Учеб. пособие. 3-е изд. перераб / Л.К. Садовникова. – М: Высшая школа, 2006. – 334 с.
167. Саксонов, М.Н. Изменение уровня флуоресценции хлорофилла водорослей при действии ряда ароматических углеводородов и дизельного топлива / М.Н. Саксонов // Современные проблемы безопасности жизнедеятельности «Безопасность-09»: Мат. докл. XIV Всерос. студ. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Иркутск: Изд-во ИрТГУ, 2009. – С. 264.

168. Саксонов, М.Н. Определение класса опасности отходов методами биотестирования / М.Н. Саксонов, А.Э. Балаян, О.А. Бархатова // Известия Иркутской государственной экономической академии. – 2011. – № 1. – С. 21-23.
169. Самков, А.А. Взаимосвязь конвективного переноса углеводородоокисляющих микроорганизмов со степенью гидрофобности клеток и эффективностью биоремедиации / А.А. Самков, Э.В. Карасева // Биотехнология. – 2007. – № 4. – С. 69-75.
170. Сваровская, Л.И. Активность почвенной микрофлоры в условиях нефтяных загрязнений / Л.И. Сваровская, Л.К. Алтунина // Биотехнология. – 2004. – № 3. – С. 63-69.
171. Светличная, Т.В. Оценка экологической опасности тонкодисперсных фракций бурового шлама и разработка методов обращения с отходами бурения при освоении месторождений нефти и газа Дагестанского участка Каспийского моря: автореф. дис. ... канд. геол-минерал. наук: 25.00.36 / Светличная Татьяна Вячеславовна. – М., 2004. – 182 с.
172. Свойства углеводородоокисляющих бактерий, изолированных из нефтяных месторождений Татарстана, Западной Сибири и Вьетнама / И.А. Борзенков [и др.] // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 1. – С. 82-89.
173. Селивановская, С.Ю. Создание тест-системы для оценки токсичности многокомпонентных образований, размещаемых в природной среде / С.Ю. Селивановская, В.З. Латыпова // Экология. – 2004. – № 1. – С. 21-24.
174. Семенова, В.В. Влияние слабого и сверхслабого магнитных полей на эшерихии / В.В. Семенова // Экологические проблемы западного региона Беларуси: Сб. науч. статей / Под общ. ред. проф. Е.П. Кремлёва. – Гродно: ГрГУ, 2007. – С. 305-308.
175. Смирнова, Т.С. Разработка способов получения содержащих органофильные глины технических продуктов с улучшенными экологическими свойствами: автореф. дис. ... канд. тех. наук: 03.02.08 / Смирнова Татьяна Сергеевна. – М., 2011. – 171 с.

176. Соловьев, А.Я. Совершенствование качества буровых эмульсионных растворов применением реагентов комплексного действия: дис. ... канд. тех. наук: 25.00.15 / Соловьев Александр Янович. – Уфа, 2003. – 241 с.
177. Сопрунова, О.Б. Особенности функционирования альго-бактериальных сообществ техногенных экосистем: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.16 / Сопрунова Ольга Борисовна. – М., 2005. – 432 с.
178. Справочник биохимика / Под ред. Р. Досон, Д. Элиот. – М.: Мир, 1991. – 543 с.
179. Стабникова, Е.В. Выбор активного микроорганизма-деструктора углеводов для очистки нефтезагрязненных почв / Е.В. Стабникова, М.В. Селезнева, О.Н. Рева // Прикл. биохим. и микробиол. – 1995. – Т. 31, № 5. – С. 534-539.
180. Ставская, С.С. Биологическое разрушение анионных поверхностно-активных веществ / С.С. Ставская. – Киев: Наукова думка, 1981. – 185 с.
181. Суржко, Л.Ф. Утилизация нефти в почве и воде микробными клетками / Л.Ф. Суржко, З.И. Финкельштейн, Б.П. Баскунов // Микробиология. – 1995. – Т. 64, № 3. – С. 393-399.
182. Сушкова, А.В. Разработка низкотоксичного и биоразлагаемого бурового раствора на основе олигомеров этилена: дис. ... канд. техн. наук: 03.00.16 / Сушкова Анна Владимировна. – М., 2005. – 191 с.
183. Ферментативная активность выщелоченных черноземов восточного закамья волжско-камской степи при синергетическом загрязнении тяжелыми металлами и углеводородами / Д.И. Тазетдинов [и др.] // Биологические науки. – 2013. – № 8. – С. 364-369.
184. Таран, Д.О. Методы биотестирования в контроле токсичности и детоксикации нитробензола: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08 / Таран Дмитрий Олегович. – Иркутск, 2012. – 21 с.
185. Таран, Д.О. Оценка токсичности и детоксикации образцов почв, содержащих ароматические углеводороды методами биотестирования / Д.О. Таран, М.Н. Саксонов, О.А. Бархатова // Биодиагностика в экологической оценке почв и

