

УДК 579.222

## **ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ НА РОСТ БАКТЕРИЙ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ В УСЛОВИЯХ ПОНИЖЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ**

Герцен М.М.<sup>1</sup>, Голышева А.Н.<sup>2</sup>

1 - младший научный сотрудник лаборатории биологически активных соединений и биокompозитов

2 – младший научный сотрудник лаборатории химической конверсии возобновляемой биомассы и органического синтеза

Тульский государственный университет

Тула

Одним из перспективных направлений инактивации нефти и нефтепродуктов *in situ* является применение метода биоремедиации, направленного на усиление метаболической активности как аборигенной микрофлоры, так интродуцированных бактерий, деградирующих органотоксиканты до безопасных продуктов. В процессе биоремедиации микроорганизмы используют углеводороды нефти в качестве питательного субстрата [1]. Однако способность бактерий разлагать нефтяные углеводороды зависит от доступности химических соединений и условий окружающей среды [2]. Преимуществом биоремедиации является отсутствие значительных побочных эффектов и вторичного загрязнения [3], при этом существенный ее недостаток – необходимость особого подхода к каждому загрязненному объекту. При рассмотрении биоремедиации как метода обработки нефтезагрязненных экосистем с высокой степенью очистки эффективным является добавление в загрязненную среду природных нефтесорбентов – гуминовых кислот (ГК), ускоряющих естественные процессы биоразложения за счет дополнительного связывания углеводородов нефти и являющихся активной матрицей, способствующей росту и размножению бактерий-нефтедеструкторов. Препараты, содержащие гуминовые кислоты и микроорганизмы-нефтедеструкторы, позволят значительно повысить степень очистки биоремедиационным способом: в случае водных загрязнений при образовании эмульсий нефти, устойчивых к биоразложению, бактерии колонизируют поверхность эмульсии, но самостоятельно не проникают в ее толщу; гуминовые кислоты при этом работают как нефтесорбенты, разрушая нефтяную пленку на более мелкие части [4].

В случае интродукции бактерий (биоаугментации) в нефтезагрязненные экосистемы высокий детоксицирующий эффект достигается при использовании штаммов бактерий, характеризующихся способностью разлагать сырую нефть и ее отдельные компоненты [5]. Успешная биоаугментация требует использования бактериальных штаммов, устойчивых к субоптимальным условиям окружающей среды [6, 7]. Необходимость включения таких штаммов в

состав биопрепаратов обусловлена тем, что добыча нефти осуществляется в климатических условиях, стрессовых для многих микроорганизмов. К таким условиям относятся низкие или высокие температуры, высокая засоленность или кислотность почв, резкие колебания температуры в течение суток. Подобные условия тормозят естественные процессы самовосстановления окружающей среды. В значительной степени успех ликвидации нефтяного загрязнения зависит от наличия штаммов микробов, адаптированных к экстремальным условиям обитания и способных синтезировать ПАВ, а также обладающих набором генов биodeградации. Среди углеводородокисляющих бактерий разнообразием геномной организации и функциональным разнообразием отличаются представители рода *Rhodococcus*. Их биотехнологическое значение связано с метаболической и генетической гибкостью, а также с устойчивостью этих штаммов к различным видам абиотического стресса [5]. Изучение биodeградирующих свойств бактерий рода *Rhodococcus*, способных к росту при широком диапазоне температур (+4-+37°C), обладающих высокой углеводородокисляющей активностью, позволит систематизировать сведения о бактериальном разложении углеводородов нефти в условиях пониженных температур с целью получения универсальных в экстремальных условиях биопрепаратов основанном на субстрате гуминовых кислот торфов Тульской области и штаммов бактерий *Rhodococcus erythropolis* S67, *Rhodococcus erythropolis* X5.

В качестве органической матрицы для разработки биопрепарата выбраны гуминовые кислоты, выделенные по методике, описанной в работах. Материал, используемый для выделения кислот - торфа Тульской области [13] [9-10]. Бактериальная составляющая *Rhodococcus*, предоставленные лабораторией Пущинского научного центра биологических исследований (г. Пущино) [11-12].

Определение влияния пониженной температуры среды на рост бактерий-нефтедеструкторов проводили согласно методике [13]. Выходы биомассы микроорганизмов представлены на рисунке 1.

