

Научная статья
УДК 579.69

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОДОСТУПНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ОБРАЗЦОВ НА ОСНОВЕ ДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА

Николай Алексеевич Степанов¹, Ольга Витальевна Сенько²,
Елена Николаевна Ефременко³

^{1,2,3} Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,
Москва, Россия

Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН, Москва,
Россия

¹ na.stepanov@gmail.com

² senkoov@gmail.com

³ elena_efremenko@list.ru

Аннотация. Исследовано влияние различных реагентов (поверхностно-активных веществ, гуминовых веществ, бентонита), привносимых совместно и по отдельности в образцы почв, загрязненных дизельным топливом, на эффективность деструкции загрязнителя клетками почвенных бактерий рода *Rhodococcus*. Установлено, что максимальной биодоступностью характеризуется образец, содержащий одновременно все перечисленные реагенты.

Ключевые слова: дизельное топливо, гуминовые вещества, биодеструкция, *Rhodococcus*

Благодарности. Работа выполнена в рамках исполнения госбюджетной темы «Развитие методологии химии и анализа сложных природных систем, направленный дизайн природоподобных структур, материалов и процессов, экологическая химия и экоадаптивные технологии для охраны здоровья окружающей среды и человека» (122040600057-3).

Scientific article

BIOAVAILABILITY DETERMINATION OF VARIOUS SAMPLES BASED ON DIESEL FUEL

Nikolay A. Stepanov¹, Olga V. Senko², Elena N. Efremenko³

^{1,2,3} Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS, Moscow, Russia

¹ na.stepanov@gmail.com

² senkoov@gmail.com

³ elena_efremenko@list.ru

Abstract. The effect of various reagents (surfactants, humic substances, bentonite), introduced collectively and individually into the diesel fuel samples, on the efficiency of its destruction by the *Rhodococcus* bacteria cells was studied. It was found that the maximum bioavailability was achieved in sample containing all introduced reagents together.

Keywords: diesel fuel, humic compounds, biodegradation, *Rhodococcus*

Acknowledgment. The work was carried out within the framework of the implementation of the state budgetary theme «Development of methodology of chemistry of molecular ensembles of natural humic systems aimed at rational design of nature-like structures and materials, ecological chemistry and ecoadaptive technologies for protection of human and environmental health» (122040600057-3).

При освоении природных ресурсов и контроле состояния лесов используются различные типы оборудования, как правило, функционирующие с использованием дизельного топлива [1]. Случаи загрязнения почвы лесных насаждений дизелем происходят при хранении топлива на участках, заправке техники, вытекании жидкости при работе техники. В такой ситуации наиболее целесообразно использовать биодеструкторы нефтяных загрязнений в сочетании с природоподобными технологиями, позволяющими ускорять процесс деградации топлива под действием микроорганизмов для очистки загрязненных территорий.

Целью данной работы была оценка влияния различных реагентов, привносимых в совокупности и по отдельности в образцы почв, загрязненных дизельным топливом (ДТ), на эффективность деструкции топлива клетками бактерий рода *Rhodococcus*, широко распространенных в почвах разных климатических зон, путем определения концентрации выделяемого в результате процесса биодеструкции CO₂.

Определение биодоступности образцов ДТ проводилось с учетом ГОСТ Р ИСО 9439–2016 [2].

В работе использовались клетки нефтедеструкторов рода *Rhodococcus* [3], традиционно входящие в состав аэробного активного ила и обладающие способностью осуществлять разложение различных гидрофобных экозагрязнителей [4].

