

УДК 663.1

**ВЛИЯНИЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ ТОРФОВ НА РОСТОВЫЕ
ПАРАМЕТРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ РОДА
RHODOCOCCLUS В ПРИСУТСТВИИ ГЕКСАДЕКАНА**

Дмитриева Е. Д., Леонтьева М. М., Каримова В. Т.

*Тульский государственный университет, Тула, Россия
E-mail: dmitrieva_ed@rambler.ru*

Спектрофотометрическим и гравиметрическим методами выявлен стимулирующий эффект, проявляемый гуминовыми веществами торфов различного генезиса при концентрации 50 мг/л на рост и размножение микроорганизмов нефтедеструкторов *Rhodococcus erythropolis* S67 и *Rhodococcus erythropolis* X5. Максимальные параметры роста – удельная скорость роста, время удвоения биомассы – наблюдались у микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis* S67 в присутствии гуминовых веществ тростникового торфа. Гуминовые вещества, находящиеся в растворе, снижают стрессовые условия для микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis* S67 и *Rhodococcus erythropolis* X5, что способствует более быстрой биодegradации ими субстрата – гексадекана, а также росту и размножению бактерий за счет увеличения растворимости органического субстрата и созданию на клеточной поверхности монослойного экрана, представляющего собой сетчатый фильтр из молекул гуминовых веществ.

Ключевые слова: скелетная мышца, катехоламины, адреналин, формотерол, крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Нефть и продукты ее переработки принадлежат к наиболее распространенному классу загрязняющих веществ почвенных и водных сред. По степени вредного влияния на экосистемы нефтепродукты занимают второе место после радиоактивного загрязнения [1]. При этом существующие методы ликвидации последствий загрязнения нефтью и нефтепродуктами, включающие применение комплекса механических, физико-химических и биологических способов очистки, не всегда отвечают требованиям экологической безопасности из-за угрозы вторичного загрязнения [2].

Ежегодно в Тульской области используется от 200 до 300 млн м³ воды. Из этих вод в поверхностные водоемы за исследованный период было выброшено от 199 до 166 млн м³ воды. Данный показатель суммируется из объемов сброшенных нормативно-чистых, нормативно-очищенных и загрязненных сточных вод. Из них больший объем составляют загрязненные сточные воды.

В связи с этим весьма важным представляется поиск экологически безопасных методов ликвидации последствий нефтяного загрязнения, основанных на стимулировании и воспроизведении природных процессов самоочищения. К таким процессам относятся: связывание растворенных нефтяных углеводородов с природным органическим веществом в нетоксичные аддукты, естественное

диспергирование пленок нефти под воздействием органоминеральных ультрадисперсных частиц, сорбция и деградация разливов нефти в почвенном слое. При этом ведущим фактором, определяющим эффективность указанных процессов, являются гуминовые вещества [2].

Гуминовые вещества (ГВ) являются необходимым звеном в эволюции биосферы, важнейшим фактором устойчивости жизненных процессов [3, 4]. Функции, выполняемые гуминовыми веществами, – аккумулятивная, транспортная, регуляторная, протекторная и физиологическая [5].

В данной публикации будет рассматриваться физиологическая функция гуминовых веществ торфов, т. е. способность гуминовых веществ вызывать определенные реакции при их взаимодействии с живыми организмами [4]. Взаимодействуя с живыми организмами, ГВ в малых количествах влияют на рост, подавляя или стимулируя его. Они способны защищать живые клетки от токсического воздействия природных и антропогенных соединений. ГВ могут служить источником питания для микроорганизмов и трансформироваться естественными микробными сообществами [3]. Гуминовые вещества способны связывать различные классы экотоксикантов, образуя соединения с различными классами органических и неорганических веществ. Тем самым они являются своеобразными посредниками, смягчающими действие токсинов на живые организмы [6].

Цель исследования – установить влияние гуминовых веществ торфов различного генезиса на параметры роста микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis* S67 и *Rhodococcus erythropolis* X5, способных к биодegradации легкой фракции нефти – гексадекана, для дальнейшей разработки химико-биологического сорбента на основе гуминовых веществ торфов и микроорганизмов нефтедеструкторов рода *Rhodococcus*, способного эффективно утилизировать нефтяные загрязнения в водных и почвенных средах.

Задачи работы:

- Определить количественные параметры роста микроорганизмов рода *Rhodococcus* в присутствии гуминовых веществ торфов, используя в качестве тест-функции выход биомассы клеток;
- Определить количественные параметры роста микроорганизмов рода *Rhodococcus* в присутствии гуминовых веществ торфов совместно с гексадеканом как представителем легкой фракции нефти.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись гуминовые вещества торфов различного генезиса Тульской области: тростникового низинного (ТНТ), черноольхового низинного (ЧНТ), сфагнового верхового (СВТ) и сфагнового переходного (СПТ) [7], выделенные традиционным методом водно-щелочной экстракции [8, 9].

Штаммы бактерий *Rhodococcus erythropolis* S67, *Rhodococcus erythropolis* X5 получены из лаборатории 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 [10].

Рабочие растворы гуминовых веществ готовили следующим образом: к точным навескам препаратов ГВ добавляли 0,1 М NaOH и оставляли до полного растворения на 24 ч. Для достижения нейтрального значения pH растворов по каплям добавляли 0,05 М HNO₃ или 0,05 М NaOH, pH контролировали с помощью pH-метра Анион 4154. Фоновым электролитом служил 0,1М NaNO₃.

Микроорганизмы культивировали в жидкой минеральной среде Эванса [11] и полноценной среде Лурия – Бертани [1, 18].

