

НОВЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ (ХЛОР)АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ*



Д.О. Егорова,
Институт экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН

Проведен поиск и изучение бактериальных штаммов-деструкторов ароматических соединений в почвах, отличающихся уровнем углеводородного загрязнения. Установлено, что штаммы-деструкторы принадлежат родам *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Microbacterium*, *Psychrobacter*, *Exiguobacterium*, *Pseudomonas*, *Halomonas*.

Штаммы *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7, *Rhodococcus* sp. B7a, *Rhodococcus* sp. MD1, *Rhodococcus* sp. MD2, *Pseudomonas* sp. MD8 осуществляют разложение широкого спектра полихлорированных бифенилов без накопления токсичных метаболитов. Впервые показана возможность применения бактериальной деструкции в аэробных условиях к смесям, образованным в результате химической модификации технической смеси полихлорбифенилов торговой марки «Совол» под действием полиэтиленгликолей в присутствии гидроксида калия или под действием 2-аминоэтанола.

Штамм *R. wratislaviensis* KT112-7 обладает уникальным сочетанием метаболических путей трансформации бифенила и бензойной кислоты. Экспериментально показана возможность ремедиации ПХБ-загрязненных почв с применением штаммов-деструкторов (*R. wratislaviensis* KT112-7) и их ассоциаций (*Rhodococcus* sp. B7a/*Rhodococcus* sp. G12a).

Ключевые слова: бактерии, деструкция, ароматические соединения, штаммы.

Одной из наиболее актуальных проблем современности является загрязнение окружающей среды токсичными устойчивыми соединениями, образующимися в результате промышленной деятельности человека. К числу таких со-

единений относятся ароматические, полиароматические углеводороды и их галогенированные производные, которые являются продуктами ряда химических производств, содержатся в отходах коксохимической, нефтеперерабатывающей

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 11-04-96028p_урал_a).

промышленности, имеют низкую растворимость в воде и способны прочно адсорбироваться биологическими материалами. В 2011 г. Россия ратифицировала Стокгольмскую конвенцию, где определен состав стойких органических загрязнителей (СОЗ), особо опасных для человека, запрещенных к производству и использованию (<http://chm.pops.int>). В основе большинства соединений группы СОЗ лежат циклические углеводороды, в том числе хлорированные производные моно-, ди- и полиароматических соединений.

Наиболее актуальной проблемой для России является ситуация, сложившаяся (поли)хлорированными бифенилами (ХБ) и полиароматическими углеводородами ПАУ. Предприятия по производству промышленных смесей хлорированных бифенилов были сосредоточены в центральной части России, а предприятия-потребители ХБ размещались более широко, в том числе и на территории Поволжского и Уральского регионов (Оренбург, Пермь, Екатеринбург, Челябинск). На территории данных регионов сосредоточено около 7 тыс. т ХБ (<http://www.siteresources.worldbank.org>). Проведенные ранее исследования показали, что хлорированные бифенилы присутствуют в почвах г. Перми, в том числе и диоксиноподобные ХБ, а также выявлены в плазме крови популяций птиц, обитающих на территории города [1].

ПАУ, обладающие выраженными токсическими, мутагенными и канцерогенными свойствами, многочисленны. Наиболее распространенными и токсичными в ряду ПАУ являются бенз(а)пирен (БП), аценафтен и пирен. Не смотря на высокий уровень загрязненности окружающей среды данными соединениями, ПАУ продолжают поступать в природу, поскольку являются как прямым, так и побочным продуктом многочисленных производств.

К настоящему времени известно, что одним из наиболее перспективных способов снижения содержания СОЗ в окружающей среде является их переработка с использованием метаболического потенциала природной микрофлоры.

Способность к трансформации отдельных хлорбифенилов описана для широкого круга природных бактерий [2–4]. Однако в литературе имеются лишь ограниченные данные о бактериальных штаммах, способных разлагать ХБ до нетоксичных соединений [5–8]. Также известно, что аэробные бактерии предпочтительней окисляют низкохлорированные бифенилы [9, 10].