Накопление бактериальной биомассы проводилось в жидкой питательной среде следующего состава (г/л): глюкоза – 10, дрожжевой экстракт -1, Na₃C₆H₅O₇ – 5, K₂HPO₄ × 3H₂O – 1, KH₂PO₄ – 0,5, NaH₂PO₄ × 2H₂O – 0,5, (NH₄)₂SO₄ – 1, MgSO₄ – 0,1, FeCl₃ × 6H₂O – 0,02 (pH – 7) – при 27±2 °C на термостатируемом шейкере-инкубаторе «Adolf Kuhner AG» (Швейцария) в течение 20 ч. Для отделения клеток от культуральной

жидкости использовалась центрифуга Eppendorf centrifuge 5415R (США). Значения рН приготовленных сред и отбираемых в процессе экспериментов проб контролировались с помощью рН-метра Corning Pinnacle 530 (Швейцария).

Биомассу клеток, полученную центрифугированием, промывали стерильным 0,9 % (вес.) раствором NaCl как минимум 3 раза от остатков среды и затем готовили суспензию клеток в 0,9 % (вес.) растворе NaCl.

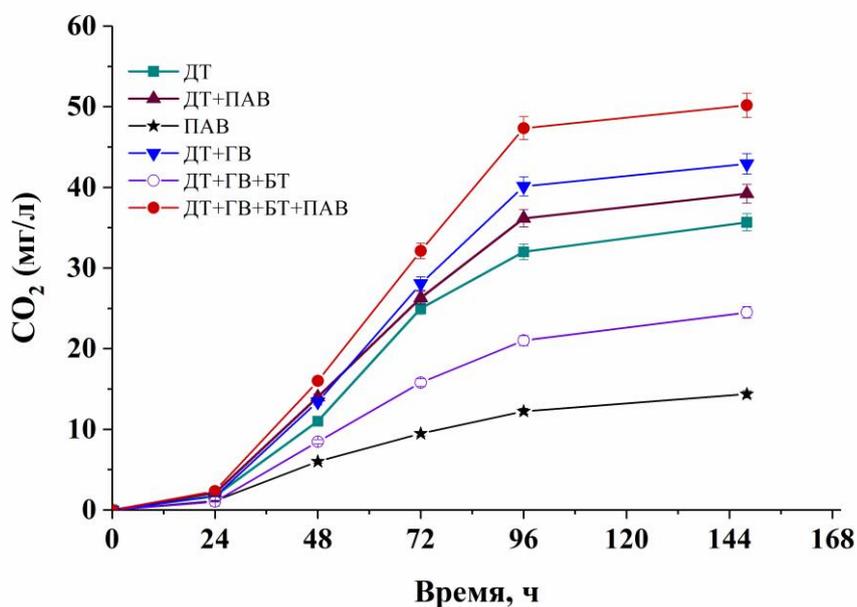
Определение биодоступности образцов ДТ с различными реагентами проводили в серологических емкостях, заполненных питательной средой 20 мл следующего состава: $K_2HPO_4 \times 3H_2O - 1$, $KH_2PO_4 - 0,5$, $NaH_2PO_4 \times 2H_2O - 0,5$, $(NH_4)_2SO_4 - 2$, $MgSO_4 - 0,1$, $FeCl_3 \times 6H_2O - 0,02$ (рН – 7) с добавлением образцов загрязненных почв. Конечная концентрация ДТ в образцах составляла 100 мкг/л. Инокулят вносили в концентрации 10 мл/л (что соответствует 10^6 кл/мл). Спектрофотометрические исследования проводились на спектрофотометре «Agilent UV-853» (Германия). В качестве контроля использовался образец с ДТ без введения клеток бактерий. Процесс проводился в течение 6 суток при 28 °С до выхода основных контролируемых показателей на плато.

В работе тестировались следующие варианты обработки загрязненных топливом проб: ДТ – дизельное топливо, ПАВ – поверхностно-активные вещества, ДТ+ПАВ – дизельное топливо с добавлением поверхностно-активных веществ, ДТ+ГВ – дизельное топливо с добавлением гуминовых веществ, ДТ+ГВ+БТ – дизельное топливо с добавлением гуминовых веществ и бентонита, ДТ+ГВ+БТ+ПАВ – дизельное топливо с добавлением гуминовых веществ, бентонита и поверхностно-активных веществ.

