

ВЛИЯНИЕ БИОКОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ И МИКРООРГАНИЗМОВ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ НА ЭМУЛЬГИРОВАНИЕ НЕФТИ В УСЛОВИЯХ АБИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

Е.Д. Дмитриева, М.М. Герцен

Тульский государственный университет», г. Тула

Определена эмульгирующая способность биоконпозиций на основе гуминовых кислот и микроорганизмов-нефтедеструкторов рода *Rhodococcus* по отношению к нефти: качественный анализ нефтяных пленок показал, что максимальной нефтеутилизирующей способностью не зависимо от условий абиотического стресса (повышенной солености среды и пониженной температуры) обладают биоконпозиции на основе гуминовых кислот сфагнового верхового торфа + бактерии *Rh. erythropolis X5* и гуминовых кислот тростникового низинного торфа + бактерии *Rh. erythropolis S67*. Установлено, что высокая степень биодegradации нефти при добавлении суспензии биоконпозиций объясняется механизмом двойного действия бактерий-нефтедеструкторов и гуминовых кислот в условиях нефтезагрязнения: бактерии окисляют нефтепродукты, растворяя их или эмульгируя посредством выделения биосурфактантов. Гуминовые кислоты же являются эффективными стабилизирующими агентами по отношению к нефтепродуктам и, кроме того, являются субстратом для роста внесенных штаммов микроорганизмов.

Ключевые слова: гуминовые кислоты, нефть, эмульгирование нефти, микроорганизмы-нефтедеструкторы, *Rhodococcus*, биоконпозиция.

При попадании сырой нефти в водную среду происходит процесс образования гидрофильных эмульсий нефти в воде. Эти эмульсии существенно изменяют свойства и характеристики разлитой нефти. Эмульсии содержат от 60 до 85% воды, что увеличивает объем разлитого материала в 3-5 раз по сравнению с исходным [1]. Особенно опасно, что при этом увеличивается вязкость разлитой нефти, что способствует превращению жидкого нефтепродукта в тяжелый полутвердый материал. Процесс эмульгирования значительно влияет на поведение пленок нефтепродуктов [1-3]. Нефтяные пленки представляют собой гидрофильные эмульсии нефти в воде, где дисперсная среда – вода, дисперсная фаза – нефть. На границе с воздухом поверхностный слой жидкости характеризуется определенным значением поверхностного натяжения (для нефтепродуктов 20-50 дН/см) [1-5], понижение которого возможно с помощью химических диспергентов, представляющих собой

смесь поверхностно-активных веществ (ПАВ): неионогенных и анионных ПАВ, стабилизаторов (5-10%) и добавок [1-2]. Недостатком применения химических диспергентов является их повышенная токсичность, а также вероятность вторичного загрязнения водных акваторий из-за содержания в них значительного количества растворителей. Использование для решения данной проблемы гуминовых кислот в качестве альтернативы молекулярным ПАВ весьма перспективно [2-4]. В настоящее время, наиболее эффективным и экологичным способом биоремедиации нефтезагрязненных территорий считается применение углеводородокисляющих микробиологических препаратов [6]. Поиск штаммов микроорганизмов, отличающихся повышенной углеводородокисляющей активностью, способных элиминировать нефтезагрязнения при определенных условиях окружающей среды относится к основной задаче получения таких препаратов, а также разработка технологий основанных на принципах зеленой химии с использованием нетоксичных веществ, активирующих рост и размножение микроорганизмов-нефтедеструкторов [6-7], к которым относятся гуминовые кислоты. Длительность, высокая трудоемкость анализа, необходимость наличия специальной дорогостоящей приборной и реактивной базы и высококвалифицированных специалистов затрудняет скрининг углеводородокисляющих микроорганизмов и веществ, стимулирующих элиминирование нефтепродуктов.

В связи с этим, целью работы являлось изучение влияния биокомпозиции на основе гуминовых кислот и микроорганизмов рода *Rhodococcus* на состояние пленок нефти в условиях абиотического стресса.

