

## Детоксицирующая способность гуминовых веществ торфов и микроорганизмов рода *Rhodococcus* по отношению к нефтепродуктам в водных средах

© 2021. М. М. Герцен, аспирант, Е. Д. Дмитриева, к. х. н., доцент, Тульский государственный университет, 300012, Россия, г. Тула, пр. Ленина, д. 92, e-mail: mani.leontyeva@gmail.com

Методом биотестирования изучено влияние гуминовых веществ отдельно и совместно с бактериями-нефтедеструкторами рода *Rhodococcus* на тест-объект – ряску малую по отношению к нефтепродуктам. Максимальный прирост лопастей ряски в присутствии гуминовых веществ черноольхового низинного торфа 42%, минимальный – гуминовых веществ сфагнового переходного торфа 24%. Доказано, что гуминовые вещества торфов способны снижать токсический эффект модельных загрязнителей: гексадекана на 3–23%; дизельного топлива – 8–40%; нефти – 6–16%. Определена детоксицирующая способность гуминовых веществ и микроорганизмов рода *Rhodococcus* по отношению к углеводородам нефти: максимальные значения коэффициентов детоксикации у микроорганизмов *R. erythropolis* S67 и гуминовых веществ тростникового низинного и сфагнового верхового торфа 95–79% и 84–68%; *R. erythropolis* X5 и гуминовых веществ сфагнового верхового и сфагнового переходного торфа 82–68% и 71–63%. Гуминовые вещества способны стимулировать рост микроорганизмов-нефтедеструкторов, активизируя их ферментативную систему, тем самым, способствуя максимальному окислению углеводородов нефти. Благодаря своим поверхностно- и биологически активным свойствам, совместное применение гуминовых веществ и микроорганизмов-нефтедеструкторов способно обеспечить экологически безопасную и эффективную ремедиацию загрязнённых акваторий.

**Ключевые слова:** гуминовые вещества, нефть, нефтепродукты, микроорганизмы-нефтедеструкторы, связывающая способность, коэффициенты детоксикации.

## Binding capacity of humic substances of peats in the relation to petroleum products in the presence of microorganisms of the genus *Rhodococcus* in aqueous media

© 2021. М. М. Gertsen ORCID: 0000-0002-0026-4933\*  
E. D. Dmitrieva ORCID: 0000-0001-6408-5873\*  
Tula State University,  
92, Lenina Ave., Tula, Russia, 300012,  
e-mail: mani.leontyeva@gmail.com

The biotesting method was used to study the effect of humic substances separately and together with oil degrading microorganisms of the genus *Rhodococcus* on a test object – duckweed in the relation to oil products. The maximum growth of duckweed blades in the presence of humic substances of black alder fen peat is 42%, the minimum – humic substances of sphagnum transition peat – 24%. It was found that humic substances of peats can reduce the toxic effect of model pollutants: hexadecane by 3–23%; diesel fuel by 8–40%; oil by 6–16%. The detoxifying ability of humic substances and microorganisms of the genus *Rhodococcus* in the relation to oil hydrocarbons was determined: the maximum values of the detoxification coefficients of microorganisms *R. erythropolis* S67 and humic substances of reed fen and sphagnum high-moor peat are 95–79% and 84–68%, respectively; *R. erythropolis* X5 and humic substances of sphagnum high-moor and sphagnum transition peat 82–68% and 71–63%. Humic substances are able to stimulate the growth of oil degrading microorganisms, activating their enzymatic system, thereby contributing to the maximum oxidation of oil hydrocarbons. The data on the detoxifying ability of humic substances and oil degrading microorganisms can serve as the basis for the development of a new generation of biocompositions that efficiently utilize oil and oil products in environmental objects (water and soil). Due to its surface and biologically active properties, the combined use of humic substances and oil degrading microorganisms can provide environmentally friendly and effective remediation of contaminated water areas.

**Keywords:** humic substances, petroleum, petroleum products, oil-destructive microorganisms, binding capacity, detoxification coefficients.

В настоящее время большой интерес представляет поиск способов детоксикации и утилизации углеводов нефти [1, 2]. Актуальной становится биodeградация нефтяных веществ в загрязнённых акваториях, основанная на применении бактерий, использующих как источник энергии углеводороды нефти, что обеспечивает высокий уровень детоксикации экосистем в связи со снижением уровня загрязнений до фоновых значений [3]. Добавление в систему дополнительных агентов, сорбирующих нефтепродукты, являющихся активаторами аборигенной микрофлоры загрязнённых объектов, позволит усилить эффективность биопрепаратов, содержащих штаммы активных бактерий, разлагающих углеводороды [4].