- сопредельных сред: Тез. докл. междунар. конф. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. – С. 204.
186. Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. – М.: Изд-во «Колос», 1993. – 175 с.
 187. Терехова, В.А. Проверка безопасности искусственных почвогрунтов из органосодержащих отходов / В.А. Терехова // Экология производства. – 2010. – № 2. – С. 56-60.
 188. Термофильные углеводородокисляющие бактерии из нефтяных пластов / Т.Н. Назина [и др.] // Микробиология. – 1993. – Т. 62, № 3. – С. 583-592.
 189. Технология биологической обработки, обезвреживания и утилизации нефтезагрязненных и нефтешламовых амбаров / О.А. Дуброва [и др.] // Прикаспийский Вестник. – 2010. – № 4. – С. 43-44.
 190. Тиунов, А.В. Метабиоз в почвенной системе: влияние дождевых червей на структуру и функционирования почвенной биоты: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.16 / Тиунов Алексей Владимирович. – М., 2007. – 208 с.
 191. Токсикологическая химия / Под. ред. Т.В. Плетневой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 512 с.
 192. Торопова, Е.Г. Бактерии, разрушающие технические масла / Е.Г. Торопова, Г.В. Матюшина, А.А. Белоусова // Микробиология. – 1986. – Т. 55, Вып. 3. – С. 526-527.
 193. Фенотипическая характеристика алканотрофных родококков из различных экосистем / И.Б. Ившина [и др.] // Микробиология. – 1995. – Т. 64, № 4. – С. 507-513.
 194. Ферментативная активность выщелоченных черноземов восточного закамья волжско-камской степи при синергетическом загрязнении тяжелыми металлами и углеводородами / Д.И. Тазетдинов [и др.] // Биологические науки. – 2013. – № 8. – С. 364-369.
 195. Фриман, М. Сущность и использование традиционных экологических знаний. Перспективы Севера / М. Фриман // Комитет по ресурсам Канадской Арктики (на англ. яз.). Оттава Канада, 1999. – С. 68.

196. Хаустова, А.П. Охрана окружающей среды при добыче нефти / А.П. Хаустова, М.М. Редина. – М.: Дело, 2006. – 552 с.
197. Хранение штаммов промышленных микроорганизмов, включенных в полимерные матрицы / А.Ю. Федоров [и др.] // Прикл. биохимия и микробиол. – 2000. – Т. 36, № 1. – С. 59-67.
198. Худокормов, А.А. Деструкция углеводов различными морфотипами нефтеокисляющих актинобактерий [Электронный ресурс] / А.А. Худоркомов, Э.В. Карасева, А.А. Самков // Научный журнал КубГАУ. – 2013. – № 8. – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2012/09/pdf/33.pdf>.
199. Шарипов, А.У. Проектирование и регулирование основных показателей бурения глубоких скважин / А.У. Шарипов. – М.: ВНИИОЭНГ, 1995. – 280 с.
200. Шарипова, Г.Ж. Создание коллекции микроорганизмов деструкторов нефти / Г.Ж. Шарипова // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – № 4. – С. 20-23.
201. Шепило, В.Ю. Влияние углеводов и тяжелых металлов на некоторые звенья метаболизма головастиков шпорцевой лягушки (*Xenopus Laevis*): дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16 / Шепило Владимир Юрьевич. – Ростов-на-Дону, 2002. – 105 с.
202. Шишов, В.А. Обезвреживания нефтесодержащих шламов / В.А. Шишов, В.Ю. Шеметов, А.А. Чивяга // Бурение. – 1982. – № 2. – С. 35-37.
203. Экологическая оценка нефтезагрязненных почв Казахстана по откликам стандартных биотест-систем / С.Т. Ибрагимов [и др.] // Докл. по экологическому почвоведению. – 2009. – Вып. 11, № 1. – С. 79-94.
204. Экотоксикологическая оценка биосорбента нефти с целью сертификации / В.А. Терехова [и др.] // Экология и промышленность России. – 2006. – № 3. – С. 34-37.
205. Ягафарова, Г.Г. Биотехнологический способ утилизации нефтешламов и буровых отходов / Г.Г. Ягафарова, М.Р. Мавлютов, В.Б. Баряхнина // Горный вестник. – 1998. – № 4. – С. 43-46.
206. Ягафарова, Г.Г. Утилизация экологически опасных буровых отходов / Г.Г. Ягафарова, В.Б. Баряхнина // Нефтегазовое дело. – 2006. – № 2. – С. 48-61.