В литературе имеются данные о способности ряда грамположительных бактерий к утилизации широкого спектра полициклических ароматических углеводородов, в частности нафталина, фенантрена, флюорена, антрацена и пирена бактериями родов *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Arthrobacter* [11–13]. Известна способность грамположительных бактерий к деградации ксенобиотиков, принадлежащих к разным классам органических соединений, в частности, возможность катаболизма алифатических углеводородов (алканов) наряду с нафталином штаммами рода *Arthrobacter* [14] и способность к использованию в качестве ростового субстрата нафталина, бифенила и его хлорированных производных бактериями рода *Bacillus* [15]. Описана способность ряда штаммов *Rhodococcus* sp. к утилизации различных ароматических и хлорированных алифатических углеводородов, таких как нафталин, бифенил, трихлорэтилен, толуол, бензол, а также ряда алканов от пропана до гексодекана. Проводимые коллективами (участниками проекта) на протяжении нескольких лет исследования штаммов-деградаторов ПАУ, бифенила (ПХБ), галогенароматических соединений также говорят о перспективности использования деградативного потенциала природных бактерий для разложения токсичных соединений [16–19, 7].

Следует отметить, что в биотопах, подверженных высокой техногенной нагрузке, формируется уникальная микрофлора, способная к утилизации ряда труднодоступных соединений [6, 19]. Изучение механизмов разложения токсичных соединений ((хлор)бензолов, (хлор)бифенилов, ПАУ) у бактерий, выделенных из биотопов с раз-

ной техногенной нагрузкой, в чем состоит одна из задач предлагаемого проекта, позволит расширить знания об особенностях аэробной бактериальной деструкции ароматических соединений. Исследование генов, обуславливающих свойства активных штаммов-деструкторов, представляет несомненный интерес для оценки распространенности и разнообразия генетических детерминант, ответственных за разложение труднодоступных веществ.

Расширение коллекций микроорганизмов с биотехнологически значимым уровнем

утилизации различных поллютантов является актуальным как для Пермского края, так и для России в целом.

Цель работы – исследование новых физиологических и молекулярно-биологических свойств штаммов аэробных бактерий, способных разлагать широкий спектр органических поллютантов, на примере биотрансформации устойчивых к микробному разрушению ароматических соединений – полициклических (ПАУ), бициклических ((хлор)бифенилы) и моноциклических ((хлор)бензоаты).

МЕТОДЫ

При выполнении исследования использовали традиционные и современные микробиологические, биохимические, генетические и аналитические методы.

Выделение микроорганизмов-деструкторов устойчивых ароматических поллютантов из образцов почв и донных отложений, отобранных в районах с различной техногенной нагрузкой, проводили с использованием метода накопительного культивирования на минеральных средах с добавлением в качестве источника углерода одного из следующих соединений: орто-фталат, нафталин, бифенил, а также путем прямого высева на агаризованные минеральные среды с соответствующим субстратом.

Культивирование изолированных бактерий и штаммов из лабораторных коллекций осуществляли на селективных средах.

Таксономическую принадлежность ранее не идентифицированных активных штаммов выявляли с использованием современных генетических методов – ПЦР-анализа, определения нуклеотидной последовательности гена 16S рНК. Амплификацию со специфичными праймерами осуществляли на приборе MyCycler (BioRad, США, для определения нуклеотидной последовательности использовали автоматический секвенатор Genetic Analyser 3500XL («Applied Biosystems», США) и соответствующие фирменные наборы реактивов (Big Dye Terminator Cycle

Sequencing Kit, DYEnamic ET Terminator Sequencing Kit).

Физиологические особенности разложения моно(поли)ароматических соединений бактериальными штаммами исследовали в условиях периодического культивирования и в опытах с «отмытыми клетками» при различных экологических факторах.

Утилизацию токсичных соединений определяли методами хромато-масс-спектрометрии (хроматограф Agilent GC7890A MSD 5975C inert XLEI/CI, Agilent Technologies), высокоэффективной жидкостной хроматографии (хроматограф LC-10ADvp, Shimadzu), газовой хроматографии (хроматограф GC 2010, Shimadzu), спектрофотометрически (спектрофотометр UV-Visible BioSpec-mini, Shimadzu), при этом использовали методики, разработанные ранее авторским коллективом выполняемого проекта.