Бактерии культивировали в пробирках или колбах Эрленмейера с 5 или 200 мл жидкой среды Эванса соответственно, 2 % n-гексадекана и гуминовыми веществами в концентрации 50 мг/л. Колбы инокулировали клеточной суспензией с посевной дозой 10⁵–10⁶ КОЕ/мл. Микроорганизмы культивировали в орбитальной качалке Excella E25 при 180 об/мин в течение 1–6 суток в зависимости от цели эксперимента [12, 13, 17].

Тест-функцией служил выход сырой биомассы, полученный после осаждения культуры центрифугированием в течение 7 минут при 10 тыс. оборотов при комнатной температуре. Образовавшийся осадок после центрифугирования физиологическим раствором по 1,5 мл вносили в пробирки типа Eppendorf. Осаждали клетки центрифугированием в течение 6 минут при 8 тыс. оборотов на центрифуге Centrifuge 5417R при комнатной температуре. Пробирки с клетками взвешивали на электронных весах с точностью до 4-ого знака после запятой [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние гуминовых веществ, оказываемое на живые организмы, определяется содержанием ГВ в растворе, а концентрация гуминовых веществ, при которой достигается максимальный биологический эффект, зависит как от свойств самих ГВ, так и от особенностей выбранного тест-объекта [15].

Обобщая ранее полученные результаты спектрофотометрического метода по изучению влияния ГВ на рост микроорганизмов нефтедеструкторов *Rh. erythropolis* S67 и *Rh. erythropolis* X5 [18], можно констатировать, что ГВ торфов Тульской области при концентрации 50 мг/л оказывают стимулирующее действие на рост микроорганизмов рода *Rhodococcus*. Данную концентрацию использовали в дальнейших экспериментах для оценки биологической активности ГВ торфов, где тест-откликом служили выход биомассы клеток и кривые роста микроорганизмов.

Выход биомассы микроорганизмов *Rh. erythropolis* S67 и X5 относительно контроля, культивируемых на бедной минеральной среде Эванса с добавлением ГВ в качестве единственного источника углерода и энергии, при культивировании в течение 3 суток представлен на рис. 1.

Максимальный стимулирующий эффект на рост микроорганизмов оказывают ГВ (СВТ): биомасса *Rh. erythropolis* X5 увеличилась в 5 раз по сравнению с контролем. На рост *Rh. erythropolis* S67 наилучшим образом влияют ГВ (ТНТ): прирост биомассы в 4 раза больше относительно контроля. Таким образом, можно утверждать, что ГВ не оказывают ингибирующего действия на рост микроорганизмов, а, напротив, в концентрации 50 мг/л проявляют стимулирующий эффект на микроорганизмы рода *Rhodococcus*, способные использовать гуминовые вещества в качестве источника углерода и энергии. Однако следует заметить, что

ГВ, выделенные из разных торфов, по-разному влияют на рост микроорганизмов *Rh. erythropolis S67* и *X5*, что связано как с различиями в физиологии микроорганизмов [11, 25], так и с особенностями молекулярно массового состава ГВ [15]. Очевидно, ГВ, содержащие фракции с меньшей молекулярной массой, которыми и являются ГВ (ТНТ) [19], имеют повышенное стимулирующее действие из-за возможности проникновения внутрь клетки через клеточную мембрану низкомолекулярных фракций. Модель проникновения низкомолекулярных фракций гуминовых веществ через клеточные стенки микроорганизмов построена в программе Tinkercad (рис. 2).

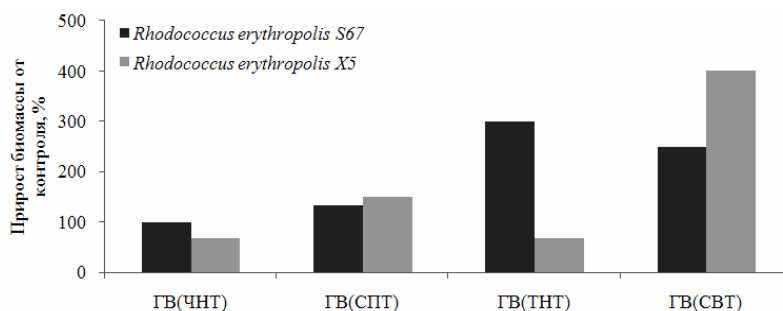


Рис.1. Прирост биомассы микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis S67* и *X5* в присутствии ГВ

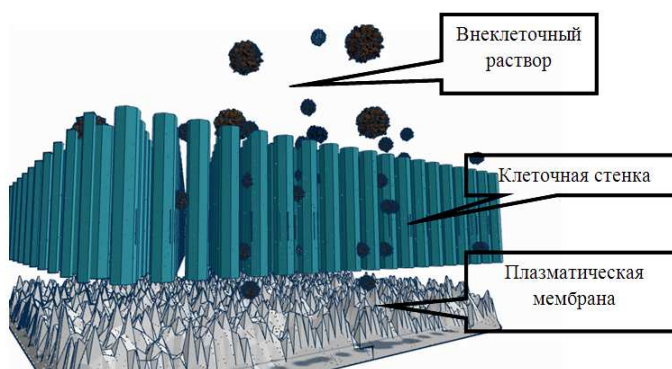


Рис. 2. Модель проникновения низкомолекулярных фракций гуминовых веществ через клеточные стенки микроорганизмов

Для наиболее полного представления влияния ГВ на рост штамма микроорганизмов *Rhodococcus* были получены кривые роста микроорганизмов *Rh. erythropolis S67* и *X5* в среде Эванса в присутствии ГВ 50 мг/л (рис. 3)