207. Янг, С. Высокоэффективный водный буровой раствор улучшает результаты / С. Янг, Г. Рамсес // Нефтегазовые технологии. – 2006. – № 8. – С. 11-12.
208. Янева, О.Д. Механизмы устойчивости бактерий к ионам тяжелых металлов / О.Д. Янева // Микробиология. – 2009. – Т. 71, № 6. – С. 54-65.
209. Яскович, Г.А., Характеристика гидрофобности поверхности клеток микроорганизмов / Г.А. Яскович, Г.Э. Елькин // Микробиология. – 1995. – Т. 64, № 1. – С. 137-139.
210. Яскович, Г.А. Изучение гидрофобности поверхности штаммов клеток бактерий / Г.А. Яскович, Е.П. Яковлева // Микробиология. – 1996. – Т. 65, № 4. – С. 569-571.
211. Яскович, Г.А. Роль гидрофобности клеточной поверхности в адсорбционной иммобилизации штаммов бактерий / Г.А. Яскович // Прикл. биохим. и микробиол. – 1998. – Т. 34, № 4. – С. 410-413.
212. Ястребова, О.В. Галотолерантные бактерии деструкторы полициклических ароматических углеводородов рода *Artrobacter* / О.В. Ястребова, Е.Г. Плотникова // Вестник Пермск. ун-та. – 2007. – Т. 5, № 10. – С. 100-101.
213. Ability of indigenous *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* in microbial enhanced oil recovery / S. Haghighat [et al.] // Intern. J. Syst. Bacteriol. – 2008. – Vol. 1. – P. 385-390.
214. A *Rhodococcus* species that thrives on medium saturated with liquid benzene / M. Luz [et al.] // Microbiology. – 1997. – Vol. 7. – P. 2975-2981.
215. Achazi, R.K. Invertebrates in risk assessment development of a test battery and of short term biotests for ecological risk assessment of soil / R.K. Achazi // J. Soil Contaminat. – 2002. – Vol. 2, N 4. – P. 174-178.
216. Adam, G. Effect of diesel fuel on growth of selected plant species / G. Adam, H.J. Duncan // Environ. Geochem. and Health. – 1999. – Vol. 21. – P. 353-357.
217. Bacterial community dynamics during biostimulation and bioaugmentation experiments aiming at chlorobenzene degradation in groundwater / D.F. Wenderoth [et al.] // Microbiol. Ecol. – 2003. – N 6. – P. 137-148.

218. Bailey, W. J. A Generalized and consistent pressure drop and flow regime transition model for drilling / W.J. Bailey, J.M.A. Peden // SPE Drilling&Completion. – 2000. – Vol. 15, N 1. – P. 22-23.
219. Bashan, Y. *Azospirillum*-plant relationships: agricultural, physiological, molecular and environmental advances / Y. Bashan, G. Holguin, L.E. De-Bashan // Can. J. Microbiol. – 2004. – Vol. 50. – P. 521-577.
220. Bayoumi, R.A. Microbial production of biosurfactants from some El-Korma Governorate microbial isolates for bioremediation of crude oil spills in the different environments / R.A. Bayoumi, H.A. Atta, M.A. El-Sehrawey // J. Appl. Sci. – 2011. – Vol. 1, N 10. – P. 1541-1555.
221. Beilen, J.B. Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications / J.B. Beilen, E.G. Funhoff // Curr. Opinion in Biotechnol. – 2005. – Vol. 16, N 3. – P. 308-314.
222. Benka-Coker, M.O. Waste drilling fluid-utilising microorganisms in a tropical mangrove swamp oilfield location / M.O. Benka-Coker, A. Olumagin // Bioresource Technol. – 1995. – N 53. – P. 211-215.
223. Bioavailability of barium to plants and invertebrates in soils contaminated by barite / D.T. Lamb [et al.] // Environ. Sci. and Technol. – 2013. – Vol. 47, N 9. – P. 222-223.
224. Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities / M. Vinas [et al.] // J. Industrial Microbiol. and Biotechnol. – 2002. – Vol. 28. – P. 252-260.
225. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil / F.M. Bento [et al.] // Brazil. J. Microbiol. – 2003. – Vol. 34, N 1. – P. 17-20.
226. Bioremediation of benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes-contaminated soil: a biopile pilot experiment / M. Genoveseva [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 2008. – Vol. 105, N 5. – P. 1694-1702.
227. Blankenship, D.W. Plant growth inhibition by the water extract of a crude oil / D.W. Blankenship, R.A. Larson // Water, Air and Soil Pollut. – 1978. – Vol. 10, N 4. – P. 471-473.

228. Bobra, A.M. Structure-activity relationships for toxicity of hydrocarbons, chlorinated hydrocarbons and oils to *Daphnia magna* / A.M. Bobra, W.Y. Shiu, D. Mackay // Quantitative structure activity relations in environmental toxicology / Ed. Kaiser K.L.E. Dordrecht, Germany: D. Reidel Publishing Co., 1984. – P. 3-16.
229. Buckley, J.S. Effective wettability of minerals exposed to crude oil / J.S. Buckley // Curr. Opinion in Biotechnol. – 2001. – Vol. 6. – P. 191-196.
230. Candler, J.E. Synthetic-based mud systems offer environmental benefits over traditional mud systems / J.E. Candler, J.H. Rushing, A.J. Leuterman // Production Environmental Conference. San Antonio, 1993. – P. 485-499.
231. Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated, complex source of microorganisms / G. Zanaroli [et al.] // Microbiol. Rev. – 2010. – Vol. 9, N 10. – P. 35-38.
232. Characterisation of new *Bacillus circulans* strain isolated from oil shale / D. Vesna [et al.] // Food Techno. Biotechnol. – 2012. – Vol. 50. – P. 123-127.
233. Choi, Y.J. Effects of osmoprotectants on the growth and nitrogenase activity of *Rhizobium* and *Azospirillum* under osmotic stress / Y.J. Choi, S.W. Gal // Agric. Chem. Biotechnol. – 1998. – Vol. 41. – P. 53-59.
234. Christofi, N. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation / N. Christofi, I.B. Ivshina // J. Appl. Microbiol. – 2002. – Vol. 93. – P. 915-929.
235. Comparison of bio-augmentation and composting for remediation of oily sludge: A field-scale study in China / W. Ouyang [et al.] // Process Biochem. – 2005. – Vol. 40. – P. 3763-3768.
236. Cook, K. A rapid method for the detection of nonionic surfactant-degrading microorganisms / K. Cook // J. Bacteriol. – 1978. – Vol. 44, N 2. – P. 299-304.
237. Cooper, D.G. Surface active agents from two *Bacillus* species / D.G. Cooper, B.G. Goldenberg // Appl. Environ. Microbiol. – 1987. – Vol. 53, N 2. – P. 224-229.
238. Cunningham, D. Charm analysis of apple volatiles / D. Cunningham, T. Acree, J. Barnard // Environ. Toxicol. and Chem. – 1986. – N 1. – P. 137-147.

