



УДК 579.2  
ББК 28.48

## ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ АБОРИГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ ЖИРНОВСКОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА ДЛЯ УТИЛИЗАЦИИ НЕФТЕШЛАМОВ<sup>1</sup>

С.В. Редкозубов

Из проб, отобранных на нефтешламохранилище в Жирновском районе Волгоградской области, выделено 12 штаммов микроорганизмов, из которых 8 обладают углеводородокисляющей активностью. Проведена количественная оценка нефтеструктурирующей способности выделенных микроорганизмов в зависимости от их местообитания. В опытах на белых мышах и в ряде биохимических тестов установлена эпидемическая безопасность всех выделенных штаммов. Осуществлена таксономическая идентификация наиболее активных бактерий-нефтеструктуров, отнесенных к роду *Rhodococcus*.

**Ключевые слова:** углеводородокисляющие микроорганизмы, утилизация нефтешламов, *Rhodococcus*, эпидемическая безопасность бактерий-нефтеструктуров.

Шламохранилище Жирновского цеха добычи нефти и газа (ЦДНГ) существует с момента начала добычи нефти в Жирновском и Котовском районах Волгоградской области. Объект оборудован в 1960-х гг. и служит для хранения нефтешлама, образующегося при откачке пластовых вод. Хранение осуществляется в двух открытых бассейнах (картах) общим объемом 75 тыс. куб. м. Присутствие такого объекта в непосредственной близости от русла р. Медведица крайне нежелательно по экологическим соображениям. В последние годы в рамках Жирновского шламохранилища реализуется программа утилизации нефтешлама методом его обработки известью и пересыпанием земель с последующим захоронением полученного «инертного грунта» в котлованы. Данный метод не гарантирует быстрой минерализации нефтешлама, поскольку захоронение в глубокий грунт затрудняет возможность его аэрации и вовлечения в биохимические почвенные процессы. В насто-

ящее время на территории Жирновского шламохранилища около 70 тыс. т нефтешлама нуждаются в более эффективных методах утилизации.

Следует отметить, что утилизация нефтяных загрязнений термическим или окислительным путем требует высоких энергозатрат или внесения больших количеств окислителей. Стоимость биоремедиации значительно ниже, так как этот метод предусматривает лишь внесение в загрязненный объект культуры микроорганизмов и небольших количеств минеральных удобрений. Так, на рынке США стоимость услуг по биоремедиации на 10–40 % меньше, чем стоимость аналогичного проекта, выполненного физико-химическими методами [3, с. 20–27].

Отправной точкой проведенного исследования послужила идея, что биоценоз, сформировавшийся за 40 с лишним лет существования Жирновского шламохранилища, должен включать микроорганизмы, эффективные в отношении нефтеструкции и адаптированные к потреблению компонентов жирновского нефтешлама. Если микроорганизмы с указанными свойствами будут выделены, то на их основе можно будет предложить менее зат-

ратный проект по утилизации жирновского нефтешлама методом биоремедиации.

Главной целью проведенного исследования стало выделение представителей аборигенной микрофлоры Жирновского шламохранилища, их биологический скрининг на наличие углеводородокисляющей активности в отношении нефтешлама и тестирование на биологическую безопасность. Дополнительной целью ставилась таксономическая идентификация штаммов, обладающих наибольшей углеводородокисляющей активностью.

В 2007 г. был предпринят отбор проб на Жирновском шламохранилище из следующих объектов внешней среды:

- нефтезагрязненный грунт поверхностный;
- нефтезагрязненный грунт глубинный (залегание 5–10 см и 25–40 см);
- нефтешлам из карт № 1 и 4;
- дождевая вода с поверхности нефтешлама;
- внутришламовая вода карты № 1 в момент ее технологической откачки перед подачей в пласт (то есть отбирались пробы внутришламовой воды, предварительно прошедшей через насос).

Отобранные пробы высевали на нутриент-агар и триптиказо-соевый агар (фирмы «Difco»). Микроорганизмы дифференцировались по культурально-морфологическим, биохимическим свойствам и исследовались на безопасность и углеводородокисляющую активность. При исследовании тинкториальных свойств культур применяли метод окраски по Граму.