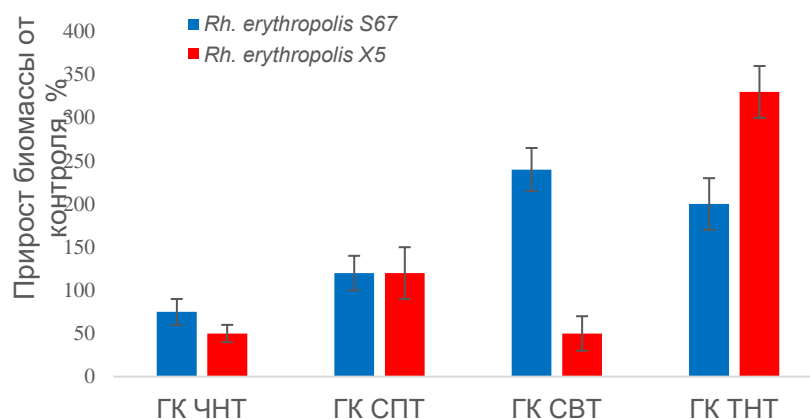


Рис. 1. Выход биомассы микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis* S67 и X5 в присутствии гуминовых кислот в условиях пониженной температуры

Далее в тексте упоминания идут согласно рисунку 2.



Рис. 2. Графическое изображение получение биопрепарата с условными обозначениями

Увеличение биомассы МО при внесении в культуральную среду гуминовых кислот увеличило биомассу в 1,5-6 раз относительно контроля: ГК ТНТ проявили максимальный стимулирующий эффект: биомасса *R. erythropolis X5* выросла в 6 раз относительно контроля. В тоже время, на рост *R. erythropolis S67* большее влияние оказали ГК СВТ: биомасса выросла в 2,5 раза. Установлено, что в условиях абиотического стресса ГК выполняют роль источника углерода (питательного субстрата) и энергии для выработки бактериями высокомолекулярных углеводсодержащих биополимеров, защищающих клетки от замерзания, обеспечивающие стабильность среды. В процессе роста микроорганизмов на субстрате с гуминовыми кислотами образуется слой состоящий из молекул ГК на поверхности клеток (рисунок 3).

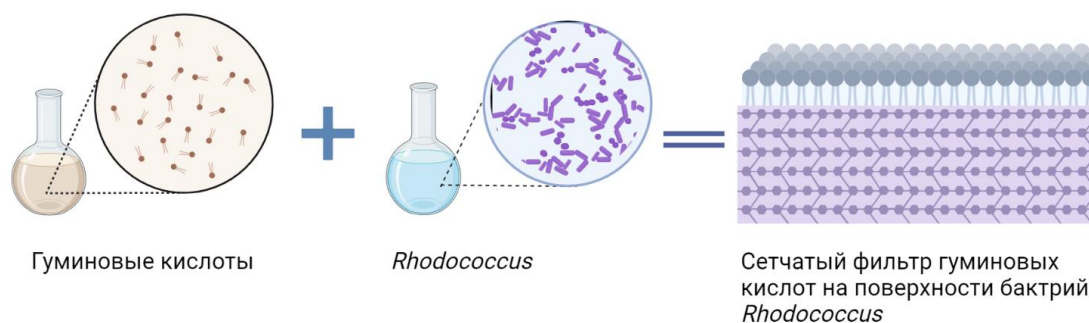


Рис.3. Схема взаимодействия гуминовых кислот и микроорганизмов

Экспериментально установлено, что гуминовые кислоты стимулируют рост штаммов в условиях пониженной температуры: продолжительность лаг-фазы *Rh. erythropolis S67* уменьшается в 2 раза. Экспоненциальная фаза роста *Rh. erythropolis X5* при добавлении в среду ГК наступает через 4 ч инкубирования, что свидетельствует о быстрой адаптации клеток к стрессовым условиям. Основные параметры роста исследуемых МО представлены в таблице.

Стрессовые условия в виде пониженной температуры культивирования приводят к снижению удельной скорости роста микроорганизмов и повышению времени генерации биомассы.

