

УДК 544.77.052.5

ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗЫВАЮЩЕЙ И ДЕТОКСИЦИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ БИОКОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ТОРФОВ И МИКРООРГАНИЗМОВ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ РОДА *RHODOCOCCLUS* ПО ОТНОШЕНИЮ К НЕФТЕПРОДУКТАМ В РАЗЛИЧНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ (ВОДА И ПОЧВА)**М.М. Герцен, Е.Д. Дмитриева***Тульский государственный университет, Тула, Россия,*

Поступление сырой нефти в экосистемы (водные и почвенные) является результатом утечки нефтепродуктов [1]. В настоящее время около 80 % земель загрязнено продуктами нефтяного происхождения (углеводороды, растворители и т. д.), используемыми в качестве источника энергии в нефтяной промышленности [2]. Поэтому актуально проведение исследований, направленных на решение проблем, связанных с загрязнением почвенной и водной среды в результате разлива нефтепродуктов.

Рекультивация загрязненных сред с использованием микроорганизмов-нефтедеструкторов заключается в одновременной активации аборигенной микрофлоры почвы бактериями и параллельной интродукцией адаптированных к загрязнителю и условиям внешней среды штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов [3]. При введении в токсичную среду природных биологически активных полимеров – гуминовых кислот (ГК), благодаря их сложной внутримолекулярной организации, может происходить не только сорбция нефтяных углеводородов, но и повышение метаболической активности микроорганизмов-нефтедеструкторов за счет ГК, выступающих в качестве питательного субстрата [4]. Микробиотические особенности гуминовых кислот способствуют проявлению сильной деструктивной активности при попадании в почвенную среду, загрязненную углеводородами нефти.

Цель работы – определить связывающую и детоксицирующую способность биокомпозиции на основе гуминовых кислот торфов и микроорганизмов-нефтедеструкторов рода *Rhodococcus* по отношению к нефтепродуктам в почвенных и водных экосистемах.

Объекты исследования – гуминовые кислоты торфов различного генезиса Тульской области: тростникового низинного торфа (ТНТ), черноольхового низинного торфа (ЧНТ), сфагнового верхового торфа (СВТ) и сфагнового переходного торфа (СПТ) [5]. Штаммы бактерий *Rhodococcus erythropolis* S67, *Rhodococcus erythropolis* X5 получены из лаборатории плазмид Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина РАН (г. Пущино). Данные штаммы входят в состав биопрепарата «МикроБак», применяемого для биоремедиации нефтезагрязненных территорий [6]. В качестве токсикантов выбраны: дизельное топливо (ДТ) с заправки Роснефть и нефть с нефтеперерабатывающего завода АО «ГАЗПРОМНЕФТЬ-МНПЗ». Эксперимент проводили в пресной воде при комнатной температуре. Растворы анализируемых гуминовых кислот готовили растворением навесок препаратов в 0.1 М NaOH в течение суток. Затем доводили до нейтрального значения pH с помощью pH-метра Анион 4154 добавлением 0.05 М HNO₃ или 0.05 М NaOH и до метки – 0.1 М NaNO₃. Микроорганизмы культивировали в полноценной среде Лурия-Бертани (ЛБ). Готовые среды стерилизовали автоклавированием в течение 30 мин при 120⁰ С. Бактерии выращивали в жидкой питательной среде ЛБ в течение 24 ч для получения инокулята. На первом этапе работы методом биотестирования определяли связывающую способность гуминовых кислот по отношению к нефтепродуктам в присутствии микроорганизмов рода *Rhodococcus* в водных средах. Тест-объектом являлся представитель гидрофитов – ряска малая, наиболее чувствительный объект к действию гуминовых кислот.

Установлено, что ГК торфов, не зависимо от их происхождения, оказывали стимулирующее действие на ростовые показатели гидрофита: происходило увеличение количества роста лопастей ряски по сравнению с контролем от 24 до 42 %. Максимальный прирост лопастей ряски наблюдался в присутствии ГК (ЧНТ) 42 %, минимальный – ГК (СПТ) 24 %, причиной является качественный и количественный состав ГК: в составе ГК (ЧНТ), состоящего преимущественно из лиственных пород, содержится большое количество лигнина [7], еще не окисленного до перехода в нерастворимый в щелочах остаток гуминовых кислот – гумин, поэтому, они отличаются большим значением молекулярных масс. Установлено, что использование лигниновых препаратов меняло динамику распределения основных метаболитов в растениях, продолжительность их развития, биометрические и биохимические показатели [8]