Наличие углеводородокисляющей активности определяли визуально по появлению колоний на агаризованной минеральной среде М9 и приросту концентрации микробных клеток на жидкой минеральной среде М9 состава (г/л):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 6,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3,0;  $\text{NaCl}$  – 0,5;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1,0;  $\text{CaCl}_2$  – 0,008; рН 7,2–7,4 с добавлением стерилизованного нефтешлама до 3 %.

Количественно глубина нефтедеструкции определялась на жидкой синтетической среде Раймонда [5, с. 91] с добавлением автоклавированного нефтешлама до 10 % в качестве единственного источника органического углерода и энергии. Инкубирование осуществлялось в колбах на 100 мл с высоким горлом под ватно-марлевыми пробками. В каждую колбу

помещали 50 мл среды и инкубировали на качалке с частотой 120 качаний в минуту при комнатной температуре (25 °С). Измерение проводилось гравиметрически через 1, 2, 3, 4 и 5 недель инкубирования путем экстракции остаточного шлама хлороформом, упариванием растворителя, высушиванием в течение двух суток в эксикаторе над хлористым натрием и взвешиванием в тарированной колбе [4, с. 33–38]. В качестве контроля применялись стерильные тарированные колбы, инкубируемые в аналогичных условиях. Поскольку в составе жирновского нефтешлама присутствуют вещества, не растворимые в хлороформе (вода, минеральные соли, взвешенные частицы и др.), за точку отсчета принимали долю первичного нефтешлама, экстрагируемую хлороформом (в % по массе). Исходное значение устанавливали как среднеарифметическое массовой доли нефтешлама, экстрагируемой хлороформом, пяти контрольных колб.

В качестве дополнительного параметра определяли увеличение биомассы бактерий в среде в пересчете на белок. После экстракции нефтешлама хлороформом культуральную жидкость нагревали на кипящей водяной бане в течение пяти минут для удаления остатков хлороформа и повышения отдачи белка микробными клетками [7, р. 698–703]. После нагревания осуществлялась компенсация потерь объема среды, связанных с испарением воды при инкубировании. Для этого культуральную жидкость целиком переносили в мерную колбу на 50 мл и доводили объем до метки бидистиллированной водой. Далее определялась концентрация белка методом фотоэлектроколориметрии с биуретовым реактивом [ibid.]. Контролем служила культуральная жидкость стерильных колб, обрабатываемая аналогичным образом. Измерение оптической плотности осуществлялось на фотоэлектроколориметре КФК-2-УХЛ 4.2 при длине волны 540 нм.

На безопасность тестировались все выделенные бактериальные штаммы независимо от наличия углеводородокисляющей активности. Исследования на патогенность проводились на белых лабораторных мышах весом 18–20 г. Животным вводили подкожно 0,2 мл суспензии 2-суточных культур, выращенных на косяках нутриент-агара («Difco»), содер-

жащих  $10^9$  и  $10^8$  живых микробных клеток. Приготовление суспензии осуществлялось по стандарту мутности.

Присутствие среди выделенных штаммов колиформных бактерий определялось по характеру роста на среде Эндо, агаре МакКонки; разложению глюкозы, лактозы и выделению  $\text{SH}_2$  на агаре Клиглера; а также с применением систем индикаторных бумажных для идентификации энтеробактерий (СИБ № 2) производства ФГУП «НПО «Микроген»».

Идентификацию штаммов осуществляли культурально-морфологическими и биохимическими методами в соответствии с определителем бактерий Берджи 1997 года. В дополнительных биохимических тестах для таксономической идентификации культур рода *Rhodococcus* использовали методы, изложенные в работе В.И. Аристарховой [1, с. 37–41].

В ходе аэробного инкубирования было выделено 12 чистых культур (11 культур бактерий и 1 культура дрожжей), из которых 8 спо-

собны поддерживать жизнедеятельность за счет нефтешлама в качестве единственного источника органического углерода и энергии. Все пробы нумеровались литерой «Н» и порядковым номером. Коды присваивались штаммам путем прибавления к номеру пробы латинской буквы в алфавитном порядке. Кодировка штаммов в зависимости от источников выделения, наличия углеводородокисляющих и культурально-тинкториальных свойств приведена в табл. 1.