Гуминовые вещества (ГВ) – природные, экологически чистые соединения, эффективно эмульгирующие углеводороды нефти, активизирующие микробиологические процессы, повышающие деструкцию нефтепродуктов и ускоряющие очистку акваторий [5]. Известно стимулирующее действие ГВ на рост и развитие бактерий, повышение их стрессоустойчивости к различным абиотическим факторам среды [6, 7]. Физиологическая активность гуминовых веществ по отношению к некоторым прокариотическим организмам [8], вызывает естественное стимулирование аборигенной микрофлоры экосистемы, а наличие гидрофобного каркаса в их структуре определяет способность связывать углеводороды нефти в устойчивые комплексы [9].

Цель работы – оценить детоксицирующую способность гуминовых веществ и бактерий рода *Rhodococcus* по отношению к нефтепродуктам.

### Объекты и методы исследования

Объекты исследования – гуминовые вещества торфов Тульской области: тростникового низинного (ТНТ), чёрноольхового низинного (ЧНТ), сфагнового верхового (СВТ) и сфагнового переходного (СПТ) [10–12]; штаммы бактерий *Rhodococcus erythropolis* S67, *Rhodococcus erythropolis* X5 получены из лаборатории плазмид Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина РАН (г. Пущино) [13]. Тест-объект в методе биотестирования – ряска малая (*Lemna minor*). Модельные токсиканты: гексадекан, дизельное топливо (ДТ) с заправки «Роснефть» и нефть с нефтеперерабатывающего завода АО «ГАЗПРОМНЕФТЬ-МНПЗ».

Растворы ГВ в концентрации 50 мг/л готовили растворением ГВ в 0,1М NaOH, добавлением 0,05М HNO<sub>3</sub> или 0,05М NaOH добивались нейтрального значения pH (контроль pH-метром «Анион 4154»), фоновый электролит – 0,1М NaNO<sub>3</sub> [14]. Бактерии культивировали в полноценной среде Лурия–Бертани (ЛБ) при температуре 23±2 °С [14, 15].

В стеклянные ёмкости вносили 50 мл дистиллированной воды, ГВ концентрации 50 мг/л, инокулят *R. erythropolis* S67 и X5 количество посевной дозы 10<sup>5</sup>–10<sup>6</sup> КОЕ/мл и токсикант 2% об. О действии модельных загрязнителей и ГВ наблюдали по приросту лопастей ряски малой за 10 суток. Контроль – рост растений в дистиллированной воде. Результаты экспериментов выражали как прирост лопастей ряски в процентах относительно контроля [11]. Варианты опыта: 1. Контроль (дистиллированная вода); 2. Контроль + модельный загрязнитель; 3. Дистиллированная вода + ГВ; 4. Дистиллированная вода + ГВ + модельный загрязнитель; 5. Дистиллированная вода + ГВ + бактерии рода *Rhodococcus* + модельный загрязнитель. Результаты экспериментов и последующая обработка проводилась с применением стандартных методов математической статистики ( $n = 6, P = 0,95$ ).

### Результаты и обсуждение

Прежде всего, определяли влияние ГВ на рост ряски малой (рис. 1).

Установлено, что анализируемые ГВ (50 мг/л) стимулируют рост гидрофита: максимальный прирост лопастей ряски в присутствии ГВ (ЧНТ) 42%, минимальный – ГВ (СПТ) 24%. Черноольховый низинный торф состоит в основном из листовенных пород, влияющих на содержание лигнина во фракциях ГК [10]. Известно, что применение лигниновых агентов меняет динамику распределения основных метаболитов в растениях, продолжительность их развития, биометрические и биохимические показатели [15].

Для выбора рабочей дозы модельного загрязнителя строили шкалу токсичности, варьируя концентрацию модельного загрязнителя в пределах 0,5–5% об [12, 15]. Тест-отклик регистрировали через 14 дней после начала эксперимента. Токсический эффект загрязнителей ( $T_{ст}$ ) – уменьшение тест-отклика в присутствии токсиканта ( $R_{ст}$ ) по сравнению с контролем ( $R_0$ ):