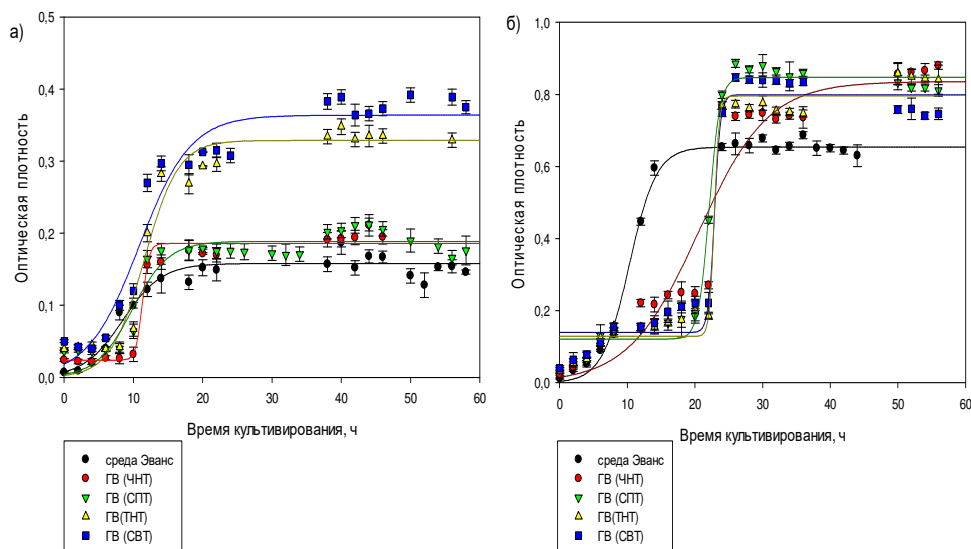


Рис. 3. Кривые роста микроорганизмов-нефтедеструкторов в присутствии гуминовых веществ: а) *Rh. erythropolis S67*, б) *Rh. erythropolis X5*

Анализ кривых роста (рис. 3а) показал: присутствие ГВ в растворе влияет на продолжительность логарифмической фазы роста микроорганизмов *Rh. erythropolis S67*. Гуминовые вещества (СВТ) увеличивают длительность фазы логарифмического роста в 2 раза по сравнению с контролем. Гуминовые вещества не влияют на продолжительность лаг-фазы *Rh. erythropolis S67*, длительность которой соизмерима с контролем. Оптическая плотность в стационарной фазе в 2 раза меньше для *Rh. erythropolis S67*, чем в присутствии ГВ, что может быть связано с физиологическими эффектами ГВ, обусловленными их влиянием на энергетический метаболизм клетки [21].

Лаг-фаза *Rh. erythropolis X5* в присутствии ГВ длится в 2 раза дольше, чем в среде, не содержащей ГВ. Увеличение лаг-фазы говорит об адаптации клеток к совместному сосуществованию в растворе с ГВ и подготовке к дальнейшему разложению их периферических фрагментов. Фаза логарифмического роста *Rh. erythropolis X5* в присутствии ГВ протекает гораздо быстрее и достигает стационарной фазы за 28 ч. В стационарной фазе оптическая плотность клеточной суспензии микроорганизмов *Rh. erythropolis X5* в присутствии гуминовых веществ сфагнового торфа в 2 раза больше относительно оптической плотности клеточной суспензии *Rh. Erythropolis X5*, не содержащей ГВ, и оптической плотности клеточной суспензии микроорганизмов *Rh. erythropolis S67* с гуминовыми веществами.

Аппроксимировав участки экспоненциальной и логарифмической фаз (рис. 3) роста микроорганизмов *Rh. erythropolis S67* и *X5* в координатах «натуральный логарифм оптической плотности $\ln(D)$ от времени» получили значения удельной

скорости роста и времени удвоения биомассы, как тангенс угла наклона $\ln(D)=f(t)$ (уравнение 1).

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad (1)$$

где x_0 – биомасса в начальный момент времени $t=0$.

Зависимость $\ln X$ от времени будет иметь вид прямой с наклоном μ . Время удвоения биомассы (уравнение 2) – период, необходимый для удвоения числа клеток в экспоненциально растущей популяции. Зависимость между удельной скоростью роста и временем удвоения (t_d) биомассы находится исходя из следующих допущений: $x=2x_0$ (рис. 4).

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu} \quad (2)$$

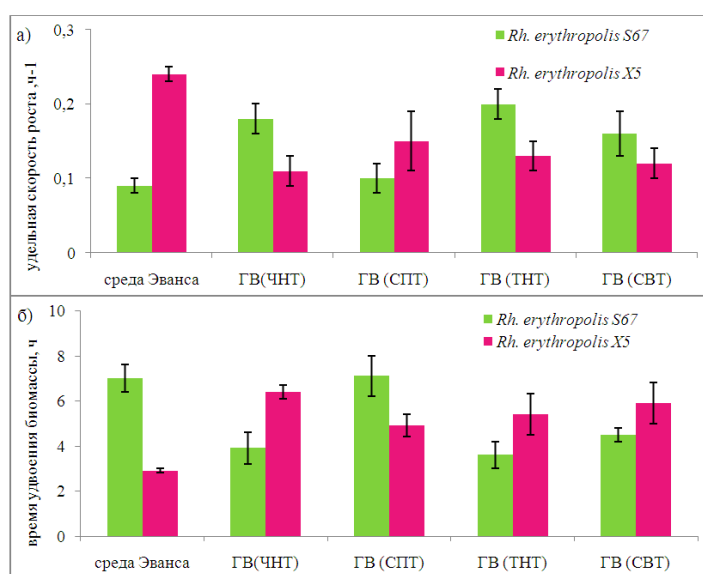


Рис. 4. Ростовые параметры микроорганизмов *Rh. erythropolis* S67 и X5: а) удельная скорость роста (μ), ч^{-1} ; б) время удвоения биомассы, ч

Гуминовые вещества увеличивают удельную скорость роста и время удвоения биомассы для микроорганизмов *Rh. erythropolis* S67. Артефактом является соизмеримое значение удельной скорости роста и время удвоение биомассы микроорганизмов *Rh. erythropolis* S67 в присутствии гуминовых веществ тростникового торфа и контроля (рис. 4).