Концентрацию образующегося CO_2 в газовой фазе определяли с использованием газовой хроматографии (хроматограф Кристаллюкс-4000М, НПЦ «Мета-Хром», Йошкар-Ола, Россия, оборудованный колонкой ПАРОПАК QS). Колонка имела детектор теплопроводности, работающий при 50 °С, газ-носитель аргон при скорости потока 30 см³/мин. Пробы газа (1 см³) отбирались шприцем и вводились в колонку. Все измерения были выполнены в трех повторностях, и данные были проанализированы с помощью программы NetChrom (НПЦ «Мета-Хром», Йошкар-Ола, Россия). Представленные данные являются средними значениями, по крайней мере трех независимых экспериментов, поэтому указано стандартное отклонение ($\pm SD$). Статистический анализ выполнялся с использованием программы SigmaPlot (версия 12.5, Systat Software Inc., Сан-Хосе, Калифорния, США).

Энергетический статус клеток нефтедеструкторов рода *Rhodococcus* определялся по концентрации внутриклеточного аденозинтрифосфата (АТФ) биолюминесцентным люциферин-люциферазным методом [5]. Представленные на рисунке результаты приведены с учетом контрольного анализа и исключения влияния абиотических факторов. В качестве

контрольного анализа использовался образец на основе среды с внесением клеток бактерий без ДТ. Для проверки возможного влияния абиотических факторов использовался образец, содержащий солевую среду и ДТ.



Накопление CO₂ в газовой фазе в ходе экспонирования образцов ДТ с различными реагентами с клетками бактерий рода *Rhodococcus*, отражающих биодоступность ДТ для клеток бактерий

При оценке полученных результатов экспонирования бактерий в солевой среде с образцами ДТ было установлено, что наиболее существенное выделение CO₂ (50 мг/л) через 144 ч проведения процесса отмечено в образцах, содержащих ДТ с добавлением гуминовых веществ (ГВ), бентонита (БТ) и поверхностно-активных веществ (ПАВ). В то же время в образцах, содержащих только ПАВ, концентрация CO₂ была наименьшей. Это может быть обусловлено тем, что ПАВ могут негативно влиять на целостность мембран самих клеток и их метаболизм. Токсичное действие ПАВ определяется, главным образом, неполярной частью молекулы и более выражено при наличии в молекуле ароматического кольца [6].

Было установлено, что эффект от ПАВ нивелируется в присутствии ДТ (субстрата). В этом случае концентрация накапливающегося CO₂ достоверно возрастала в 1,1 раза по отношению к образцу с чистым ДТ за счет увеличения площади контакта ДТ с клетками бактерий.

Добавление гуминовых веществ к ДТ способствовало незначительному увеличению доступности топлива для биodeградации. В данном случае ГВ скорее всего выступали одновременно и как ПАВ, и в качестве дополнительного источника углерода для клеток. Для клеток бактерии рода *Rhodococcus* ранее было показано, что присутствие ГВ в среде их

культивирования повышает скорость роста биомассы и ее концентрацию даже в присутствии токсичных соединений [7–8].

Вместе с тем добавление в эту реакционную среду бентонита приводило к снижению уровня накопления образующегося CO_2 . Вероятно, за счет сорбции бентонитом компонентов ДТ, клеток и гуминовых веществ происходило снижение доступности топлива для его биodeградации. Известно, что бентонит активно используется при разработке биотехнологических процессов с участием клеток бактерий рода *Rhodococcus*, например, в качестве пеногасителя или в составе матрицы носителя при получении иммобилизованных клеток [9, 10]. Однако дополнительное введение ПАВ в среду с ДТ, БТ и ГВ приводит к увеличению доступности топлива для его биodeградации на 140 % по отношению к образцу, содержащему только ДТ.