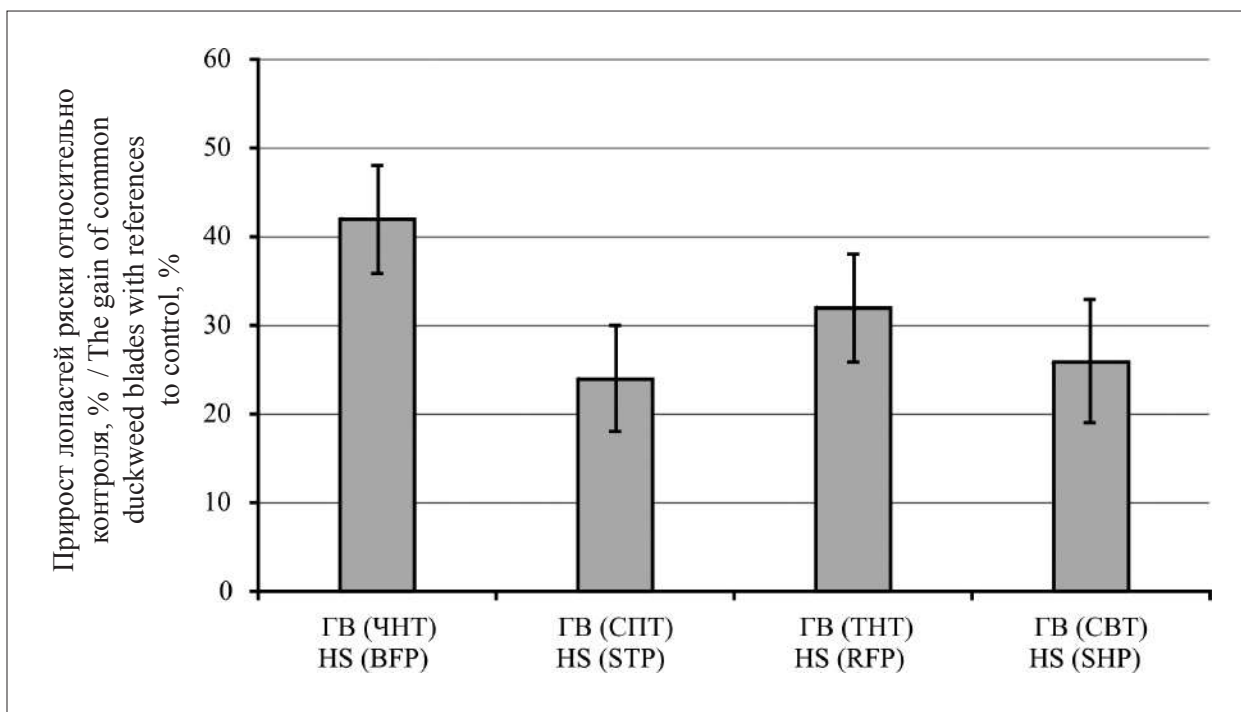


Рис. 1. Влияние гуминовых веществ на прирост лопастей ряски малой:

ГВ – гуминовые вещества; ЧНТ – чёрноольховый низинный торф;  
 СПТ – сфагновый переходный торф; ТНТ – тростниковый низинный торф;  
 СВТ – сфагновый верховой торф

Fig. 1. Influence of humic substances on the growth of blades of common duckweed:  
 HS – humic substances; BFP – black alder fen peat; STP – sphagnum transitional peat;  
 RFP – reed fen peat; SHP – sphagnum high moor peat