Наличие ГВ в растворе оказывает ингибирующее действие на рост микроорганизмов *Rh. erythropolis* X5, контрольные показатели роста в 2 раза превышают значения параметров роста в экспериментальных группах (рис. 4). Однако на рис. 3б виден стимулирующий эффект ГВ: увеличение в 2 раза оптической плотности культуральной среды в присутствии ГВ в стационарной фазе по сравнению с

контролем. Длительность адаптации *Rh. erythropolis X5* к среде с ГВ (рис. 3б) может указывать на активацию или даже синтез новых ферментов, необходимых для разложения ГВ, поэтому им необходимо большее время для удвоения биомассы.

Наблюдаемые в результате контакта ГВ с живыми организмами биологические эффекты связаны с возникающей у клеток возможностью более эффективного использования генерируемой ими энергии, запасаемой в виде АТФ, которая расходуется на регенерацию компонентов клетки, рост и размножение [3, 18].

Таким образом, наличие ГВ в растворе ведет к более интенсивному росту микроорганизмов. Результаты эксперимента служат основанием для применения ГВ в качестве стимуляторов роста микроорганизмов *Rh. erythropolis S67* и *X5* нефтедеструкторов при их культивировании в бедных минеральных средах.

Следующим этапом работы являлось выявление влияния ГВ на рост клеток в присутствии детергента гексадекана, являющегося субстратом для микроорганизмов нефтедеструкторов *Rh. erythropolis S67* и *X5* [1, 22]. Концентрация гуминовых веществ в растворе составляла 50 мг/л, гексадекана 2об.%. Рост микроорганизмов в системе «гуминовые вещества – гексадекан – микроорганизм» оценивали также по кривым роста (рис. 5).

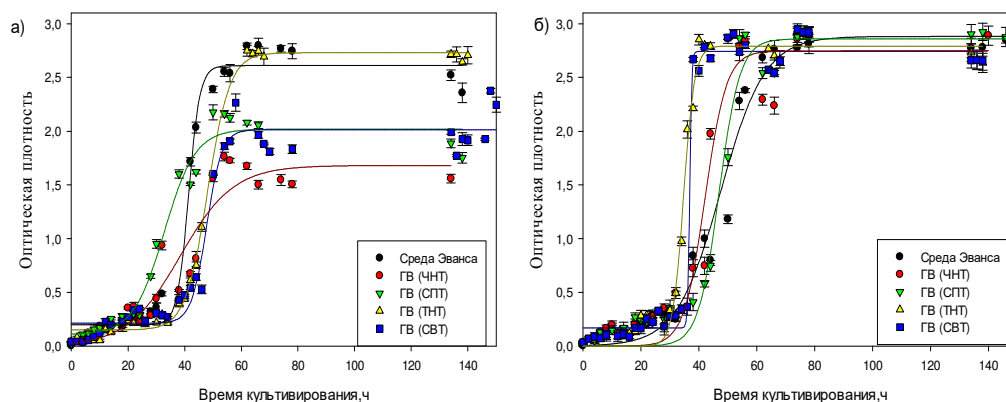


Рис. 5. Кривые роста в присутствии ГВ и гексадекана микроорганизмов а) *Rhodococcus erythropolis S67*, б) *Rhodococcus erythropolis X5*

Результаты эксперимента доказали: ГВ торфов проявляют детоксицирующую способность по отношению к нефтепродуктам (на примере гексадекана). В присутствии ГВ наблюдается увеличение оптической плотности культуральных растворов микроорганизмов по сравнению с контрольным: ГВ (ТНТ) и (СВТ) *Rh. erythropolis S67* (рис. 5а) и *Rh. erythropolis X5* (рис. 5б), что еще раз доказывает стимулирующее влияние ГВ на рост микроорганизмов нефтедеструкторов. Гуминовые вещества выступают адаптогенами по отношению к микроорганизмам, повышая их резистентность к стрессовым нагрузкам в условиях нефтяного стресса.

Экспериментально обнаружено, что оптическая плотность клеточной суспензии микроорганизмов *Rhodococcus* в присутствии гексадекана, являющегося субстратом для микроорганизмов, в 3 раза выше оптической плотности суспензии клеток в его

отсутствии (рис. 5), что еще раз подтверждает факт использования гексадекана данными микроорганизмами в качестве источника питания.

В присутствии субстрата продолжительность лаг-фазы микроорганизмов нефтедеструкторов *Rh. erythropolis S67* и *X5* увеличивается до 40 часов (рис. 5). Увеличение лаг-фазы говорит об адаптации клеток к совместному сосуществованию с гексадеканом и подготовкой клетки к его поглощению.

В присутствии субстрата-гексадекана, в стационарной фазе оптическая плотность клеточной суспензии микроорганизмов *Rh. erythropolis S67* увеличивается в 1,5 раза в присутствии гуминовых веществ и не изменяется для *Rh. erythropolis X5*, что связано с различным физиологическим поведением двух штаммов бактерий [13].

Для полного анализа роста микроорганизмов рода *Rhodococcus* в присутствии гуминовых веществ и субстрата (гексадекана) анализировали параметры роста микроорганизмов (уравнение 1 и 2).

Введение в систему, состоящую из микроорганизмов и гексадекана, ГВ торфов различного генезиса активизирует рост микроорганизмов (рис. 6).