239. Cunningham, C.J. Comparison of bioaugmentation and biostimulation in *ex situ* treatment of diesel contaminated soil / C.J. Cunningham, J.C. Philp // Contamination & Reclamation. – 2000. – Vol. 8, N 4. – P. 261-269.
240. Curtis, G.W. Can Synthetic Based Muds Be Designed to Enhance Soil Quality? / G.W. Curtis // National Drilling Conference on 'Drilling Technology', Houston, Texas, USA, 2013. – P. 55-56.
241. Das, N. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview / N. Das, P. Chandran // Biotechnol. Techniques. – 2011. – Vol. 2. – P. 3-4.
242. Dorn, P.B. Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation / P.B. Dorn, J.P. Salanitro // Chemosphere. – 2000. – Vol. 40. – P. 419-426.
243. Dott, W. Comparison of autochthonous bacteria and commercially available cultures with respect to their effectiveness in fuel oil degradation / W. Dott, D. Feidieker, P. Kampfer // J. Industrial Microbiol. and Biotechnol. – 1989. – Vol. 4, N 5. – P. 365-374.
244. Elder, D. J. The bacterial degradation of benzoic and benzenoid compounds under anaerobic conditions: Unifying trends and new perspectives / D.J. Elder, D.J. Kelly // Microbiol. Rev. – 1994. – Vol. 13. – P. 441–468.
245. Emerson, D.A. The response of microbial populations from oil-brine contaminated soil to gradients of NaCl and sodium p-toluate in diffusion gradient chamber / D.A. Emerson, J.A. Breznac // FEMS Microbiol. Ecol. – 1997. – Vol. 23. – P. 285-300.
246. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil / S. Mishra [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – Vol. 67, N 4. – P. 1675-1681.
247. Fritsche, W. Aerobic degradation by microorganisms in Environmental Processes- Soil Decontamination / W. Fritsche, M. Hofrichter // J. Gen. Microbiol. – 2000. – Vol. 3. – P. 146-155.
248. GESAMP. Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment. GESAMP Reports and Studies IMO. – London, UK. 1993. – 180 p.

249. Ghayyomi, F. Biosurfactan production by *Bacillus* sp. isolated from petroleum contaminated soils of Sirri Island / J. Ghayyomi, F. Forghani, O. Deog-Hwan // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2012. – Vol. 9, N 1. – P. 1-6.
250. Ability of indigenous *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* in microbial enhanced oil recovery / S. Haghighat [et al.] // Intern. J. Syst. Bacteriol. – 2008. – Vol. 1. – P. 385-390.
251. Hawrot, M. Effects of different soil treatments on diesel fuel biodegradation / M. Hawrot, A. Nowak // Pol. J. Environ. Stud. – 2006. – Vol. 15, N 4. – P. 643-646.
252. Heath, D.J. The use of high temperature gas chromatography to study the biodegradation of high molecular weight hydrocarbons / D.J. Heath, C.A. Lewis, S.J. Rowland // Org. Geochem. – 1997. – Vol. 26, N 12. – P. 769-785.
253. Isolation of soil bacteria for bioremediation of hydrocarbon contamination / A. Ilyina [et al.] // Biotechnol. Techniques. – 2003. – Vol. 44, N 1. – P. 88-91.
254. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs / A. Tabatabaee [et al.] // Iranian J. Env. Health Sci. – 2005. – Vol. 2, N 1. – P. 6-12.
255. Isolation of biosurfactant producing bacteria from environmental samples / R.C. Jaysree [et al.] // Process Biochem. – 2011. – Vol. 3. – P. 1427-1433.
256. Jerry, M. Estimation of bioavailability of metals from drilling mud barite / M. Jerry // Intern. J. Syst. Bacteriol. – 2008. – Vol. 4, N 2. – P. 184-193.
257. Jill, S. Wettability and prediction of oil recovery from reservoirs developed with modern drilling and completion fluids / S. Jill // Dept. of Chemical & Petroleum Eng. – 2002. – N 1. – P. 11-19.
258. Jing, W. Isolation and characteristics of a microbial consortium for effectively degrading phenanthrene / W. Jing, X. Hongke, G. Shaohui // Petroleum Sci. – 2007. – Vol. 4, N 3. – P. 68-75.
259. Kanekar, P.P. Bioremediation of phenol by alkaliphilic bacteria isolated from alkaline lake of Lonar, India / P.P. Kanekar, S.S. Sarnaik, A.S. Kelkar // J. Appl Microbiol. – 1999. – Vol. 85. – P. 128-133.