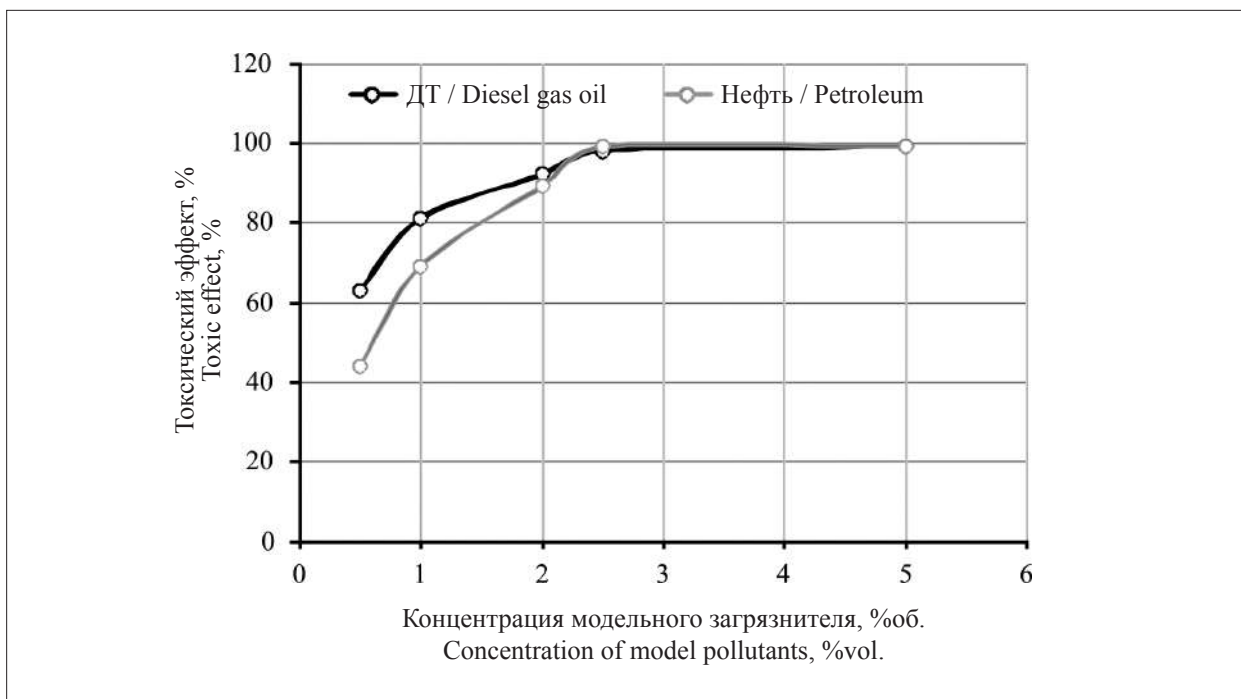


Рис. 2. Токсический эффект модельных загрязнителей

Fig. 2. Toxic effect of model pollutants

$$T_{\text{эт}} = \frac{R_0 - R_{\text{эт}}}{R_0} \cdot 100\%. \quad (1)$$

Токсический эффект рассчитывали по формуле (1) и строили зависимость токсического эффекта от концентрации загрязнителя (рис. 2).

Степень токсичности углеводородов нефти связана с содержанием в них ароматических фракций, способных сохраняться в морской воде, в донных отложениях в течение долгого времени в силу своей стойкости к деградации. Парафины обладают не меньшей токсичностью, но их разложение происходит значительно быстрее, чем у полиароматических углеводородов [16].

Рассчитывали токсический эффект модельного загрязнителя в присутствии ГВ ( $T_{\text{ГВ+эт}}$ ), контролем служил тест-отклик в присутствии ГВ ( $R_{\text{ГВ}}$ ) (табл. 1):

$$T_{\text{ГВ+эт}} = \frac{R_{\text{ГВ}} - R_{\text{ГВ+эт}}}{R_{\text{ГВ}}} \cdot 100\%. \quad (2)$$

Максимальное снижение токсического эффекта загрязнителей у ГВ (СВТ): в 1,5–2 раза меньше, чем в контрольных образцах с отстойной водой, содержащих гексадекан и дизельное топливо; минимальное – у ГВ (ЧНТ), что на 3% меньше относительно контроля. В варианте с нефтью максимальное снижение токсической нагрузки оказывают ГВ (ТНТ), что на 16% меньше, чем в контроле, благодаря развитой периферической и ароматической части данных ГВ происходит связывание углеводородов нефти в нетоксичные аддукты.

Изучено действие загрязнителей на рост ряски малой в присутствии ГВ и микроорганизмов-нефтедеструкторов рода *Rhodococcus* и количественно проанализирована детоксицирующая способность полученной биокомпозиции, с определением коэффициента детоксикации [15], при этом сравнивали тест-отклик контроля и контроля

в присутствии бактерий рода *Rhodococcus* совместно с модельным загрязнителем, так как оценивали действие только ГВ на исследуемый тест-объект:

$$T_{\text{м/о+эт}} = \frac{R_0 - R_{\text{м/о+эт}}}{R_0} \cdot 100\%. \quad (3)$$