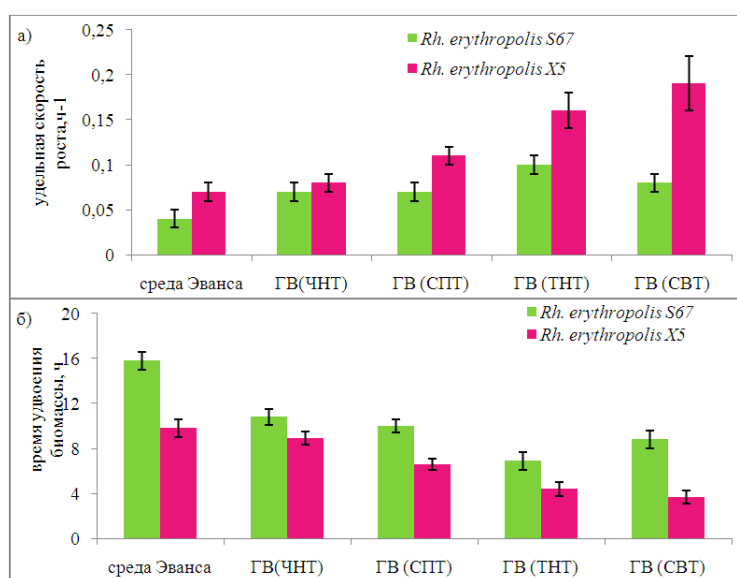


Рис. 6. Ростové параметры микроорганизмов *Rh. erythropolis S67* и *X5* в системе «гуминовые вещества-гексадекан-микроорганизм» а) удельная скорость роста (μ), ч⁻¹ б) время удвоения биомассы, ч

В системе «микроорганизм *Rh. erythropolis X5* – гексадекан – гуминовые вещества (СВТ)» обнаружены максимальные ростové параметры: показатели в 2,6 раза выше, чем в системе «микроорганизм *Rh. erythropolis X5* – гексадекан» (рис. 6). Присутствие ГВ (СВТ) способствует более полной утилизации гексадекана микроорганизмами. Параметры роста *Rh. erythropolis X5* в 2 раза превышают параметры для *Rh. erythropolis S67*, которые, в свою очередь, в 2 раза превышают

ростовые параметры контроля. Биодegradация гексадекана микроорганизмами *Rh. erythropolis S67* начинается во внеклеточном растворе с образованием промежуточного метаболита – гексадекановой кислоты [24].

Гуминовые вещества торфов могут выступать в качестве адаптогенов по отношению к микроорганизмам нефтеструкторам *Rh. erythropolis S67* и *X5*, находящихся в стрессовых условиях, а именно в присутствии гексадекана как одного из представителей легкой фракции нефти. Эффект проявляется в улучшении показателей параметров роста: удельной скорости роста и времени удвоения биомассы в присутствии гуминовых веществ.

Гуминовые вещества, находящиеся в растворе, способствуют образованию полимолекулярного слоя на поверхности клеток микроорганизмов, что препятствует разложению и проникновению периферических частей молекулы ГВ, представленных остатками полисахаридов и аминокислот, как через клеточную мембрану, так и через гидрофобные каналы клеток. С помощью программы Tinkercad построена модель сорбционного слоя, состоящего из молекул гуминовых веществ на поверхности микроорганизмов рода *Rhodococcus* (рис. 7).

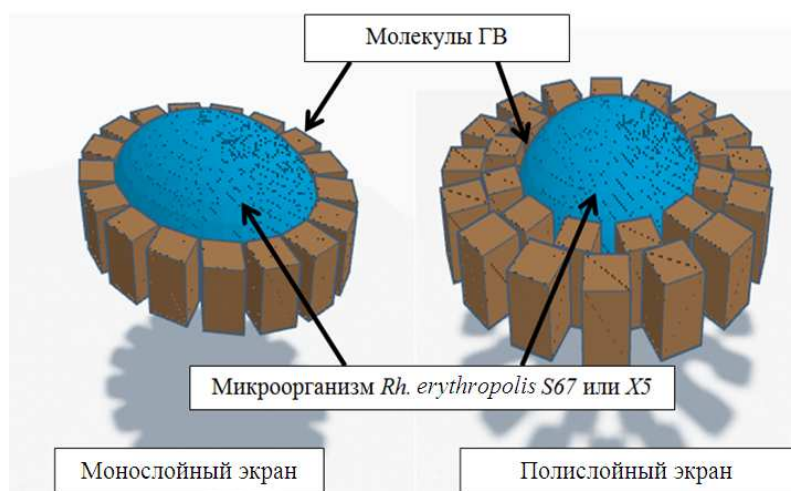


Рис. 7. Модель сорбционного слоя, состоящего из молекул гуминовых веществ на поверхности микроорганизмов рода *Rhodococcus*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлен стимулирующий эффект, проявляемый гуминовыми веществами торфов при концентрации 50 мг/л на рост и размножение микроорганизмов нефтеструкторов *Rh. erythropolis S67* и *X5*. Максимальный стимулирующий эффект обнаружен у гуминовых веществ (ТНТ) и гуминовых веществ (СВТ): прирост биомассы микроорганизмов *Rh. erythropolis S67* увеличивается в 4 раза, а *Rh. Erythropolis X5* – в 5 раз относительно контроля, представленного бедной минеральной средой Эванса. Наличие ГВ в растворе приводит к увеличению

длительности лаг-фазы микроорганизмов *Rh. erythropolis X5*, что может указывать на синтез новых ферментов, необходимых для разложения ГВ данными бактериями.