260. Kimira, B. Heavy oil degradation by bacteria isolated from the seawater in oil-polluted bisan seto / B. Kimira, M. Masatada, F. Airoaki // Bull. Environ. Contaminat. and Toxicol. – 1989. – Vol. 55, N 12. – P. 2173-2177.
261. Krahn, M. M. Peer reviewed: Assessing exposure of marine biota and habitats to petroleum compounds / M.M. Krahn, J.E. Stein // Adv. Environ. Res. – 1998. – N 1. – P. 186.
262. Lambert, R.J. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values / R.J. Lambert, J. Pearson // Microbiology. – 2000. – Vol. 88. – P. 784-790.
263. Liu, Y. Evolution of wetting alteration by adsorption from crude oil / Y. Liu // SPEFE. – 1997. – Vol. 12. – P. 5-11.
264. Maltseva, O. Monitoring of an alkaline 2,4,6-trichlorophenol-degrading enrichment culture by DNA fingerprinting methods and isolation of the responsible organism, haloalkaliphilic *Nocardioides* sp. strains M6 / O. Maltseva, P. Oriel // Appl Environ. Microbiol. – 1997. – Vol. 63. – P. 4145-4149.
265. Margesin, R. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments / R. Margesin, F. Schinner // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – Vol. 56. – P. 650-663.
266. Marin, J.A. Bioremediation of oil refinery sludge by land-farming in semiarid conditions: Influence of soil microbial activity / J.A. Marin, T. Hernandez, C. Garcia // Environ. Rev. – 2005. – Vol. 98. – P. 185-195.
267. Matthew, J. The biodegradation of surfactants in the environment / J. Matthew, M. Scott // Abst. of School of biological sciences. – Manchester, UK. 2000. – P. 235-251.
268. McCosh, K. Drilling fluid chemicals and earthworm toxicity / K. McCosh, J. Getliff // 10-th Annual international petroleum environmental conference, MI Drilling Fluids, West Tullos. – Aberdeen, UK. 2003. – P. 32-36.
269. McGuire, T.C. Effects of surfactants on the dechlorination of chlorinated ethenes / T.C. McGuire, J.B. Hughes // Environ. Toxicol. and Chem. – 2003. – Vol. 22, N 11. – P. 131-140.

270. Metal–microbe interactions: contemporary approaches / T.J Beveridge [et al.] // Adv. Microbiol Pol. – 1997. – Vol. 38. – P. 177-243.
271. Minai-Tehrani, D. Biodegradation of aliphatic and aromatic fractions of heavy crude oil-contaminated soil a pilot study bioremediation / D. Minai-Tehrani, A. Herfatmanesh // Biotechnol. Lett. – 2007. – Vol. 11, N 2. – P. 71-76.
272. Mukherjee, S. A review of towards commercial production of microbial surfactants / S. Mukherjee, P. Das, R. Sen // Trends in biotechnology. – 2006. –N 11. – P. 509-515.
273. Nies, D.H. Microbial heavy metal resistance / D.H. Nies // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – Vol. 51. – P. 730-750.
274. Ogbo, E.M. Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants – *Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays* / E.M. Ogbo // Afric. J. Biotechnol. – 2009. – Vol. 8, N 2. – P. 250-253.
275. Okpokwasili, G.C. Effects of drilling fluids on marine bacteria from a Nigerian offshore oilfield / G.C. Okpokwasili, C. Nnubia // Environ. Intern. – 1995. – Vol. 19, N 6. – P. 923-929.
276. Oxidation of petroleum hydrocarbons by extremely halophilic archaeobacteria / I.S. Kulichevskaya [et al.] // Microbiology. – 1992. – Vol. 6. – P. 596-601.
277. Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil: Part II. Impact on ecotoxicity / N. Colfied [et al.] // Intern. J. Phytorem. – 2007. – Vol. 9. – P. 371-384.
278. Plaza, G.A. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated bioremediated soils / G.A. Plaza, I. Zjawiony, I.B. Banat // J. Petrol. Sci. and Engineer. – 2006. – Vol. 50. – P.71-77.
279. Roane, T.M. Microbiol responses to environmentally toxic cadmium / T.M. Roane, I.L. Pepper // Microb. Ecol. – 2000. – Vol. 38. – P. 358-364.
280. Safwat, H. Earthworm survival in oil contaminated soil / H. Safwat, S. Hanna, R.W. Weaver // Plant and Soil. – 2002. – Vol. 240. – P. 127-132.

281. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. – New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. – 101 p.
282. Schaefer, M. Earthworms in crude oil contaminated soils: Toxicity tests and effects on crude oil degradation / M. Schaefer // Environ. Assess. Remed. – 2001. – Vol. 8. – P. 35-37.
283. Shukla, O.P. Biodegradation for environmental management / O.P. Shukla // Environ. Sci. – 1990. – Vol. 25, N 2. – P. 46-50.
284. Sikkema, J.B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons / J.B. Sikkema, B. Poolman B. // Microbiology. – 1995. – Vol. 59. – P. 201-222.
285. Silver, S. Bacterial heavy metal resistance: new surprises / S. Silver, L.T. Phung // Annu. Rev. Microbiol. – 1996. – Vol. 50. – P. 753-789.
286. *Spirochaeta smaragdinae* sp. nov., a new mesophilic strictly anaerobic spirochete from an oil field / M. Magot [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. – 1997. – Vol. 155. – P. 185-191.
287. *Streptomyces albiacalis* sp. nov.: a new petroleum hydrocarbon-degrading species of thermo- and halotolerant *Streptomyces* / V.D. Kuznetsov [et al.] // Microbiology. – 1992. – Vol. 61. – P. 62-67.
288. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs / A. Tabatabaee [et al.] // Iranian J. Env. Health Sci. – 2005. – Vol. 2, N 1. – P. 6-12.
289. Tagatz, M.E. Effect of barite on development of estuarine communities / M.E. Tagatz, M. Tobia // Environ. Protect. – 1979. – N 7. – P. 401-407.
290. Terzaghi, C. Physical-chemical and ecotoxicological evaluation of water based drilling fluids used in Italian offshore / C. Terzaghi, M. Buffagni, D. Cantelli // Chemosphere. – 1998. – Vol. 37. – P. 2859-2871.
291. Toxic effects of some major polyaromatic hydrocarbons found in crude oil and aquatic sediments on *Scenedesmus subspicatus* / J.E. Djomo [et al.] // Wat. Res. – 2004. – Vol. 38, N 7. – P. 1817-1821.
292. Toxicity testing of 16 priority polycyclic aromatic hydrocarbons using Lumistox / A.P. Loibner [et al.] // Environ. Toxicol. and Chem. – 2004. – Vol. 23. – P. 557-564.

293. Van, A.F. Effects of metals on enzyme activity in plants / A.F. Van, H. Clijsters // *Plant Cell Environ.* – 1990. – Vol. 13. – P. 195-206.
294. Veil, J. A. Evolution of slurry injection technology for management of drilling wastes / J.A. Veil // *Environ. Protect.* – 2013. – N 1. – P. 20.
295. Wang, W. The use of plants for environmental monitoring and assessment / W. Wang, K. Freemark // *Ecotoxicol. and Environ. Safety.* – 1995. – Vol. 30. – P. 289-301.
296. Wieczorek, D. Phytotests as tools for monitoring the bioremediation process of soil contaminated with diesel oil / D. Wieczorek, O. Marchut-Mikolajczyk, S. Bielecki // *Biotechnol. Lett.* – 2012. – Vol. 93, N 4. – P. 431-439.
297. Wilkinson, S. Biodegradation of fuel oils and lubricants: soil and water bioremediation options / S. Wilkinson, S. Nicklin, J.L. Faul // *Bionransformations: bioremediation technology for health and environmental protection* / Eds. V.P. Singh, R.D. Stapleton. – Elsevier Science, 2002. – P. 69-100.
298. Zhang, Y. Effect of rhamnolipid (biosurfactant) on solubilization and biodegradation of n-alkanes / Y. Zhang, R.M. Miller // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – Vol. 61. – P. 2247-2251.
299. Young, S. The alter native to the oil-based drilling mud technical and environmental benefits of pseudo-oil-based drilling mud / S. Young // *Abst. of Nothevn drilling conference.* – Kristinsand, Noth Norway, 1994. – P. 1-14.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1



УТВЕРЖАЮ

Директор ГНУ ВНИИСХ

Харченко П.Н.

ЦКП ВНИИСХ

ГНУ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ РАСХН

Москва, 127550, ул. Тимирязевская, д.42.