Экспериментальная часть

В работе в качестве объектов исследования выбраны гуминовые кислоты торфяных Тульской области, принадлежащие к различным типам и характеризующиеся наиболее высокими показателями встречаемости в регионе: тростниковый низинный (ТНТ), черноольховый низинный (ЧНТ), сфагновый верховой (СВТ), сфагновый переходный (СПТ) [8], выделенные и охарактеризованные по методикам, описанным в работах [9-11]. Рабочие растворы гуминовых кислот в концентрации 50 мг/л готовили в соответствии с предыдущими экспериментами [12-14]. В качестве микроорганизмов деструкторов нефти использовались штаммы бактерий *Rhodococcus erythropolis* S67, *Rhodococcus erythropolis* X5, предоставленные лабораторией плазмид Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина РАН (г. Пущино). Бактерии входят в состав биопрепарата «МикроБак», который используют для биоремедиации нефтезагрязненных территорий [6-7, 15-16]. Модельный токсикант – нефть с нефтеперерабатывающего завода АО «ГАЗПРОМНЕФТЬ-МНПЗ», выбор которого обусловлен тем, что на

нефтеперерабатывающие заводы нефть поступает одновременно с разных нефтяных месторождений. Эксперимент проводили в соленой воде (3% NaCl) при комнатной температуре и в пресной воде при пониженной температуре (10°C).

Бактерии культивировали в полноценной среде Лурия-Бертани (ЛБ) [17]. Готовые среды стерилизовали в автоклаве ВК-75 в течение 30 мин при 120°C. Микроорганизмы выращивали в жидкой питательной среде ЛБ в течение 24 ч для получения инокулята [17].

Различные варианты опытов основывались на подготовки чашек Петри (d= 15 см) следующим образом: контроль – соленая вода (30 мл) + нефть (2%об.), контроль – пресная вода (30 мл) + нефть (2%об.) (10°C). В опытные пробы в чашки Петри с токсикантом вносили раствор гуминовых кислот (исходная концентрация 50 мг/л) и добавляли суспензию микроорганизмов-нефтедеструкторов *Rhodococcus erythropolis S67/ Rhodococcus erythropolis X5*, количество посевной дозы 10⁵-10⁶ КОЕ/мл. Чашки закрывали и оставляли на ровной горизонтальной поверхности на рассеянном свете при комнатной температуре (для экспериментов с имитацией морской воды) и при пониженной температуре (10°C). Оценку состояния капель гидрофобных соединений проводили спустя 2, 24,48, 72, 168 часов [18, 19].

Результаты и обсуждение

С понижением температуры окружающей среды вязкость нефти и ее плотность увеличиваются, а поверхностное натяжение уменьшается, и, как следствие, происходит ее медленное растекание по поверхности воды [20]. Процесс образования кристаллов парафина при снижении температуры препятствует нефтяному течению. Жидкие нефтепродукты первоначально распространяются как сцепленное пятно, которое быстро фрагментируется, об этом свидетельствуют контрольные образцы. Авторами [6-7, 21] было показано, что штаммы микроорганизмов рода *Rhodococcus* способны биоразлагать от 15 до 26% нефти при 24°C в течение 7-10 суток в условиях морских акваторий. Исследования, проводимые в рамках настоящей работы, позволили выявить повышенную эмульгирующую и нефтеутилизирующую способность биоконпозиций на основе гуминовых кислот и штаммов микроорганизмов рода *Rhodococcus* по отношению к нефтяным углеводородам в пресной [18] и соленой воде (3% NaCl), а также в условиях пониженной температуры (10°C).

На рисунке 1 приведены результаты влияния биоконпозиций на основе гуминовых кислот и бактерий-нефтедеструкторов *Rhodococcus erythropolis X5* на состояние пленок нефти в зависимости от условий и времени проведения эксперимента (2 часа; 7 суток).