Исследования на белых мышах не выявили патогенных форм среди выделенных микроорганизмов. Животные наблюдались в течение 14 дней, были активны, потребляли корм. Некроза в области инъекции не наблюдалось.

Гибель лабораторных мышей не отмечена, за исключением одной мыши, павшей на 8-е сутки после инъекции культуры Н1d. При вскрытии павшей мыши и высеве срезов внутренних органов на полноценные питательные среды штамм Н1d, которым производилось инфицирование мыши, не высевался.

Таблица 1

**Кодировка штаммов в зависимости от источников выделения и культурально-морфологических свойств**

№ пробы	Объект отбора	Код штамма	Углеводородокисляющая активность	Культуральные признаки (на триптиказо-соевом агаре Difco)	Тинкториально-морфологические признаки (окраска по Граму)
Н1	Внутришламовая вода. Карта № 1	Н1a	Присутствует	Колонии шероховатые, с рыхлой складчатой структурой, высоким профилем и волнистым краем. Белого цвета, непрозрачные. Через 24 ч достигают размера 4–5 мм. Врастают в агар	В мазке суточной культуры видны грамположительные неветвящиеся мицеллы, распадающиеся на короткие палочки и кокки клетки с неоднородной структурой
		Н1b	Присутствует	То же, но образует гладкие колонии	То же
		Н1c	Отсутствует	Колонии белого цвета, слизистые, выпуклые, с ровным краем. На 2-е сутки вырастают до 2–3 мм	В мазке суточной культуры видны тонкие удлиненные грамвариабельные палочки
		Н1d	Отсутствует	Колонии мелкие, выпуклые, с ровным краем, 1–2 мм в диаметре, появляются на 2-е сутки, на 3-и сутки приобретают ярко-желтый цвет. Пигмент в среду не диффундирует	В мазке 2-суточной культуры видны мелкие короткие палочки и удлиненные овальные клетки. Окрашиваются грамположительно с единичными грамвариабельными клетками
Н2	Поверхностный нефтешлам. Карта № 4	Н2a	Присутствует	Соответствует описанию культуры Н1b	Соответствует описанию культуры Н1a
		Н2b	Отсутствует	Колонии белые, полупрозрачные, слизистой консистенции, с ровным краем. На 2-е сутки достигают диаметра 2–3 мм	В мазке 2-суточной культуры видны овальные клетки и короткие палочки. По Граму клетки прокрашиваются слабо
Н3	Нефтезагрязненный грунт поверхностный	Посев пробы роста не дал			

№ пробы	Объект отбора	Код штамма	Углеводородоокисляющая активность	Культуральные признаки (на триптиказо-соевом агаре Difco)	Тинкториально-морфологические признаки (окраска по Граму)
H4	Нефтезагрязненный грунт глубинный (залегание 25–40 см)	H4a	Присутствует	Колонии гладкие, прозрачные, слизистой консистенции с волнистым краем. В первые 24 ч достигают размера 2–3 мм	В мазке суточной культуры видны средние и укороченные палочки. При окраске по Граму клетки приобретают бледно-розовый цвет
H5	Дождевая вода на поверхности нефтешлама. Карта № 1	H5a	Присутствует	Колонии гладкие, матовые, слегка выпуклые, с ровным краем. В первые 24 часа достигают размера 1–2 мм	В мазке суточной культуры видны плохо прокрашиваемые палочки с едва различимым контуром клеток
H6	Нефтезагрязненный грунт глубинный (залегание 5–10 см)	H6a	Присутствует	Соответствует описанию культуры H4a	Соответствует описанию культуры H4a
		H6b	Присутствует	Колонии гладкие, прозрачные, желтоватого цвета, слизистой консистенции, с волнистым краем. Через 24 ч достигают размера 2–3 мм	В мазке суточной культуры видны средние и укороченные грамтрицательные палочки
		H6c	Отсутствует	Колонии гладкие, мелкие, белого цвета, слизистой консистенции, с ровным краем. На вторые сутки достигают размера 1–2 мм	В мазке 2-суточной культуры видны скопления тонких грамположительных палочек
H7	Поверхностный нефтешлам. Карта № 1	Проба не исследована			
H8	Дождевая вода на нефтешламе. Карта № 4	H8a	Присутствует	Колонии телесного цвета, гладкие, с ровным краем	Крупные почкующиеся грамположительные клетки с четко оформленным ядром