Дополнительно во всех образцах была определена концентрация внутриклеточного АТФ, характеризующая состояние клеток в исследованных средах после окончания процесса, позволяющая оценить их жизнеспособность и метаболическую активность. Исходная концентрация определялась непосредственно после введения клеток в среду (таблица).

Концентрация внутриклеточного АТФ клеток
в экспериментальных образцах ДТ с различными реагентами
в процессе определения их биодоступности

Образец	АТФ после окончания процесса (6 сут.) $\times 10^{-9}$, моль/мл
Исходная концентрация	0,25 \pm 0,01
ДТ	3,63 \pm 0,18
ДТ+ПАВ	3,90 \pm 0,15
ПАВ	2,01 \pm 0,15
ДТ+ГВ	4,31 \pm 0,17
ДТ+ГВ+БТ	2,88 \pm 0,19
ДТ+ГВ+БТ+ПАВ	5,38 \pm 0,20

Показано, что во всех образцах сред с ДТ происходили активные метаболические процессы с участием бактериальных клеток. Причем уровень концентрации АТФ четко коррелировал с уровнем накопления CO_2 . Так, минимальная концентрация внутриклеточного АТФ наблюдалась в образце с ПАВ, а максимальная – в образце с ДТ+ГВ+БТ+ПАВ, в котором была зафиксирована наивысшая концентрация накапливающегося CO_2 .

Таким образом, показано, что максимальной биодоступностью характеризуется образец, одновременно содержащий ДТ, ГВ, БТ и ПАВ. Найденное сочетание компонентов может быть принято во внимание для потенциального применения на практике с целью очистки загрязненных территорий на промышленных лесотехнических участках.

Список источников

1. Пупышев А. П. Влияние вида топлива на дымление дизельного двигателя // Лесотехнические университеты в реализации концепции возрождения инженерного образования: социально-экономические и экологические проблемы лесного комплекса, 2015. С. 45–46.
2. ГОСТ Р ИСО 9439-2016. Оценка биоразлагаемости органических соединений в водной среде. Метод оценки полной аэробной биоразлагаемости путем измерения количества выделенного диоксида углерода. М. : Стандартинформ, 2016. 20 с.
3. Maslova O. [et al.]. Sulfur containing mixed wastes in anaerobic processing by new immobilized synthetic consortia // *Bioresource Technology*, 2022. № 362.
4. Efremenko E. [et al.]. «Unity and struggle of opposites» as a basis for the functioning of synthetic bacterial immobilized consortium that continuously degrades organophosphorus pesticides // *Microorganisms*, 2022. № 10 (7). 1394 p.
5. Efremenko E. [et al.]. The effect of long-term preservation of bacterial cells immobilized in poly(vinyl alcohol) cryogel on their viability and biosynthesis of target metabolites // *Microbiology*, 2007. № 76 (3). P. 336–341.
6. Антипова К. А. [и др.]. Влияние поверхностно-активных веществ на рост и деструктивную активность углеводородокисляющих микроорганизмов // Вестник Казанского технологического университета, 2014. № 17 (3). С. 256–259.
7. Feifičová D. [et al.]. Influence of humic acids on the growth of the microorganisms utilizing toxic compounds (comparison between yeast and bacteria) // *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 2005. № 59 (10). P. 749–752.
8. Čejková A. [et al.]. Potential of *Rhodococcus erythropolis* as a bioremediation organism // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005. № 21 (3). P. 317–321.
9. Stratton H.M. [et al.]. Cell surface hydrophobicity and mycolic acid composition of *Rhodococcus* strains isolated from activated sludge foam // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2002. № 28 (5). P. 264–267.
10. Vancov T. [et al.]. Enhancing cell survival of atrazine degrading *Rhodococcus erythropolis* NI86/21 cells encapsulated in alginate beads // *Journal of Applied Microbiology*, 2007. №102 (1). P. 212–220.