Количественно детоксицирующее действие ( $D$ ) ГВ оценивали, как относительное уменьшение токсического эффекта модельного токсиканта в присутствии ГВ по сравнению с исходным токсическим эффектом загрязнителя:

$$D = \frac{T_{\text{эт}} - T_{\text{ГВ+эт}}}{T_{\text{эт}}} \quad (4)$$

$$D = \frac{T_{\text{м/о+эт}} - T_{\text{ГВ+эт}}}{T_{\text{м/о+эт}}} \quad (5)$$

Суммируя выше представленные уравнения, коэффициент детоксикации ( $D$ ) определяли через величины соответствующих тест-откликов по уравнениям:

$$D = \frac{1 - \frac{R_{\text{ГВ}} - R_{\text{ГВ+эт}}}{R_{\text{ГВ}}}}{\frac{R_0 - R_{\text{эт}}}{R_0}} \cdot 100\% \quad (6)$$

$$D = \frac{1 - \frac{R_{\text{ГВ}} - R_{\text{ГВ+эт}}}{R_{\text{ГВ}}}}{\frac{R_0 - R_{\text{м/о+эт}}}{R_0}} \cdot 100\% \quad (7)$$

Данный расчёт позволяет оценить степень детоксицирующего эффекта, вызываемого уменьшением концентрации модельного токсиканта, на фоне собственного воздействия ГВ на тест-объект. Значение коэффициента детоксикации зависит только от связывающей способности ГВ по отношению к модельному загрязнителю.

Таблица 1 / Table 1  
Токсический эффект загрязнителей в присутствии гуминовых веществ  
Toxic effect of pollutants in the presence of humic substances

Образец Sample	Гексадекан Hexadecane	Дизельное топливо Diesel gas oil	Нефть Petroleum
Контроль / Control	74±1	92±3	89±5
ГВ (ЧНТ) / HS (BFP)	72±3	84±4	83±7
ГВ (СПТ) / HS (STP)	73±3	66±5	78±6
ГВ (ТНТ) / HS (RFP)	67±2	61±3	73±3
ГВ (СВТ) / HS (SHP)	52±3	52±4	76±2

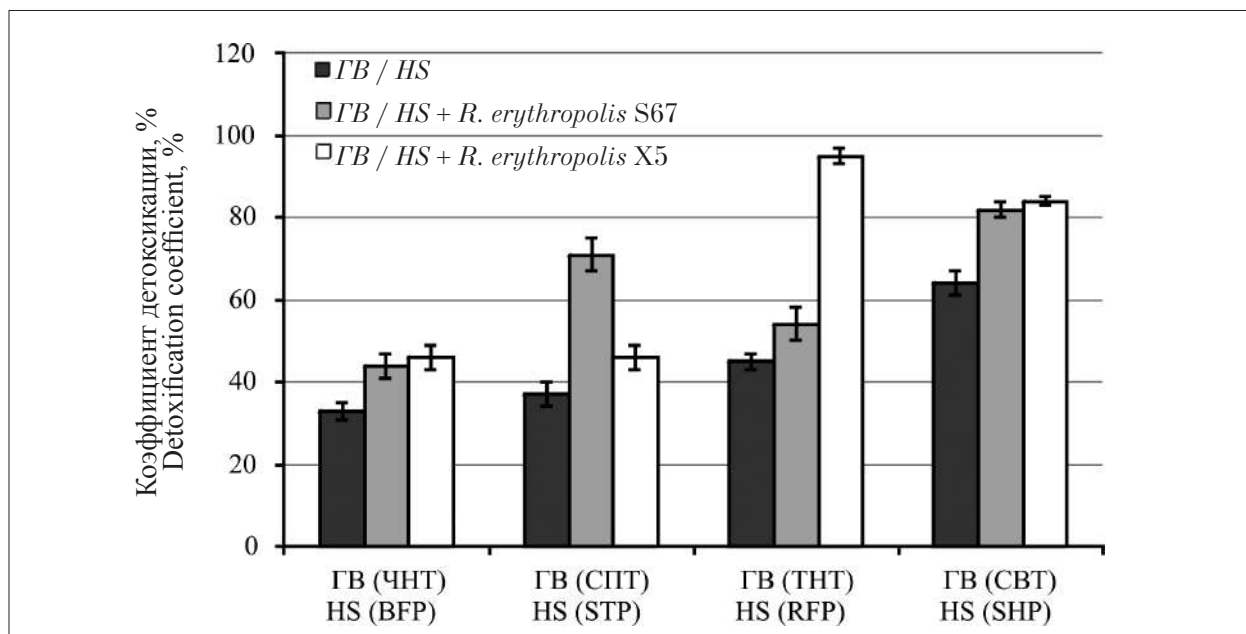


Рис. 3. Детоксицирующий эффект ГВ по отношению к гексадекану  
 Fig. 3. Detoxification effect of HS on hexadecane