Для построения шкалы токсичности дизельного топлива и нефти проводили вегетационный эксперимент с использованием в качестве тест-отклика прирост лопастей ряски малой. Регистрацию тест-отклика проводили через 14 дней после начала эксперимента. Токсический эффект модельных загрязнителей оценивали ($T_{ЭТ}$) как уменьшение тест-отклика в присутствии модельного загрязнителя ($R_{ЭТ}$) по сравнению с контролем (R_0): $T_{ЭТ} = \frac{R_0 - R_{ЭТ}}{R_0} * 100 \%$.

Токсический эффект рассчитывали по формуле и строили зависимость токсического эффекта от концентрации модельного загрязнителя (на рис. 1). Токсичность нефтяных углеводородов зависит от содержания в них ароматических фракций, которые способны сохраняться в морской воде и в донных отложениях длительный период в силу своей стойкости к деградации. Алканы обладают не меньшей токсичностью, но деградация их происходит сравнительно быстрее. Кроме того, в присутствии нефтяных углеводородов токсичность других загрязняющих веществ, в частности металлов и хлорированных углеводородов, проявляется в большей степени. Наличие нефтяных углеводородов и масел в донных отложениях способствует интенсивному накоплению в них хлорированных углеводородов и металлов. С другой стороны, процесс перехода других загрязняющих веществ из донных отложений в воду в присутствии нефти замедляется [9]. Значения эффективных концентраций нефти, вызывающих 50 % снижение тест-отклика для ДТ и нефти, были практически одинаковыми и составили 0,5 и 1 % об., соответственно. Но т.к. рабочие концентрации гуминовых кислот и микроорганизмов *Rhodococcus* – 2 и 5 % об. нами было решено увеличить концентрацию до 2 % об. загрязнителя в водной среде.

Для оценки токсического эффекта в системе, состоящей из гуминовых кислот, микроорганизмов рода *Rhodococcus* и модельного загрязнителя, сравнивали тест-отклик контроля и контроля в присутствии микроорганизма рода *Rhodococcus* и модельного загрязнителя: $T_{М/0+ЭТ} = \frac{R_0 - R_{М/0+ЭТ}}{R_0} * 100 \%$ Количественно детоксицирующую способность (D) ГК оценивали с помощью следующего уравнения: $D = \left(\frac{1 - \frac{R_{ГК} - R_{ГК+ЭТ}}{R_{ГК}}}{\frac{R_0 - R_{М/0+ЭТ}}{R_0}} \right) * 100 \%$

Значения коэффициентов детоксикации при совместном присутствии ГК и микроорганизмов рода *Rhodococcus* и в отдельном присутствии при добавлении модельных загрязнителей представлены на рис. 2.

В присутствии дизельного топлива на лопастях ряски наблюдался некроз, добавление в раствор гуминовых кислот снижало степень некроза. Максимальный детоксицирующий эффект на рост лопастей ряски малой в присутствии дизельного топлива концентрации 2 % об. продемонстрировали ГК (СВТ) и ГК(ТНТ) 52 и 43 % соответственно. Гуминовые кислоты оказывают детоксицирующий эффект за счет связывания модельных загрязнителей и стимулирования роста тест-объекта. В присутствии углеводородокисляющих микроорганизмов *Rh. erythropolis* S67 и X5 детоксицирующий эффект увеличивался. Наилучшие показатели у микроорганизмов *Rh.erythropolis* S67 и ГК (ТНТ) или ГК (СВТ) 72 и 69 % соответственно, также в данных вариантах опыта наблюдалось увеличение длины корней у ряски. Максимальный показатель детоксикации дизельного топлива в присутствии *Rh. erythropolis* X5и ГК (СВТ) 76 %, а также максимальный показатель длины корня, исследуемого тест-объекта.

Присутствие гуминовых кислот в растворе оказывало детоксицирующий эффект на исследуемый тест-объект. Можно предположить, что присутствие в ГК как полярных, так и неполярных структур может вносить вклад в снижение токсичности нефти, обусловленное как непосредственным связыванием ГК нефтяных углеводородов, так и стимулирующим воздействием ГК на тест-объект, проявляющееся в повышении сопротивляемости ряски нефтяному загрязнению водной биоты. Максимальный коэффициент детоксикации у ГК (ТНТ) и ГК (СВТ) 31 % и 27 % соответственно.