тел. (499) 977-74-55 E-mail: seq@syntol.ru

Результаты анализа нуклеотидной последовательности

№ образца	праймер	последовательность	видовая принадлежность
1	ТТАСТАГCGGATTCCGGACTTCA	TCGGGATTGGGTCACTCTCGCGAGTTGGCAACCCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGT GTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTGTCGCCACCTTCTCCGGT TTGTCAACGGCAGTCTCTTAGAGTTCCCGCCATTACGGCTGGCAATAAGGACAA GGTTGGCTCGTTACGGGACTTAACCCCACTTTCACAACACGAGCTGACGACAGC CATGCAACCTGTCTCTCGTTCCCGAAGGCAATAAGGTATCTTACCAAATTCCGA GGATGTCAAGATAGTAAGGTCTTCGCGTTGCAATCGAATTAAACCCATGCTCCA CCGTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCTTGTAGTTTAACTTGGCGCGTACTCCCC AGCGGTGCACTTAATCGGTTAACTTCGCCAACAAGTGGCTAGGCACCCAAACGGCT GGTCGACATCGTTACGGCGTGGAATACCAAGGTATCTAATCTGTTGTACCCACG CTTTCGCACCTCAGTGTGATGTCAGTCCAGAGAGCGCCCTTCGCCACTGGTATTCCT CCGATCTCTACGCATGTCAACCGCTACACCGGGAATCTACCTCTCTCTGCACTC TAGCTTGACAGTTCGGATCGGTTCCAGTTGAGCCGGGGCTTTCACAACCGGCT TATCAAGCCACCTACGGCGCTTACGCCAGTAATTCGGATTACGGCTTG TGTAGCAGTGTGTAGCCAGGTCAATAGGGGCATGATTTGACGTCAATCCCCAC CTTCCTCCGGTTTGTCAACGGCAGTCACTTAGAGTGCCTAACCTGAATGTGCAACT AAGATCAAGGTTGCGCTCGTTGCGGACTTAACCCAACTCTCAGCACAGGCTG ACGACAACCATGCAACCACTGTCTATCTGTCGCCGGAAGGGAACGCCCTATCTTA GGTTGTCAAGGATGTCAAGACCTGTGTAAGGTCTTCGCGTTGCTCGAATTAAACC ACATGCTCCACCGCTTGTGGGGCCCCCGTCAATCTCTTGAATTCAGCCTTGGGCG CGTACTCCCCAGGGGAGTGTCTAATGCGTTTGTGTCAGCAGCTAAAGGGCGGAAACC CTCTAACACTTAGCATCTGTTTACGGCGTGGACTACAGAGGTATCTAATCTGTT TGCTCCCCACGTTTCGGCCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAAGAGTCGCTTCGCCA CTGGTGTCTCCACATCTACGCATTCACCGCTACAGTGAATTCACCTCTCTC TTCTGCACTCAAGTTCCTCAATGACCTCCCGTTGAGCCGGGGCTTCA CATCAGACTTAAGAACCGCGCGGCTTACGCCAATAATTCGCCACGCTAGC ACCTACGTATTA	Halomonas axialensis Halomonas meridiana Halomonas aquamarina
2	ТТАСТАГCGGATTCCGGACTTCA		Bacillus firmus

3	TTACTAGCGATTCCGACTTCA	GTAGCACGTGTGTAGCCAGGTGCATATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAATCCCAACC TTCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCTTAGAGTGCCCAACTGAATGATGGCAACTA AGAAATAAGGGTTGCGCTCGTTGGGGACTTAATACCAACATCTCAGCACAGAGCTG ACGACAACCATGCAACCACTGTCAACGTTGCCCGGAAGGGAACATATGTCTCCAT AGTGTACACGGGATGTCAAGACCTGGTAAGTTCTTCGGTGTCTCGAATTAACAC ACATGCTCCACCGCTTGTGGGGCCCCGTCATTTCCCTTTGAGTTTCAGTCTTGGGAC CGTACTCCCCAGGGAGTCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAGGGCGGGAACAC CCCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGTATCTAATCTGTT TGCTCCCCACGCTTTCGGCCTCAGTGTCAATTACAGCCAGACAGTCGCTTCGCCA CTGGTTCTTCCAAATCTTACGCATTTACCGCTACACTTGAATTCACATATCCTC TTCTGCACCTAAGTTCCCCAGTTTCCAAATGACCTTCCCCGTTGAGCCGGGGCTTTC ACATCAGACTTAAGAACCACTGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCGGGACACGC TAGCCACCTACGTATTACGGCGGTGCTGGCACGTAGTTAGCC	<i>Solibacillus silvestris</i>
4	TTACTAGCGATTCCGACTTCA	GTAGCACGTGTGTAGCCAGGTGCATATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAATCCCAACC TTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCAOCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTA AGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGGGGACTTAACCCAAACATCTCAGCACAGAGCTGA CGGCAACCATGCAACCACTGTCTATCTGTCGCCCGGAAGGGAAGCCCTATCTCTAG GGTTGTACAGAGATGTCAAGACCTGGTAAGTTCTTCGGTGTCTCGAATTAACCA CATGCTCCACCGCTTGTGGGGCCCCGTCATTTCCCTTTGAGTTTCAGCCCTTGGGGCC GTACTCCCCAGGGAGTGTCTTAATGCGTTTGTGTCAGCACTAAAGGGGGAACCC TCTAACACTTAGCACTCATGTTTACGGGTGGACTACCAGGTATCTAATCTCTGTT GCTCCCCACGCTTTCGGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAAGAGTCGCTTCGCCAC TGGTGTCTCTCCACATCTTACGCATTTACCGCCACACGTGGAATTCACCTCTCTCT TCTGCACCTAAGTTCCCCAGTTTCCAAATGACCTTCCCGTTGAGCCGGGGCTGTTT ACATCAGACTTAACGAACCGCGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCGGACAAACGC TAGCCACCTACGTATTACCGCGGTGCTG	<i>Bacillus firmus</i>
5	TTACTAGCGATTCCGACTTCA	TTGCTTGACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTATTTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCC CAAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAATCCCACTCTCTCCGGTTGTCAACC GGCAGTCAACTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCT CGTTGGGGAGCTTAACCCAAACATCTCAGCACAGAGTGCAGCACACCATGCACCA CCTGTCACTCTGTCCCCCGAAGGGGAAACTCTATCTAGAGGGGTACAGAGGATGT CAAGATTGTGAAGGTTCTTCGCGTTGCTCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTG TGCGGTTCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGGGTCGTACTCCCCAGGCGGA GTGCTTAAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAACCCCTTACACTTAGCACT CATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTGTTGATCCCCACGCTTTCG CACATCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAGTGCCTTCGCCACTGGTGTCTCTCCATAT CTCTGGCGCAATTCACCGGTACACATGGAAATTCACCTTCTCTTCTGCACTCAAGTTTT CCAGTTTCCAAATGACCCCTCCACGGTTGAGCGGTGGCTTTCACATCAGACTTAAACAC CGCCTACGGCGCTTTACGCCAATAATTCGGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTAC CGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCGGTGGCTTCTGATTAGGTACCGTCAGACGTG	<i>Staphylococcus caprae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus capitis</i> <i>Staphylococcus saccharolyticus</i>