По результатам биохимических и морфологических исследований колиформные виды среди выделенных штаммов не обнаружены. Результаты исследований представлены в табл. 2. Дифференциация от бактерий кишечной группы производилась путем сравнения биохимических свойств выделенных штаммов с таблицей биохимической активности бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, приведенной в справочнике М.О. Биргера [2, с. 208–209].

Согласно полученным результатам, наибольшую нефтеструктивную активность и скорость прироста белка на жидких синтетических средах с углеводородами проявили монокультуры H1a и H1b, выделенные из внутришламовой воды карты № 1 (см. рис. 1 и 2), и культура H2a, выделенная из и поверхностного нефтешлама карты № 4 (см. рис. 3 и 4).

Максимальной глубиной нефтеструкции и увеличением концентрации белка в среде характеризуется консорциум из четырех микроорганизмов, выделенных из внутришламовой воды, условно обозначенных H1a, H1b,

H1c и H1d. Причем штаммы H1c и H1d самостоятельной нефтеструктивной активностью не обладают. В данном случае, вероятно, имеет место явление синтрофии, что на рис. 1 отражается в виде плавных переходов от лаг-фазы к фазе логарифмического роста и от логарифмической фазы к фазе стационарного роста.

Штаммы, выделенные из нефтезагрязненного грунта, обладают меньшей углеводородоокисляющей способностью и, соответственно, меньшим приростом биомассы в пересчете на белок (см. рис. 5 и 6).

Следует отметить, что прирост концентрации белка (рис. 1, 3, 5) в первую неделю инкубирования не приводит к заметному снижению доли нефтешлама, извлекаемого хлороформом, по сравнению с контролем. Вероятно, причина этого заключается в том, что все культуры сначала утилизируют частично окисленные гидрофильные компоненты нефтешлама, плохо извлекаемые хлороформом, и лишь затем начинают окислять гидрофобные компоненты.

Таблица 2

Результаты биохимических тестов на принадлежность к группе кишечной палочки \*

Код штамма	Рост на агаре МакКонки	Глюкоза	Лактоза	Оксидаза	Утилизация цитрата	Утилизация малоната	Утилизация сорбита	Утилизация инозита	$\beta$ -галактозидаза	Фенилаланин-деаминаза	Уреаза	Лизин-декарбоксилаза	Орнитин-декарбоксилаза	Фосфат-проскауэра	Индолообразование	Образование $H_2S$
H1a	Нет	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
H1b	Нет	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
H1c	Нет	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
H1d	Нет	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H2a	Нет	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
H2b	Нет	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H4a	Есть	К	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
H5a	Есть	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
H6a	Есть	КГ	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
H6b	Есть	КГ	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
H6c	Нет	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-

\* В таблице приняты следующие сокращения: К – кислота; КГ – кислота и газ.