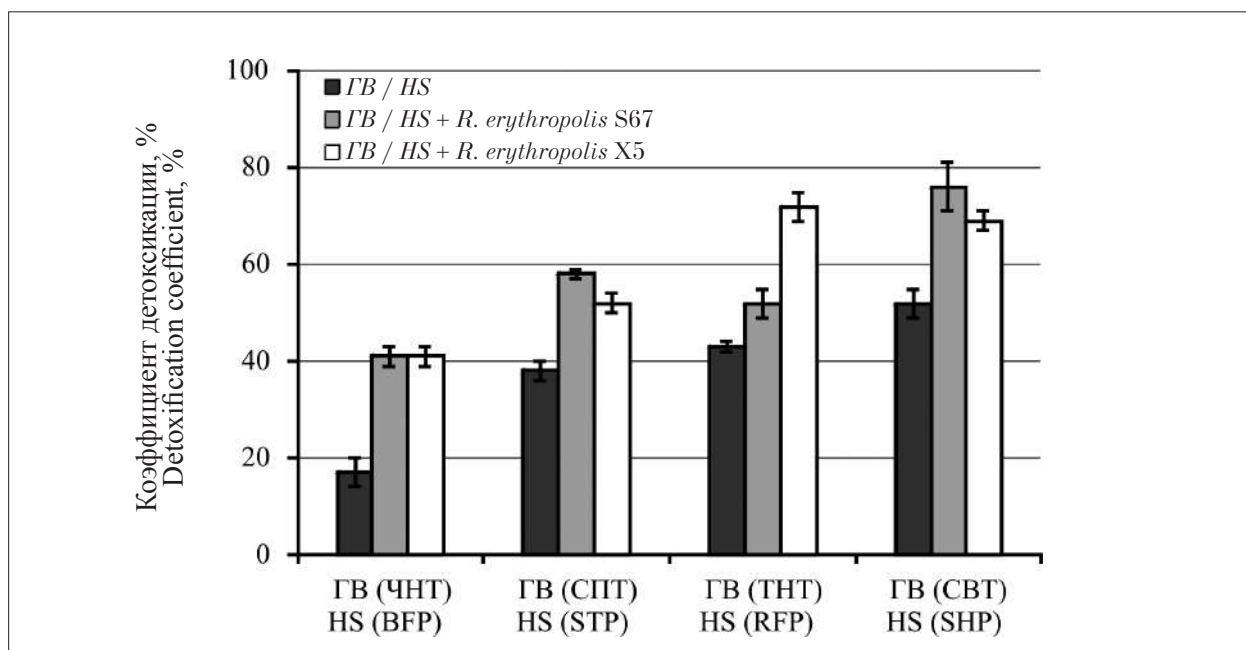


Рис. 4. Детоксицирующий эффект ГВ по отношению к ДТ  
 Fig. 4. Detoxification effect of HS on diesel gas oil

Выявлено снижение токсического эффекта гексадекана ГВ на рыску малую. Максимальный детоксицирующий эффект проявляли ГВ (СВТ) и ГВ (ТНТ) 64–56 и 45–51% соответственно (рис. 3). Бактерии *R. erythropolis* S67, X5 увеличивали детоксицирующий эффект ГВ на 6–47%. Значения *D* в присутствии микроорганизмов *R. erythropolis* S67, ГВ (ТНТ), ГВ (СВТ) 95–79% и 84–68%;

*R. erythropolis* X5 и ГВ (СВТ), (СПТ) 82–68% и 71–63% соответственно, что согласуется с ранее полученными результатами [17].

Максимальный детоксицирующий эффект по отношению к дизельному топливу продемонстрировали ГВ (СВТ) и ГВ (ТНТ) 52 и 43% соответственно (рис. 4). Углеводородоокисляющие микроорганизмы *R. erythropolis* S67 и X5 увеличивают детоксицирующий