I. Повышенная соленость (3%

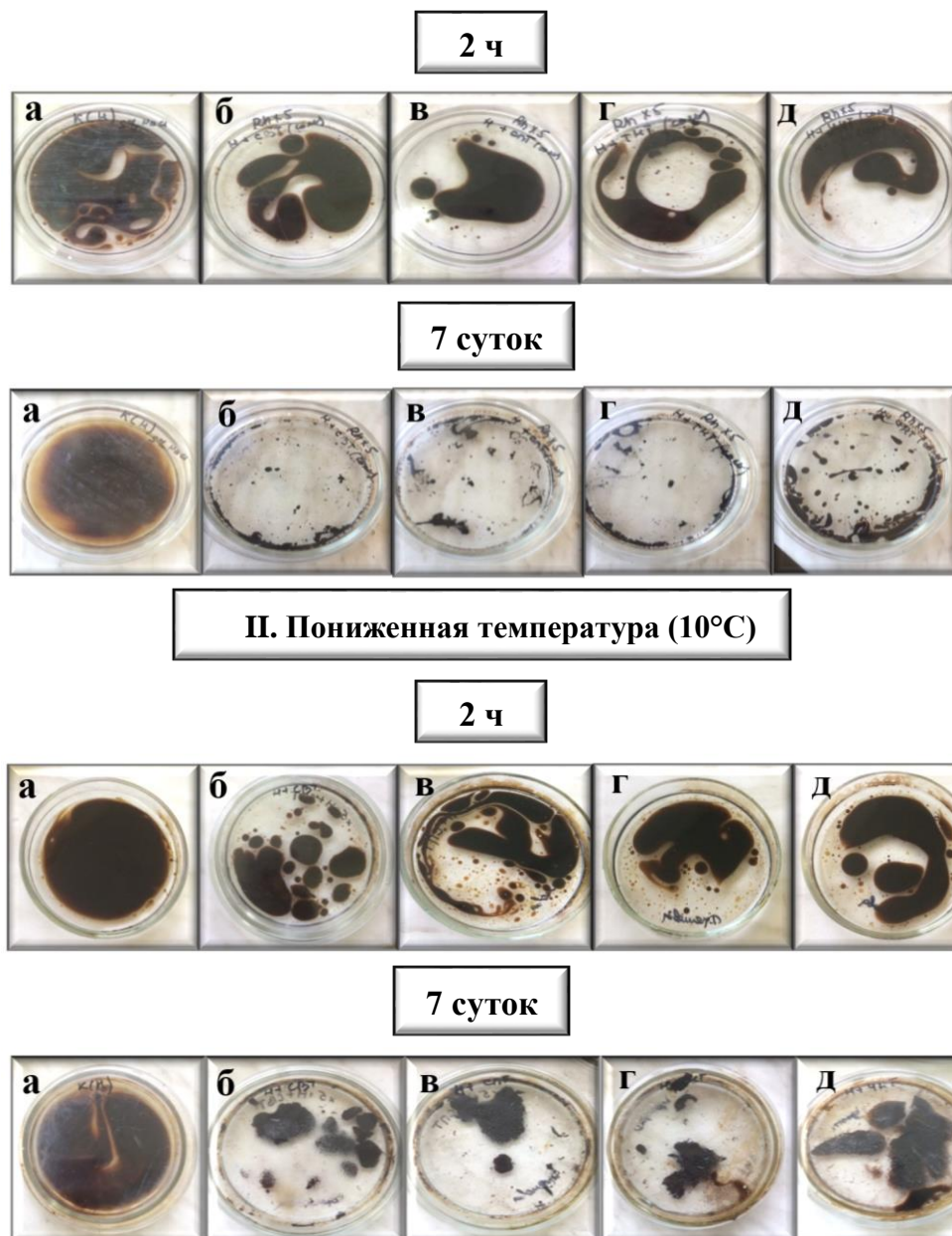


Рис. 1. Влияние биокомпозиций на основе штамма *Rhodococcus erythropolis* X5 на состояние пленок нефти в зависимости от абиотических условий и времени экспозиции: а – контроль; б – ГК СВТ; в – ГК СПТ; г – ГК ТНТ; д – ГК ЧНТ