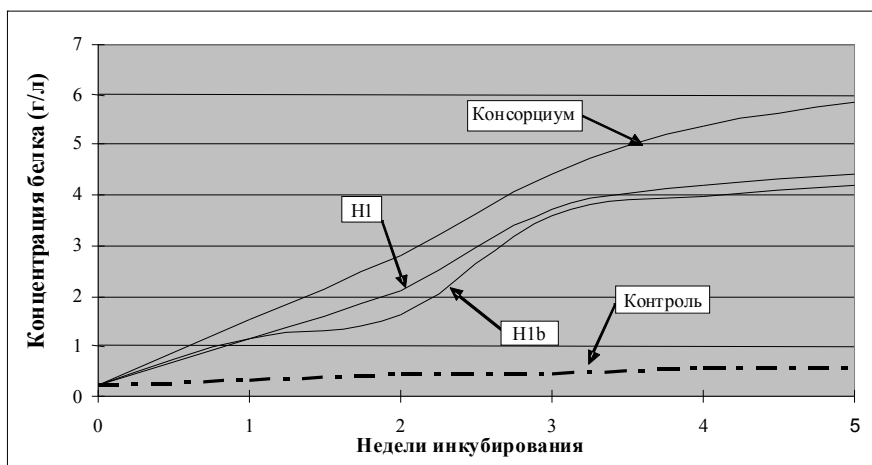


Рис. 1. Микроорганизмы внутришламовой воды. Накопление белка в среде

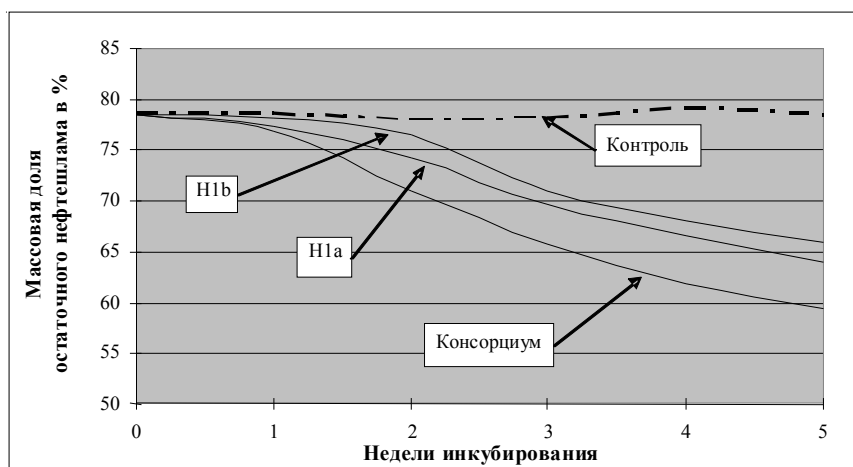


Рис. 2. Утилизация нефтешлама микроорганизмами, выделенными из внутришламовой воды