Установлено, что гуминовые вещества выступают в качестве адаптогенов по отношению к микроорганизмам нефтедеструкторам *Rh. erythropolis S67 и X5*, находящихся в стрессовых условиях в присутствии гексадекана. Эффект проявляется в улучшении показателей параметров роста, что приводит к более быстрой биодеградации субстрата-гексадекана, а также росту и размножению бактерий за счет увеличения растворимости органического субстрата и созданию на клеточной поверхности монослойного экрана, представляющего собой сетчатый фильтр из молекул ГВ.

Результаты экспериментов служат основанием для дальнейшего изучения свойств и характеристик систем «гуминовое вещество – микроорганизм *Rh. erythropolis S67 и X5* – нефтепродукт» и получения на их основе химико-биологического сорбента для утилизации нефтепродуктов в почвенных и водных средах.

Список литературы

1. Нечаева И. А. Биодеградация углеводородов нефти психротрофными микроорганизмами-деструкторами : дисс. канд. биол. Наук / И. А. Нечаева. – Пушкино, 2009. – 175 с.
2. Гречищева Н. Ю. Разработка научных основ применения гуминовых веществ для ликвидации последствий нетезагрязнения почвенных и водных сред : дисс. канд. хим. наук / Н. Ю. Гречищева – М., МГУ, 2016. – 326 с.
3. Тихонов В. В. Действие гуминовых кислот на рост бактерий / В. В. Тихонов, А. В. Якушев, Ю. А. Завгородняя [и др.] // Почвоведение. – 2010. – № 3. – С. 333–341.
4. Демин В. В. Природа биологического действия гуминовых веществ. Часть 1. Основные гипотезы / В. В. Демин, Ю. А. Завгородняя, В. А. Терентьев // Доклады по экологическому почвоведению. – 2006. – Вып. 1, № 1. – С. 72–79.
5. Изосимов А. А. Физико-химические свойства, биологическая активность и детоксицирующая способность гуминовых препаратов, отличающихся генезисом органического сырья: дисс. канд. биол. наук / А. А. Изосимов. – М.: МГУ, 2016. – 148 с.
6. Novak J. Humic acids from coals of the North-Bohemian coal field - I. Preparation and characterization / J. Novak, J. Kozler, P. Janoš [et al.] // React. Funct. Polym. – 2001. – Vol. 47, № 2. – P. 101–109.
7. Бойкова О. И. Химические и биологические свойства торфов Тульской области / О. И. Бойкова, Е. М. Волкова // Известия ТулГУ. Естественные науки. – 2013. – Вып. 3. – С. 253–264.
8. Акатова Е. В. Детоксицирующая способность гуминовых веществ торфов различного происхождения по отношению к ионам тяжелых металлов / Е. В. Акатова, Е. Д. Дмитриева, К. В. Сюндюкова [и др.] // Химия растительного сырья. – 2016. – № 1. – С. 119–127.
9. Дмитриева Е. Д. Биологическая активность гуминовых веществ сапропеля реки Упы Тульской области / Е. Д. Дмитриева, К. В. Сюндюкова, Е. В. Акатова [и др.] // Химия растительного сырья. – 2016. – № 1. – С. 137–144.
10. Льюнг Т. М. Бактерии-нефтедеструкторы рода *Rhodococcus* – потенциальные продуценты биосурфактантов / Т. М. Льюнг, И. А. Нечаева, К. В. Петриков // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2016. – № 1. – С. 50–60.
11. Evans C. G. T. The Continuous Cultivation of Micro-organisms: 2. Construction of a Chemostat / C. G. T. Evans, D. Herbert, D. W. Tempest // Methods Microbiol. – 1970. – Vol. 2, № C. – P. 277–327.
12. Нечаева И. А. Влияние физиологических особенностей бактерий рода *Rhodococcus* на деградацию н-гексадекана / И. А. Нечаева, Т. М. Льюнг, В. Э. Сатина [и др.] // Известия ТулГУ. Естественные науки. – 2016. – Вып. 1. – С. 90–98.