Эксперимент показал, что биокомпозиции способствуют более быстрому растеканию пленок нефти в течение первых 2 часов. Через 48 часов на пленках нефтепродуктов наблюдалось появление суспензии,

вызванное образованием биопленки за счет роста микроорганизмов-нефтедеструкторов рода *Rhodococcus* и выделения ими биоПАВ и одновременное уменьшение на 30-40% площади поверхности, занимаемой нефтепродуктом. Спустя 7 суток пленки нефти представляют собой, в зависимости от применяемой биокомпозиции, отдельные капли или истонченные пленки с более тонкими краями. В условиях пониженной температуры, когда нефтепродукты находятся в твердом агрегатном состоянии, максимальные эмульгирующие свойства проявляет биокомпозиция «ГК СВТ + *Rhodococcus erythropolis* S67», что связано со способностью штамма *Rhodococcus erythropolis* S67 образовывать биопленки на твердых субстратах, а также одинаковым качественным составом биосурфактантов (сукцинилтрегалолипидов), выделяемых бактериями рода *Rhodococcus* не зависимо от температуры культивирования на гидрофобных субстратах [15, 21]. В условиях повышенной солености среды и пониженной температуры аналогичные результаты продемонстрировала биокомпозиция «ГК СВТ + *Rhodococcus erythropolis* S67». Применение биокомпозиций на основе штамма *Rhodococcus erythropolis* X5 вызывает дробление пленок нефти на мелкие капли. Результатом использования микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis* S67 в составе биокомпозиций является получение более тонких, меньших по площади нефтяных пленок с сформированной биопленкой на их поверхности, особенно это проявляется в условиях пониженной температуры [21]. Авторами [6-7, 15, 21] было показано увеличение содержания ненасыщенных и метил-разветвленных жирных кислот в клетках бактерий рода *Rhodococcus* при пониженной температуре, что является одним из механизмов адаптации бактерий к условиям холодного климата.