Таблица

Ростовые параметры микроорганизмов  
*Rhodococcus sp. X5* и *Rh. erythropolis S67*

Параметры	Удельная скорость роста ( $\mu$ ), ч <sup>-1</sup>		Время удвоения био- массы, ч	
	<i>Rh.</i> <i>erythropolis</i> S67	<i>Rh.</i> <i>erythropolis</i> X5	<i>Rh.</i> <i>erythropolis</i> S67	<i>Rh.</i> <i>erythropolis</i> X5
Среда Эванса	0,06±0,01	0,17±0,02	11,7±0,6	4,1±0,2
ГК ЧНТ	0,12±0,01	0,07±0,03	5,9±0,3	9,8±0,5
ГК СПТ	0,06±0,01	0,10±0,02	11,9±0,2	6,7±0,4
ГК СВТ	0,08±0,02	0,07±0,02	7,5±0,4	9,9±0,7
ГК ТНТ	0,16±0,02	0,09±0,01	4,7±0,4	8,7±0,5

Добавление гуминовых кислот в культуральный раствор способствует увеличению удельной скорости роста штамма *Rhodococcus sp. X5* в 1,2-1,4 раза, *Rhodococcus sp. S67* в 1,5-2 раза и зависит от генезиса гуминовых кислот. Как и в случае повышенной солености среды [13], в ответ на еще один абиотический стрессовый фактор – пониженную температуру, микроорганизмам необходимо вырабатывать экзополисахариды, синтез которых ускоряется при наличии в культуральной среде гуминовых кислот, которые микроорганизмы используют для генерации энергии, запасаемой в виде АТФ и расходуемой на регенерацию компонентов клеток.

**Список литературы:**

1. Balba M. T. et al. Bioremediation of oil-contaminated desert soil: the Kuwaiti experience // Environment International. – 1998. – Т. 24. – №. 1-2. – С. 163-173.
2. Shrotri, C. K. Biostimulatory Effect of Shilajeet on Wheat (*Triticum aestivum*) Seed Germination / C. K. Shrotri, K. Shrotri, R. Jain // Journal of Biology. Agriculture and Healthcare. – 2012. – V. 2. – No. 5. – P. 34–40.
3. Cheng C. et al. Development of stress tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains by metabolic engineering: New aspects from cell flocculation and zinc supplementation // Journal of bioscience and bioengineering. – 2017. – Т. 123. – №. 2. – С. 141-146.
4. Jafarinejad S. Pollutions and wastes from the petroleum industry // Petroleum Waste Treatment and Pollution Control; Butterworth-Heinemann: Oxford, UK. – 2017. – С. 19-83.
5. Guerra, A. B. Metagenome enrichment approach used for selection of oil-degrading bacteria consortia for drill cutting residue bioremediation / A. B. Guerra, J. S. Oliveira, R. C. Silva-Portela, W. Araujo, A. C. Carlos, A. T. R. Vasconcelos // Environ. Pollut. – 2018. – V. 235. – P. 869–880.

6. Нечаева, И.А. Биодegradация углеводов нефти психротрофными микроорганизмами-деструкторами: дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / И. А. Нечаева; ПушГЕНИ. – Пушкино, 2009. – 175 с.
7. McMullan G. et al. Habitat, applications and genomics of the aerobic, thermophilic genus *Geobacillus* // *Biochemical Society Transactions*. – 2004. – Т. 32. – №. 2. – С. 214-217.
8. Делеган Я. А. и др. Термотолерантные бактерии-нефтедеструкторы, выделенные из проб грунта и воды географически удаленных регионов // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2016. – Т. 52. – №. 4. – С. 383-391.
9. Дмитриева Е. Д., Гриневиц В. И., Герцен М. М. Дegradация нефти и нефтепродуктов биокomпозициями на основе гуминовых кислот торфов и микроорганизмов-нефтедеструкторов // *Российский химический журнал*. – 2022. – Т. 66. – №. 1. – С. 42-56.
10. Дмитриева Е. Д., Герцен М. М. Влияние гуминовых кислот на состояние капель нефтепродуктов в присутствии микроорганизмов-нефтедеструкторов рода *Rhodococcus* // *Вестник Тверского государственного университета. Серия: Химия*. – 2021. – №. 2. – С. 69-79.
11. Филонов А. Е. и др. Биопрепарат для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами, способ его получения и применения. – 2010.
12. Акатова Е. В. и др. Детоксицирующая способность гуминовых веществ торфов различного происхождения по отношению к ионам тяжелых металлов // *Химия растительного сырья*. – 2017. – №. 1. – С. 119-127.
13. Герцен М.М. Изучение влияния гуминовых кислот на рост микроорганизмов-нефтедеструкторов в условиях повышенной солености среды. – 2021. – №. 5-2. – С. 171-174.