13. Luong T. M. Characterization of biosurfactants produced by the oil-degrading bacteria *Rhodococcus* sp. S67 at low temperature / T. M. Luong, O. N. Ponomareva, I. A. Nechaeva [et al.] // *World Journal of Biotechnology and Microbiology*. – 2018. – Vol. 34 (2). – P. 20.
14. Семенов А. А. Влияние гуминовых кислот на устойчивость растений и микроорганизмов к воздействию тяжелых металлов: автореф. дисс. канд. биол. наук / А. А. Семенов // М.: МГУ, 2009. – 26 с.
15. Демин В. В. Природа биологического действия гуминовых веществ. Часть 2. Локализация биопротекторного действия гуминовых веществ в почвах / В. В. Демин, М. В. Бирюков, А. А. Семенов [и др.] // *Доклады по экологическому почвоведению*. – 2006. – Вып. 1, № 1. – С. 80–91.
16. Безуглова О. С. Гуминовые препараты как стимуляторы роста растений и микроорганизмов (обзор) / О. С. Безуглова, Е. А. Полиенко, А. В. Горюнов // *Известия ОГАУ*. – 2016. – № 4. – С. 11–14
17. Sandor F. The effect of humic substances on nitrogen mineralization / F. Sandor // *Geophys. Res. Abstr.* 2011. – Vol. 13, № 94. – P. 6856–6856.
18. Каримова В. Т. Влияние гуминовых веществ торфов Тульской области на рост микроорганизмов деструкторов нефти *Rhodococcus erythropolis* S67 и *Rhodococcus erythropolis* X5 / В. Т. Каримова, Е. Д. Дмитриева, И. А. Нечаева // *Известия ТулГУ. Естественные науки*. – 2017. – № 2. – С. 60–68.
19. Дмитриева Е. Д. Молекулярно-массовое распределение гуминовых веществ и гиматомелановых кислот торфов различного генезиса Тульской области / Е. Д. Дмитриева, М. М. Леонтьева, К. В. Сяндюкова [и др.] // *Химия растительного сырья*. – 2017. – № 4. – С. 187–194.
20. Постникова М. А. Использование гуминовых кислот почвенными бактериями: автореф. дисс. канд. биол. наук / М. А. Постникова – М., МГУ, 2007. – 27 с.
21. Христева Л. А. Роль гуминовой кислоты в питании высших растений и гуминовые удобрения / Л. А. Христева // *Тр. Почв. ин-та им. В. В. Докучаева*. – М., 1951. – Т. 38. – С. 108–184.
22. Нечаева И. А. Влияние физиологических особенностей бактерий рода *Rhodococcus* на деградацию н-гексадекана / И. А. Нечаева, Т. М. Лыонг, В. Э. Сатина [и др.] // *Известия ТулГУ. Естественные науки*. – 2016. – № 1. – С. 77–90.
23. Дагуров А. В. О механизме антидотного действия гуматов по отношению к нефтепродуктам / А. В. Дагуров, Д. И. Стом, О. Ф. Вятчина [и др.] // *Acta Biomedica Scientifica*. – 2005. – № 6. – С. 143–146.
24. Dercova K. Bioremediation of soil contaminated with pentachlorophenol (PCP) using humic acids bound on zeolite / K. Dercova, Z. Sejková, M. Skokanova [et al.] // *Chemosphere*. – 2007. – 66. – P. 783–790.
25. Лыонг Т. М. Структура и физико-химические свойства гликолипидных биосурфактантов, продуцируемых бактериями-нефтедеструкторами *Rhodococcus* sp. X5 / Т. М. Лыонг, И. А. Нечаева, К. В. Петриков [и др.] // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. – 2017. – Т. 7, №2. – С. 72–79.
26. Биоиндикация. Биотестирование. Биосенсоры: теоретические основы методов и их практическое применение // Учебное пособие. – Тула: ТулГУ, 2016. – 232 с.

INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF HUMIC SUBSTANCES OF PEATS ON THE GROWTH PARAMETERS OF MICROORGANISMS DEGRADERS OF OIL *RHODOCOCCUS* GENUS IN THE PRESENCE OF HEXADECANE

Dmitrieva E. D., Leontyeva M. M., Karimova V. T.

*Tula State University, Tula, Russia
E-mail: dmitrieva_ed@rambler.ru*

The maximum stimulating effect on the growth of microorganisms is exerted by humic substances of sphagnum high moor peat: the biomass of *Rh. erythropolis* X5 increased in 5 times as compared to the control. Humic substances of reed fen peat

influence on the growth of *Rh. erythropolis* S67 to the best advantage: the biomass increased in 4 times as compared to the control. Thus it can be argued that humic substances have no inhibitory effect on the growth of microorganisms, but on the contrary, at the concentration of 50 mg / l, they have a stimulating effect on microorganisms of the genus *Rhodococcus*, capable of using humic substances as a source of carbon and energy. However, it should be noted that humic substances isolated from different peats have different influences on the growth of microorganisms *Rh. erythropolis* S67 and X5, which is due both to differences in the physiology of microorganisms and to the features of the molecular mass composition of humic substances. Obviously, humic substances containing fractions with a lower molecular mass, which are humic substances of reed fen peat, have an increased stimulating effect due to the possibility of penetration into the cell through the cell membrane of low molecular weight fractions.

Humic substances of peats show detoxifying ability in the relation to petroleum products, for example hexadecane. In the presence of humic substances, an increase in the optical density of culture solutions of microorganisms is observed as compared to the control: humic substances of reed fen peat and sphagnum high moor peat *Rh. erythropolis* S67 and *Rh. erythropolis* X5, which once again proves the stimulating effect of humic substances on the growth of microorganisms oil destructors.

There was analysis of the growth parameters of microorganisms to fully research the growth of microorganisms of the genus *Rhodococcus* in the presence of humic substances and substrate (hexadecane).

Introduction humic substances of peats of different genesis to a system consisting of microorganisms and hexadecane, activates the growth of microorganisms.

Maximum growth parameters were found in the system «microorganism *Rh. erythropolis* X5 – hexadecane – humic substances of sphagnum high moor peat»: the indices are 2.6 times higher than in the system «microorganism *Rh. erythropolis* X5-hexadecane». The presence of humic substances of sphagnum high moor peat promotes more complete utilization of hexadecane by microorganisms. *Rh. erythropolis* X5 growth parameters is 2 times higher than the parameters of *Rh. erythropolis* S67, which in turn are 2 times higher than the growth parameters of the control. Biodegradation of hexadecane with microorganisms *Rh. erythropolis* S67 begins in an extracellular solution with the formation of an intermediate metabolite-hexadecanoic acid.

Humic substances of peats can act as adaptogens in the relation to microorganisms oil destructors *Rh. erythropolis* S67 and X5 are under stressful conditions, namely in the presence of hexadecane, as one of the representatives of the light fraction of oil. The effect is manifested in the improvement of parameters of growth parameters: specific growth rate and time of biomass doubling in the presence of humic substances.

Humic substances in solution promote the formation of a polymolecular layer on the surface of microorganism cells, which prevents the decomposition and penetration of peripheral parts of the molecule of humic substances represented by residues of polysaccharides and amino acids, both through the cell membrane and through the hydrophobic channels of cells.

The results of the experiments serve as the basis for further study of the properties and characteristics of the systems «humic substance-microorganism *Rh. erythropolis* S67

and X5-oil» and the production on their basis of a chemical-biological sorbent for utilization of oil spills in soil and water environments.

Keywords: humic substances, microorganisms oil destructors, growth parameters, oil products.