I. Повышенная соленость (3%

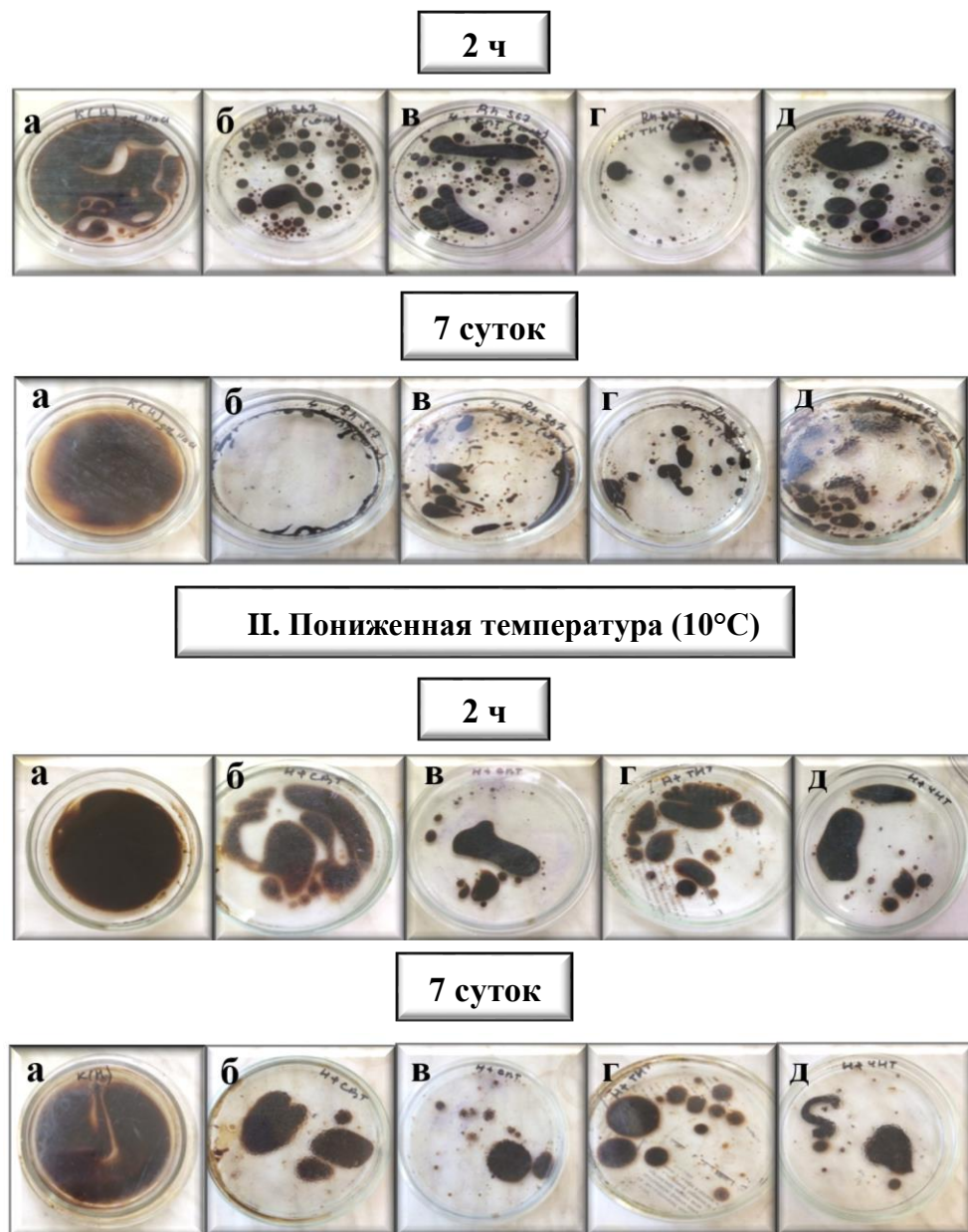


Рис. 2. Влияние биокомпозиций на основе штамма *Rhodococcus erythropolis* S67 на состояние пленок нефти в зависимости от абиотических условий и времени экспозиции: а – контроль; б – ГК СВТ; в – ГК СПТ; г – ГК ТНТ; д – ГК ЧНТ

Биокомпозиции на основе штамма *Rhodococcus erythropolis* S67 практически полностью утилизируют углеводороды нефти спустя 7 суток. Остаются отдельные мелкие эмульгированные нефтяные капли (рис.2 I). В условиях повышенной солености перспективны биокомпозиции в состав, которых входят микроорганизмы *Rhodococcus*

erythropolis X5 (рис. 1 II), а также биокомпозиция «ГК СВТ + *Rhodococcus erythropolis S67*» (рис. 2 II). Однако наиболее универсальными с максимальной нефтеутилизирующей способностью не зависимо от условий и времени проведения эксперимента являются биокомпозиции «ГК СВТ + *Rhodococcus erythropolis S67*»; «ГК ТНТ + *Rhodococcus erythropolis S67*»; «ГК СВТ + *Rhodococcus erythropolis X5*» при этом образование биопленок микроорганизмов-нефтедеструкторов не наблюдается.

Заключение

Определена эмульгирующая способность биокомпозиций на основе гуминовых кислот и микроорганизмов рода *Rhodococcus*. Показано, что биокомпозиции способствуют более быстрому растеканию нефтяных пленок в течение первых 2 часов не зависимо от типа анализируемых ГК. Спустя 7 суток пленки нефти представляют собой, в зависимости от применяемой биокомпозиции (входящих в нее препаратов), отдельные капли (площадь которых составляет не более 50%) или истонченные пленки с более тонкими краями.