Добавление микроорганизмов рода *Rhodococcus* увеличивало показатели коэффициента детоксикации. Максимальные значения у систем, содержащих микроорганизмы *Rh. erythropolis* S67 или ГК (ТНТ), или ГК (СВТ) 45 % и 35 %, и микроорганизмы *Rh. erythropolis* X5 или ГК (СВТ), или ГК (ТНТ) 38 % и 35 % соответственно, что превышает показатели контроля, а также вариантов опыта в присутствии одних ГК и одних микроорганизмов, что еще раз доказывает стимулирующий эффект, оказываемый гуминовыми кислотами на растения и микроорганизмы, а так же перспективность применения химико-биологического сорбента на основе гуминовых кислот торфов и микроорганизмов *Rh. erythropolis* S67 и X5.

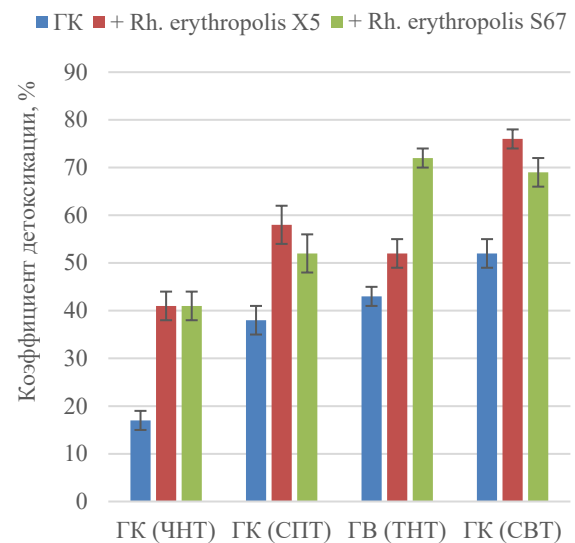
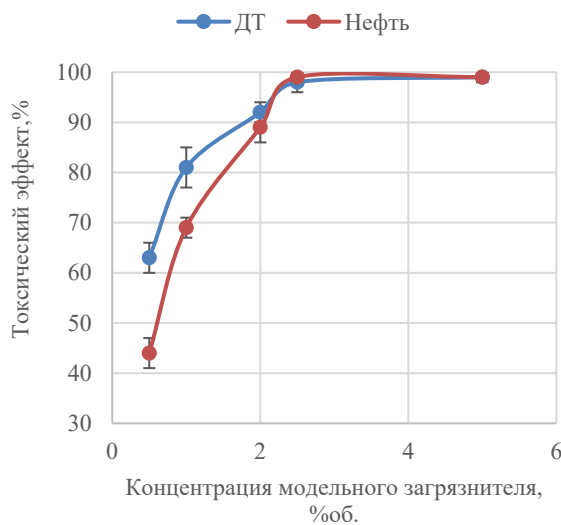


Рис. 1 Токсический эффект, оказываемый модельными загрязнителями на рост лопастей ряски

Рис. 2 Детоксирующий эффект биоконпозиции в присутствии ДТ 2 % об.

Нефть и нефтепродукты в зависимости от фракционного состава и количества могут оказывать определенное токсическое действие на некоторые организмы. Содержание нефти в почве даже небольшой концентрации (0,15 %) снижает урожай зерновых культур. Так как изменение уровня токсичности нефтяного загрязнения в присутствии ГК может быть обусловлено их собственным воздействием на тест-объект, то одновременно с детоксирующим эффектом оценивали и собственное влияние ГК на тест-объект – биостимулирующее действие.

Изучали влияние на всхожесть и энергию прорастания семян внесения в субстрат углеводородсодержащих загрязнителей, гуминовых кислот и микроорганизмов. Энергию прорастания семян определяли на 3-й день после посадки, всхожесть – на 7-ой. Присутствие в модельном грунте нефти приводило к снижению энергии прорастания и всхожести семян в 4 раза.

Результаты вегетационного опыта в варианте с загрязнителем и микроорганизмами – нефтедеструкторами *Rh. erythropolis S67* и *X5* показали, что наиболее выраженный положительный эффект от внесения указанных микроорганизмов наблюдается в условиях загрязнения нефтью: энергия прорастания и всхожесть превышают аналогичные показатели контрольной группы в 2,5 – 2,8 раза (*Rh. erythropolis X5*) и в 3,3 – 3,9 раза (*Rh. erythropolis S67*) соответственно. Как видно из рис. 3.44–3.45, внесение *Rh. erythropolis S67* в грунт привело к частичному снятию токсичности нефти по отношению к растениям кресс-салата.