6	TTACTAGCGAATCCGACTTCA	CCTTGTACATCCTTGTAGCACGTTGTAGCCCCAGGTCAATAAGGGCATGATGATTGT ACGTATCCCAACCTTCTCGGTTTGTACCGGCAGTCACTTAGAGTGCCCACTT AATGTGGCAACTAAGATCAAGGTTGCGTCTGTTGGGACTTAACCCAAACATCTC ACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAA CGTCTATCTTAGAGTGTACAGGATGTCAAGACCTGGTAAGTTCTTCGCGTTGC TTGGAATTAAACCAATGCTCCACCGCTTGTGGGCCCCGTCATTCCTTTGAGTT TCAGCCTTGGGCGTACTCCCAAGGCGAGTCTTAATGCGTTGTGTCAGCACTAA AGGGCGAAACCTCTAACACTAAATAATCATCGTTTACGGCGTGGACTAGCAGGT ATCTAATCCTGTTGTCTCCCAAGCTTTCGCGCTCAGCGTCAGTTACAGACCAAGA GTCGCTTCGCCACTGGTTCTTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGA ATTCCACTCTCTCTTCTGCACTCAAGTCCCCACTTTCATGACCCCTCCACGGTTGA GCCGTGGGCTTGTACATCAGACTTAAAGGACCGCTGCGCGCTTTACGCCAATA ATTCCCGACACGCTAGCCACCTACGTAATTACCGCAGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGT GCTTCTGCT	Bacillus circulans
7	TTACTAGCGAATCCGACTTCA	TGAGTCCGCTTCTCGGAGGTGCTTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTG TGATGCCCTGGTGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCCCACCTTCTCGGTT TATCACCGGAGCTCTCTTTGAGTTCCCGCATCACGGCTGGCAACAAGGATAAG GGTTGGCTGTTGGGGACTTAACCCAACTTTCACAAACGAGCTGACGACAGCC ATGCAGCACTGTCTCAGGTTCCCGAAGGCACTAAGCATCTCTGCCGAATTCCTG GATGTCAAGACCAAGGTAGGTTCTTCGCTTGCATCGAATTAACCATGCTCCAC CGTTGTGGGCCCCGTCATTTCAATTTAGTTTAACTTGGGCGCTACTCCCCA GGCGTGCAGTTAACGCGTTAGTCCGGAAGCCACTCTCAAGGAACAGCTCCAA GTCGACATCGTTACGGCGTGGACTACAGGGTATCTAATCCTGTTGTCCCCACGC TTTCGCACTGAGCGTCAGTCTCTGTCAGGGGCGGCTTTCGCCACCGGTATTCCTC CAGATCTCTACGCAATTTACCGCTACACCT	Erwinia rhapontici Erwinia persicina Erwinia tasmaniensis
8	TTACTAGCGAATCCGACTTCA	ATGTTTATGGGATTGTCTGACCTCGCGGTTTGTGCTGCCCTTGTACCATCCATTGT AGCACGTGTAGCCAGGTCTATAAGGGGCATGATGATTGACGTATCCCCACCTT CCTCCGTTTGTACCCGAGTCACTTAGAGTGCCCAACTTAATGTGGCAACTAAG ATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGACTTAACCCAACTCTCACGACACGAGCTGACG ACAACCATGCACCACTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGGAACGCTATCTCTAGGA GTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCTGCTTCGAATTAACCCAC ATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTTCTTTGAGTTTCAGCCTTGGGCGG TACTCCCCAGGCGAGTGTCTTAATGCGTTTGTGTCAGCACTAAAGGGCGGAACCTT CTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACAGGTATCTAAGTCTGTTTG CTCCCCACGCTTTCGGGCTCAGCGTCAAGTTACAGACCAAGAGTGGCTTCGGCACT GGTGTCTCTCCACATCTCTAGGCAAT	Bacillus circulans

Алексеев Я.И.

Заведующий лабораторией