Установлено, что биокомпозиции на основе штамма *Rhodococcus erythropolis S67* практически полностью утилизируют углеводороды нефти спустя 7 суток. Остаются отдельные мелкие эмульгированные нефтяные капли. В условиях повышенной солености перспективны биокомпозиции, в состав которых входят микроорганизмы *Rhodococcus erythropolis X5*, а также биокомпозиция «ГК СВТ + *Rhodococcus erythropolis S67*». Однако наиболее универсальными с максимальной нефтеутилизирующей способностью не зависимо от условий и времени проведения эксперимента являются биокомпозиции «ГК СВТ + *Rhodococcus erythropolis S67*»; «ГК ТНТ + *Rhodococcus erythropolis S67*»; «ГК СВТ + *Rhodococcus erythropolis X5*».

Применение данных биокомпозиции на основе гуминовых кислот и бактерий рода *Rhodococcus* значительно снижает время необходимое для полной утилизации нефти при большем ее содержании в нефтяной пленке, что обусловлено образованием и развитием сложной по структуре биопленки из микроорганизмов, позволяющей оптимально использовать все доступные источники питания и энергии (гуминовые кислоты) и обеспечивать лучшую защищенность от воздействия токсикантов.

Работа выполнена в рамках Гранта правительства Тульской области в сфере науки и техники «Проекты молодых ученых» № ДС/162 от 29.10.2020.

Список литературы

1. Гречищева Н.Ю. Разработка научных основ применения гуминовых веществ для ликвидации последствий нефтезагрязнения почвенных и водных сред. М.: МГУ. 2016. 326 с
2. Давыдова С.Л., Тагасов В.И. Нефть и нефтепродукты в окружающей среде. Учеб. пособие. М.: РУДН. 2004. 163 с.
3. Ващенко А.В., Мукминова И.Р., Акьюлова Г.И., Прочухан К.Ю., Прочухан Ю.А. Нефтеемкость и стабильность водонефтяной эмульсии анионного поверхностно активного вещества // Нефтегазовое дело. 2015. №. 3. С. 396–410.
4. Сироткина Е. Е., Новоселова Л. Ю. Материалы для адсорбционной очистки воды от нефти и нефтепродуктов // Химия в интересах устойчивого развития. 2005. Т. 13. №. 3. С. 359–377.
5. Клындюк А.И. Поверхностные явления и дисперсные системы. Минск: БГТУ. 2011. 317 с.
6. Нечаева И.А. Биodeградация углеводов нефти психротрофными микроорганизмами-деструкторами. Пушино: ПушГЕНИ. 2009. 175 с.
7. Нечаева И.А., Льюнг Т.М., Понаморёва О.Н., Сатина В.Э. Влияние физиологических особенностей бактерий рода *Rhodococcus* на деградацию n-гексадекана // Известия ТулГУ. Естественные науки. 2016. Вып. 1. 2016. С. 90–98.
8. Бойкова О.И., Волкова Е.М. Химические и биологические свойства торфов Тульской области // Известия ТулГУ. Естественные науки. 2013. Вып. 3. С. 253–264
9. Акатова, Е. В., Дмитриева, Е. Д., Сюндюкова, К. В., Леонтьева, М. М., Музафаров, Е. Н. Детоксицирующая способность гуминовых веществ торфов различного происхождения по отношению к ионам тяжелых металлов // Химия растительного сырья. 2016. №. 1. С. 119–127.
10. Дмитриева Е.Д., Сюндюкова К.В., Акатова Е.В., Леонтьева М.М., Волкова Е.М., Музафаров Е.Н. Биологическая активность гуминовых веществ сапропеля реки Упы Тульской области // Химия растительного сырья. 2016. №. 1. С. 137-144.
11. 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.
12. Дмитриева Е.Д., Леонтьева М.М., Осина К.В. Физико-химические свойства гуминовых веществ торфов Тульской области // Вестник ТвГУ. Серия: Химия. 2019. №1 (35). С. 134-146.
13. Герцен М.М., Дмитриева Е.Д. Способность гуминовых кислот стабилизировать эмульсии нефти и нефтепродуктов // Вестник ТвГУ. Серия “Химия”. 2020. №3 (41). С. 103-111.
14. Герцен М.М., Дмитриева Е.Д. Стабилизирующая способность гуминовых веществ и микроорганизмов рода *Rhodococcus* по отношению к нефтепродуктам // Вестник ТвГУ. Серия “Химия”. 2020. №3 (41). С. 112-123.
15. Льюнг Т.М., Нечаева И.А., Петриков К.В. Бактерии-нефтедеструкторы рода *Rhodococcus*-потенциальные продуценты биосурфактантов //

- Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2016. №1. С. 50–60.
16. Патент РФ 2378060 (опубл. 2010). Биопрепарат для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами, способ его получения и применения.
 17. Evans C.G.T., Herbert D., Tempest D.W. Continuous Cultivation of Microorganisms: 2. Construction of a Chemostat // *Methods Microbiol.* 1970. V. 2. P. 277 - 327.
 18. Дмитриева Е.Д., Герцен М.М. Влияние гуминовых кислот на состояние капель нефтепродуктов в присутствии микроорганизмов-нефтедеструкторов рода *Rhodococcus* // Вестник ТвГУ. Серия “Химия”. 2021. №2 (41). С. 69-79.
 19. Салеев К.М. Использование гуминовых препаратов для детоксикации и биодegradации нефтяного загрязнения. М.: МГУ 2004. 30 с.
 20. Мадякин В.Ф., Мадякина М.В., Ганеев И.Г., Сухова, С.В. Технология детоксикации и рекультивации площадок нефтедобычи, выведенных из промышленного оборота // Вестник Казанского технологического университета. 2012. Т. 15. №. 24. С. 118–121.
 21. Нечаева И.А., Льюнг Т.М., Понаморева О.Н., Сатина В.Э. Влияние физиологических особенностей бактерий рода *Rhodococcus* на деградацию н-гексадекана // Известия ТулГУ. Естественные науки. 2016. Вып. 1. 2016. С. 90–98.

Об авторах:

ДМИТРИЕВА Елена Дмитриевна – доцент, кандидат химических наук, доцент кафедры химии Естественнонаучного института, Тульский государственный университет, e-mail: dmitrieva_ed@rambler.ru

ГЕРЦЕН Мария Михайловна – аспирант кафедры химии Естественнонаучного института, заведующая лабораториями кафедры биотехнологии, Тульский государственный университет, e-mail: mani.gertsen@gmail.com

INFLUENCE OF BIOCOMPOSITION BASED ON HUMIC ACIDS AND OIL-DEGRADING MICROORGANISMS ON THE EMULSION OF OIL UNDER ABIOTIC STRESS

E.D. Dmitrieva, M.M. Gertsen

Tula State University, Tula

The emulsifying ability of biocompositions based on peats humic acids and oil-degrading microorganisms of the genus *Rhodococcus* in the relation to oil was determined: a qualitative analysis of oil films showed that biocompositions based on humic acids of sphagnum highmoor peat + bacteria *Rh. erythropolis* X5 and humic acids of reed fen peat + bacteria *Rh. erythropolis* S67 have the maximum oil-utilizing capacity, regardless of the conditions of abiotic stress

(increased salinity of the environment and low temperature). It has been established that the high degree of oil biodegradation upon the addition of a suspension of biocompositions is explained by the mechanism of the double action of oil-degrading bacteria and humic acids under conditions of oil pollution: bacteria oxidize oil products, dissolving them or emulsifying them through the release of biosurfactants. Humic acids are effective stabilizing agents in relation to petroleum products and, in addition, are a substrate for the growth of introduced strains of microorganisms.

Keywords: *humic acids, oil, oil emulsification, oil degrading microorganisms, Rhodococcus, biocomposition.*