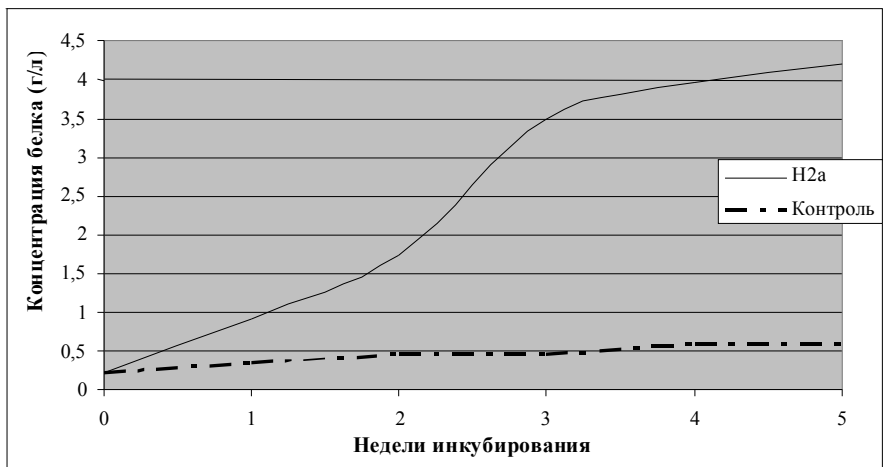


Рис. 3. Микроорганизмы поверхностного нефтешлама. Накопление белка в среде

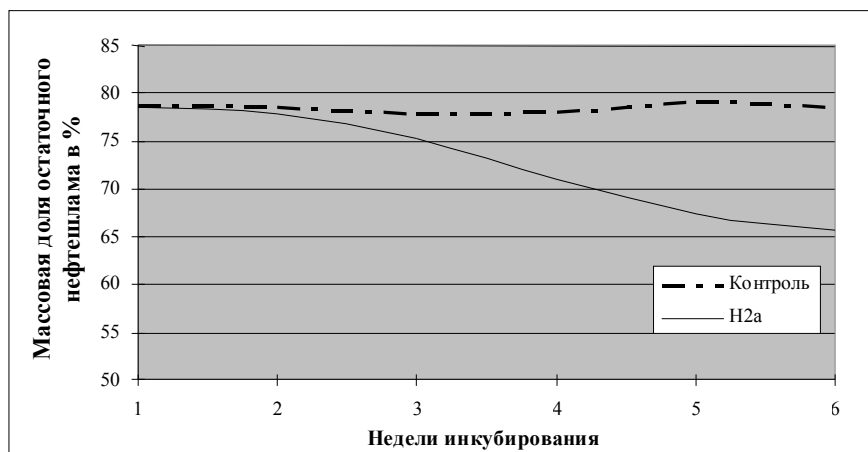


Рис. 4. Утилизация нефтешлама микроорганизмами, выделенными из нефтешлама

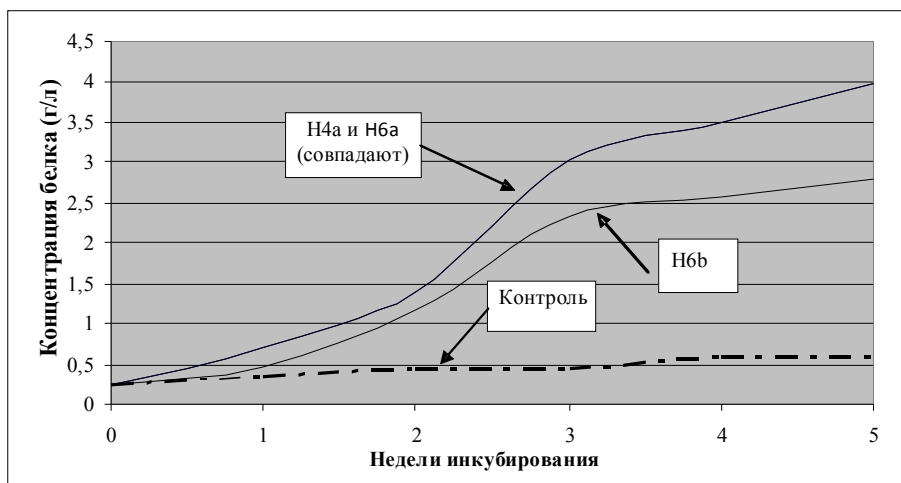


Рис. 5. Микроорганизмы нефтезагрязненного грунта. Накопление белка в среде

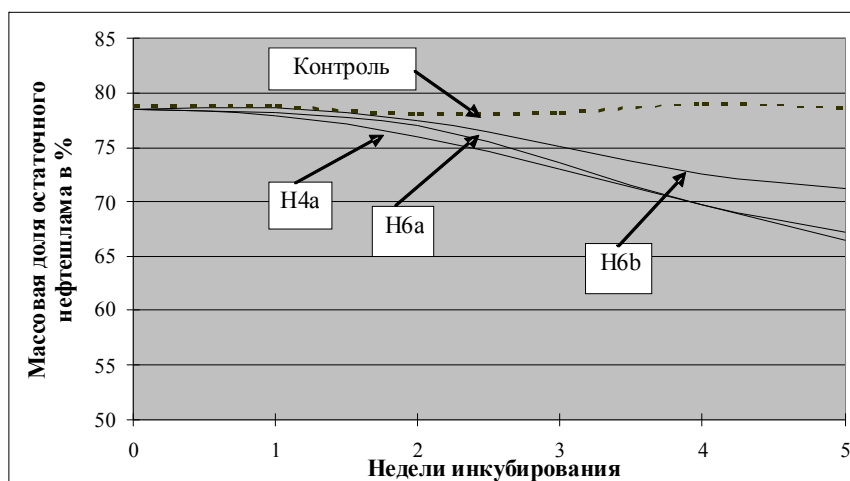


Рис. 6. Утилизация нефтешлама микроорганизмами, выделенными из грунта

Поскольку культуры Н1а, Н1b и Н2а проявили себя как наиболее активные нефтедеструкторы, решено было провести их таксономическую идентификацию.