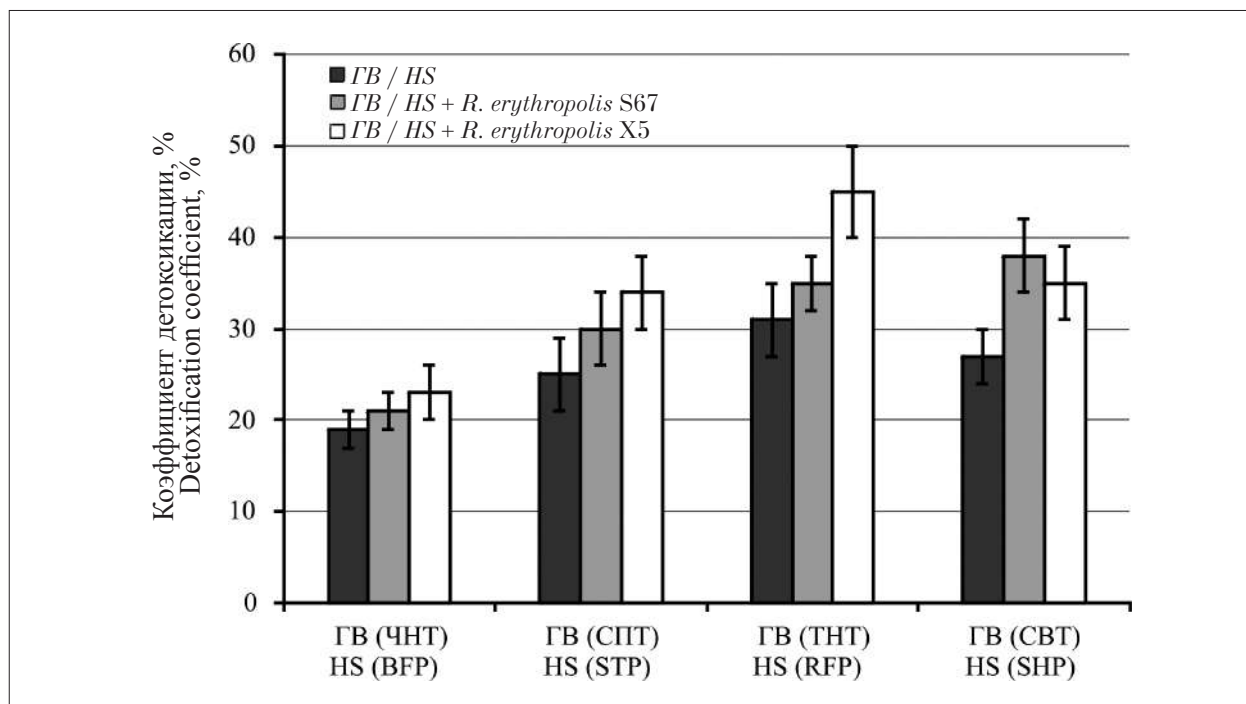


Рис. 5. Детоксирующий эффект ГВ по отношению к нефти  
Fig. 5. Detoxification effect of HS on petroleum

эффект ГВ. Наилучшие показатели у биокомпозиции на основе микроорганизмов *R. erythropolis* S67 и ГВ (ТНТ), ГВ (СВТ) 72 и 69% соответственно. Максимальный показатель детоксикации дизельного топлива продемонстрировали микроорганизмы *R. erythropolis* X5 и ГВ (СВТ) 76% (рис. 4).

Наличие в составе ГВ как полярных, так и неполярных компонентов вносит вклад в снижение уровня токсичности нефти и нефтепродуктов, обусловленное и непосредственным связыванием ГВ нефтяных углеводородов, и стимулирующим действием ГВ на тест-объект, которое проявляется в повышении сопротивляемости ряски малой нефтяному загрязнению. Максимальный коэффициент детоксикации у ГВ (ТНТ) и ГВ (СВТ) 31 и 27% соответственно. Добавление микроорганизмов рода *Rhodococcus* увеличивало значения коэффициентов детоксикации: максимальные значения у штаммов *R. erythropolis* S67 и ГВ (ТНТ), ГВ (СВТ) 45 и 35%; *R. erythropolis* X5 и ГВ (СВТ), ГВ (ТНТ) 38 и 35% соответственно (рис. 5).

Полученные значения коэффициентов детоксикации могут свидетельствовать о перспективности применения ГВ и микроорганизмов-нефтедеструкторов *R. erythropolis* S67 и X5 в качестве экологически безопасных и эффективных ремедиантов загрязнённых нефтью акваторий.

## Заключение

Методом биотестирования определена детоксирующая способность ГВ совместно с бактериями рода *Rhodococcus* по отношению к углеводородам нефти: максимальные значения коэффициентов детоксикации у микроорганизмов *R. erythropolis* S67 и ГВ (ТНТ) и ГВ (СВТ) 95–79% и 84–68%; *R. erythropolis* X5 и ГВ (СВТ) и (СПТ) 82–68% и 71–63%.

Установлено, что ГВ торфов способны снижать токсический эффект модельных загрязнителей на тест-объект – ряску малую: гексадекана на 3–23%; дизельного топлива – 8–40%; нефти – 6–16%.