В опыте при совместном применении гуминовых кислот, микроорганизмов – нефтедеструкторов и загрязнителей проросших семян на 3-й и 7-й день после начала эксперимента было больше, чем во всех остальных вариантах опыта. Наибольший стимулирующий эффект по сравнению с контролем был выявлен в следующих вариантах: ГК (СВТ) + *Rh.erythropolis X5*+нефть; ГК (СПТ) + *Rh.erythropolis X5* + нефть; ГК (ТНТ) + *Rh.erythropolis S67* + нефть. Энергия прорастания в данных вариантах опыта превышала контроль (загрязнитель+песок) на 36 %, 70 %, 65 % и 61 %, а всхожесть на 36 %, 70 %, 64 % и 60 % соответственно.

Во всех вариантах опыта микроорганизмы *Rh. erythropolis X5* давали лучшие показатели в сочетании с гуминовыми кислотами сфагнового торфа, а микроорганизмы *Rh. erythropolis S67* – с гуминовыми кислотами тростникового низинного торфа. Следует отметить, что энергия прорастания и всхожесть семян кресс-салата в данных вариантах превышала аналогичные показатели, полученные в опыте на прокаленном песке с поливом дистиллированной водой.

Эксперимент показал, что совместное применение гуминовых кислот и микроорганизмов – нефтедеструкторов в условиях загрязнения субстрата дизельным топливом не приводит к значимому изменению энергии прорастания или всхожести семян кресс-салата.

Таким образом, методом биотестирования было показано, что гуминовые кислоты оказывают положительное влияние на посевные качества семян кресс-салата, а также повышают жизнеспособность растений в условиях загрязнения нефтью.

Полученные в ходе эксперимента данные показали перспективность совместного применения ГК (СВТ) + *Rh.erythropolys* X5, ГК (СПТ) + *Rh.erythropolys* X5, ГК (ТНТ) + *Rh.erythropolys* S67 в условиях нефтяного загрязнения.

Связывание углеводов гуминовыми кислотами не является основным фактором, определяющим интенсивность прорастания семян кресс-салата, положительное влияние на посевные качества тест-культуры в условиях загрязнения нефтью и нефтепродуктами связано в большей степени со стимулирующим действием гуминовых кислот за счет проникновения низкомолекулярных фракций молекул гуминовых кислот внутрь семени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Войно Д.А. Процесс очистки природных вод от гуминовых веществ с использованием электроразрядного реактора: Дисс... канд. техн. наук // Томск, Томский политехнический институт. 2016, 124 с.
1. Иваненко Н.В. Экологическая токсикология. Учебное пособие. Владивосток: Изд-во ВГУЭС. 2006. 108 с.
2. Ганиев М.М., Недорезков В.Д. Химические средства защиты растений. М.: Колосс. 2006. 248 с.
3. Гречищева Н.Ю., Перминова И.В., Мещеряков С.В. Перспективность применения гуминовых веществ в технологиях очистки нефтезагрязненных почв. // Экология и промышленность России. 2016. Том 20. № 1. С. 30–36.
4. Бойкова О.И., Волкова Е.М. Химические и биологические свойства торфов Тульской области // Известия ТулГУ. Естественные науки. 2013. № 3. С. 253–264.
5. Нечаева И.А. Биodeградация углеводов нефти психротрофными микроорганизмами-деструкторами: дисс... канд. биол. наук. Пушино, 2009. 175 с.
6. Дмитриева Е.Д., Леонтьева М.М., Сюндюкова К.В. Молекулярно-массовое распределение гуминовых веществ и гиматомелановых кислот торфов различного генезиса Тульской области. // Химия растительного сырья. 2017. № 4. С. 187–194.
7. Murygina V. P., Arinbasarov M., Kalyuzhnyi S. Bioremediation of oil polluted aquatic systems and soils with the novel preparation "Rhoder" // Biodegradation 11. 2000. P. 385–389.
8. Гречищева Н.Ю., Щукина В.Д., Холодов В.А., Лазарева Е.В., Парфенова А.М., Мещеряков С.В., Перминова И.В. Оценка способности гуминово-глинистых комплексов стабилизировать эмульсии нефти в воде. // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. 2014. №. 9. С. 51–55.