Все указанные культуры имеют окраску от грамположительной до грамвариабельной, обладают высокой скоростью роста, на плотных питательных средах образуют сухие плотные ребристые колонии белого цвета с неровным краем. На средах с низким содержанием питательных веществ они формируют субстратный мицелий (врастают в агар), но не воздушный мицелий. При микроскопировании культур на разных сроках инкубирования выяснилось, что они обладают сложным жизненным циклом. В мазке видны довольно крупные длинные неразветвленные септированные гифы, распадающиеся на палочки, а в дальнейшем на кокковые формы с неоднородной клеточной структурой. Гифы после септирования до кокковидных форм часто объединены общей капсулой и не разъединяются, формируя структуру типа «нитка жемчуга». Культуры Н1а, Н1b и Н2а способны использовать в качестве единственного источника азота нитрит натрия и формамид. Они не гидролизуют крахмал и целлюлозу, не утилизируют цитрат. На основании вышеописанных признаков, в соответствии с определителем бактерий Берджи 1997 г., а также описанием признаков бактерий рода *Rhodococcus*, приведенном в исследовании О.А. Нестеренко [6, с. 95–109], культуры Н1а, Н1b и Н2а были идентифицированы как относящи-

еся к группе нокардиоформных актиномицет рода *Rhodococcus*.

В результате проведенных исследований выделены представители аборигенной микрофлоры Жирновского шламохранилища, обладающие углеводородокисляющей способностью. Выделенные микроорганизмы биологической опасности не представляют. Штаммы, обладающие максимальной углеводородокисляющей активностью, являются представителями рода *Rhodococcus*. Наибольшей нефтедеструктивной активностью обладает микрофлора внутришламовой воды, представляющая собой активный биологический материал, пригодный для биоремедиации.

#### ПРИМЕЧАНИЕ

<sup>1</sup> Автор выражает искреннюю благодарность экологической службе ОАО «ЛУКОЙЛ-Волгограднефтегаз» за оказание всесторонней поддержки при проведении полевых исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аристархова, В. И. Нокардиоподобные микроорганизмы / В. И. Аристархова. – М. : Наука, 1989. – 248 с.
2. Биргер, М. О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / М. О. Биргер. – М. : Медицина, 1982. – 464 с.
3. Вельков, В. В. Биоремедиация: принципы, проблемы, подходы / В. В. Вельков // Биотехнология. – 1995. – № 3/4. – С. 20–27.
4. Ермоленко, З. М. Влияние некоторых факторов окружающей среды на выживаемость

внесенных бактерий, разрушающих нефтяные углеводороды / З. М. Ермоленко, В. А. Чугунов, В. Н. Герасименко // Биотехнология. – 1997. – № 5. – С. 33–38.

5. Кузнецов, С. И. Методы изучения водных микроорганизмов / С. И. Кузнецов, Г. А. Дубинина. – М. : Наука, 1989. – 287 с.

6. Нестеренко, О. А. Нокардиоподобные и коринеподобные бактерии / О. А. Нестеренко, Е. И. Квасников, Т. М. Ногина. – Киев : Наук. думка, 1985. – 336 с.

7. Sticland, L. H. The Determination of Small Quantities of Bacteria by means of the Biuret Reaction / L. H. Sticland // Journal of General Microbiology. – 1951. – Vol. 5, № 4. – P. 698–703.

## **ON PERSPECTIVE UTILITY OF THE INDIGENOUS MICROFLORA OF THE SKIMMING PONDS IN ZHIRNOVSK FOR THE PURPOSE OF OIL-SLIME RECYCLING**

*S.V. Redkozubov*

Twelve cultures of microorganisms have been isolated from bacteriological samples taken in the skimming ponds in Volgograd region. Eight of them were qualified as hydrocarbon-oxidizing strains. The degree of oil-slime consuming by the qualified strains was tested according to their environmental placement. Epidemiological safety of the isolated microorganisms was proved in biological testing with laboratory animals (mice) and some biochemical analysis. The strains most active in hydrocarbon-oxidation were identified as relating to *Rhodococcus* genera.

**Key words:** *hydrocarbon-oxidizing microorganism, oil-slime utilization, Rhodococcus, epidemiological safety of oil-oxidizing cultures.*