References

1. Nechaeva I. A. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic microorganisms-destructors of diss. Cand. Biol. Sciences, 175 p. (Pushchino, 2009).
2. Grechishcheva N. Yu. Development of scientific foundations for the application of humic substances for the elimination of the consequences of non-contamination of soil and water environments. Cand. chem. Sciences, 326 p. (M., Moscow State University, 2016).
3. Tikhonov V. V., Yakushev A. V., Zavgorodnyaya Yu. A. [et al.] The effect of humic acids on bacterial growth, *Pochvovedenie*, **3**, 333 (2010).
4. Demin V. V., Zavgorodnyaya Yu. A., Terentev V. A. The nature of the biological effect of humic substances. Part 1. Main hypotheses, *Reports on Environmental Soil Science*, **1**, 1, 72 (2006).
5. Izosimov A. A. *Physical and chemical properties, biological activity and detoxifying ability of humic preparations differing in the genesis of organic raw materials*: diss. Biol., 148 p. (M., Moscow State University, 2016).
6. Novák J., Kozler J., Janoš P. [et al.] Humic acids from the coals of the North-Bohemian coal field I. Preparation and characterization, *React. Funct. Polym.*, **47**, **2**, 101 (2001).
7. Boykova O. I., Volkova E. M. Chemical and biological properties of peat of the Tula region, *Izvestiia Tul'skogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvennye nauki*, **3**, 253 (2013).
8. Akatova E. V., Dmitrieva E. D., Syundyukova K. V. [et al.] Detoxifying capacity of humic substances from different origin peats of Tula region in relation to heavy metal ions, *Chemistry of plant raw materials*, **1**, 119 (2016).
9. Dmitrieva E. D., Syundyukova K. V., Akatova E. V. [et al.] Biological activity of humic substances sapropel Upa river Tula region, *Chemistry of plant raw materials*, **1**, 137 (2016).
10. Lyong T. M., Nechaev I. A., Petrikov K. V. Bacteria-oil destructors of the genus *Rhodococcus* are potential producers of biosurfactants, *Izvestiya Vuzov. Applied chemistry and biotechnology*, **1**, 50 (2016).
11. Evans C. G. T., Herbert D., Tempest D. W. The Continuous Cultivation of Micro-organisms: 2. Construction of a Chemostat, *Methods Microbiol.*, **2**, C, 277 (1970).
12. Nechaeva I. A., Luong T. M., Satina V. E. [et al.] influence of physiological features of bacteria of the genus *Rhodococcus* on the degradation of n-hexadecane, *Izvestiia Tul'skogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvennye nauki*, **1**, 90 (2016).
13. Luong T. M., Ponamareva O. N., Nechaeva I. A. [et al.] Characterization of biosurfactants produced by the oil-degrading bacteria *Rhodococcus* sp. S67 at low temperature, *World Journal of Biotechnology and Microbiology*, **34** (2), 20 (2018).
14. Semenov A. A. *Effect of humic acids on the resistance of plants and microorganisms to the effects of heavy metals*. diss. Biol., 26 p. (M., Moscow State University, 2009).
15. Demin V. V., Biryukov M. V., Semenov A. A. [et al.] Nature of biological action of humic substances. Part 2. Localization of the bioprotective action of humic substances in soils, *Reports on Environmental Soil Science*, **1**, 1, 80 (2006).
16. Bezuglova O. S., Polienko E. A., Gorovtsov A. V. Humic preparations as growth stimulators of plants and microorganisms (review), *Proceedings of the OGAU*, **4**, 11 (2016).
17. Sandor F. The effect of humic substances on nitrogen mineralization, *Geophys. Res. Abstr.*, **13**, **94**, 6856 (2011).
18. Karimova V. T., Dmitrieva E. D., Nechaev I. A. The effect of humic substances from different origin peats of the Tula region on the growth of microbial degraders of oil *Rhodococcus erythropolis* S67 and *Rhodococcus erythropolis* X5, *Izvestiia Tul'skogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvennye nauki*, **2**, 60 (2017).

19. Dmitrieva E. D., Leontief M. M., Syundyukova K. V. [et al.] Molecular-mass distribution of humic substances and hyamomelanic acids from different originpeats genesis of the Tula region, *Chemistry of plant raw materials*, **4**, 187 (2017).
20. Postnikova M. A. *The use of humic acids by soil bacteria*. diss. Biol. Sciences, 27 p. (M., Moscow State University, 2007).
21. Khristeva L. A. The role of humic acid in the nutrition of higher plants and humic fertilizers, *Tr. Pochv. Institute for them. V. V. Dokuchaev*, **38**, 108 (M., 1951).
22. Nechaeva I. A., Luong T. M., Satina V. E. [et al.] Influence of physiological features of Rhodococcusbacteria on hexadecane degradation, *Izvestiia Tul'skogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvennye nauki*, **1**, 77 (2016).
23. Dagurov A. V., Stom D. I., Vyatchina O. F. [et al.] On the mechanism of antidote action of humates in relation to petroleum products, *ActaBiomedica Scientifica*, **6**, 143 (2005).
24. Dercova K., Sejáková Z., Skokanova M. [et al.] Bioremediation of soil contaminated with pentachlorophenol (PCP) using humic acids bound on zeolite, *Chemosphere*, **66**, 783 (2007).
25. Lyong T. M., Nechaev I. A., Petrikov K. V. [et al.] Structure and physico-chemical properties of glycolipid biosurfactants produced by the bacteria-oil destructors Rhodococcus sp. X5, *Izvestiya Vuzov. Applied chemistry and biotechnology*, **7**, **2**, 72 (2017).
26. *Bioindication. Biotesting. Biosensors: theoretical bases of methods and their practical application*, Textbook, Tula (Publishing house of Tula State University, 2016).