Полученные данные по детоксирующей способности ГВ и микроорганизмов-нефтедеструкторов могут служить основой для разработки биокомпозиции нового поколения, эффективно утилизирующей нефть и нефтепродукты в объектах окружающей среды (вода и почва).

## References

- Gritsenko A.I., Akopova G.S., Maksimov V.M. Ecology. Oil and gas. Moskva: Nauka, 1997. 598 p. (in Russian).
- Hernandez-Soriano M.C. Environmental risk assessment of soil contamination. London: IntechOpen, 2014. 920 p. doi: 10.5772/57086



3. Peng F., Liu Z., Wang L., Shao Z. An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants // *Journal of Applied Microbiology*. 2007. V. 102. No. 6. P. 1603–1611. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03267.x
4. Semenova A.A., Zaynulgabidinov E.R., Madyakina M.V., Yuranets-Luzhaeva R.Ch., Shulaev M.V., Petrov A.M. The impact of the application of biologically active drugs on the toxicological characteristics and destructive activity of oil-contaminated soil in the course of reclamation work // *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*. 2015. No. 18 (12). P. 178–182 (in Russian).
5. Chukov S.N. Formation and role of humic substances in biosphere // *Theoretical and Applied Ecology*. 2015. No. 1. P. 8–12 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2015-1-008-012
6. Koronelli T.V. Principles and methods for intensifying the biological destruction of hydrocarbons in the environment // *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 1996. No. 32 (6). P. 579–585 (in Russian).
7. Utombaeva A.A., Petrov A.M., Zaynulgabidinov E.R., Madyakina M.V., Shulaev M.V. The study of the toxicological characteristics of oil-contaminated soil in the process of remediation using biologically active substances // *Vestnik KazNTU*. 2017. V. 20. No. 14. P. 143–145 (in Russian).
8. Boykova O.I., Volkova E.M. Chemical and biological properties of peat in Tula region // *Izvestiya TulGU. Estestvennyye nauki*. 2013. No. 3. P. 253–264 (in Russian).
9. Dmitrieva E.D., Leonteva M.M., Syundyukova K.V. Molecular mass distribution of humic substances and himatomelanin acids of peats of different genesis in the Tula region // *Khimiya rastitelnogo syrya*. 2017. No. 4. P. 187–194 (in Russian). doi: 10.14258/jcprm.2017041933
10. Dmitrieva E.D., Efimova E.N., Siundiukova K.V., Perelomov L.V. Surface properties of humic acids from peat and sapropel of increasing transformation // *Environmental chemistry letters*. 2015. V. 13. No. 2. P. 197–202. doi: 10.1007/s10311-015-0497-3
11. Perminova I.V., Hatfield K., Hertkorn N. Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice. Dordrecht, Springer, 2005. 506 p. doi: 10.1007/1-4020-3252-8
12. Shirshin E.A., Budylin G.S., Grechischeva N.Yu., Fadeeva V.V., Perminova I.V. Experimental evidence of incomplete fluorescence quenching of pyrene bound to humic substances: implications for KOC measurements // *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2016. No. 15. P. 889–895. doi: 10.1039/C6PP00052E
13. Dagurov A.V., Khokhlova E.M., Stom D.I. Effect of humates on oil products // *V mire nauchnykh otkrytiy*. 2010. No. 4–14 (10). P. 159–160 (in Russian).
14. Evans C.G.T., Herbert D., Tempest D.B. The continuous cultivation of microorganisms // *Methods in Microbiology*. 1970. No. 2. P. 277–327. doi: 10.1016/S0580-9517(08)70227-7
15. Salem K.M., Grechishcheva N.Yu., Perminova I.V., Meshcheryakov S.V., Bludova L.N. The study of the detoxifying ability of humic preparations in the relation to oil pollution of soil // *Zashchita okruzhayushchey sredy v neftegazovom komplekse*. 2004. No. 1. P. 34–37 (in Russian).
16. Dzhamalov R.G. Engineering geoecology: basics of hydrogeology, engineering geology, geocryology: a textbook. Dubna: Gos. un-t “Dubna”, 2017. 350 p. (in Russian).
17. Dmitrieva E.D., Karimova V.T. Binding capacity of humic substances of peat from Tula region in the presence of microorganisms of oil destructors of the genus *Rhodococcus* to hexadecane // *Vestnik TvGU. Seriya: Khimiya*. 2018. No. 2. P. 145–157 (in Russian).