Изучение метаболических путей бактериальной деградации исследуемых соединений проводили с использованием биохимических методов (определение кинетических характеристик ключевых ферментов, участвующих в деструкции токсикантов) и аналитических методов (идентификация метаболитов с использованием ВЭЖХ, спектрофотометрии).

Пути разложения ароматических соединений анализировали, основываясь на базах данных Brenda (<http://www.brenda-enzymes.info>), KEGG (<http://www.kegg.jp/>)

www.genome.jp), ExplorEnz (<http://www.enzyme-database.org>), GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), с учетом

экспериментальных результатов по метаболическому профилю и исследованию функциональных генов.

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ-ДЕСТРУКТОРОВ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ПОЧВ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Проанализированы пробы почвы, отобранной на территории промышленных предприятий г. Березники, Пермский край (2001 г.), электрораспределительного предприятия, г. Пермь (2009 г.), у оз. Котокель, Бурятия (2009 г.), хранилища химических отходов г. Калуш, Украина (2012 г.). ГХ-МС-анализ показал, что наибольшее количество алифатических и ароматических УВ содержится в почвах г. Березники и г. Калуш, в остальных образцах присутствуют следовые количества алифатических УВ.

Методом прямого высева на минеральную среду К1, содержащую в качестве источника углерода одно из ароматических соединений (ортофталат, бифенил, нафталин, бензоат) получены чистые культуры штаммов гетеротрофных бактерий. На основании данных анализа 16S рДНК, морфо-физиологических, хемотаксономических и биохимических характеристик штаммы идентифицированы как представители родов *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Microbacterium*, *Psychrobacter*, *Exiguobacterium*, *Pseudomonas*, *Halomonas*.

Методом накопительных культур (среда К1, бифенил 1 г/л) с последующим рассевом до чистых культур из образцов

оз. Котокель получено $1,2 \times 10^6$ КОЕ/г сухой почвы и выделено 2 штамма-деструктора, принадлежащих роду *Pseudomonas*; из почв г. Перми получено $2,8 \times 10^4$ КОЕ/г сухой почвы, из них – 3 штамма-деструктора родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*; из почв г. Березники – $3,1 \times 10^6$ КОЕ/г сухой почвы, из них 8 штаммов-деструкторов, принадлежащих родам *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Microbacterium*, из почв г. Калуш – $88,75 \times 10^6$ КОЕ/г сухой почвы, из них 8 штаммов-деструкторов, принадлежащих родам *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и *Bacillus*. Наибольшей активностью к УВ обладали штаммы, изолированные из образцов почв г. Березники и г. Калуш. Таким образом, выявлена зависимость между количеством, разнообразием почвенных бактерий-деструкторов и содержанием углеводов в почве.

Особенности разложения ароматических соединений и их производных подробно изучали у штаммов, отобранных в результате скрининга новых выделенных штаммов, а также коллекций бактериальных культур лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии ИЭГМ УрО РАН и лаборатории энзиматической деградации органических соединений ИБФМ РАН им. Г.К. Скрыбина.

ШТАММ-ДЕСТРУКТОР АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ – *RHODOCOCCUS WRATISLAVIENSIS* KT112-7

Штамм KT112-7 выделен из техногенно-минеральных образований калийного производства (г. Березники, Пермский край) путем накопительного культивирования. Штамм обладает культурально-морфологическими признаками, характерными для рода *Rhodococcus*. Штамм рас-

тет при температуре от 10–45 °С с оптимумом роста 28 °С. Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма KT112-7 размером 1400 п.н., показал 100 %-ное сходство с аналогичным геном типового штамма *Rhodococcus wratislaviensis* NCIMB 13082T (GenBank Z37138).

На основании морфофизиологических и молекулярно-генетических признаков штамм идентифицирован как *Rhodococcus wratislaviensis*.

В клетках штамма КТ112-7, выращенных на БСР, методом пульс-электрофореза обнаружено две мега-плазмиды размером около 470 и 500 т.п.н. (рис. 1). Стоит отметить, что плазмидный профиль штамма КТ112-7 не изменялся при культивировании как в полноценной среде, так и на ароматических субстратах: бифенил, БК, о-ФК.

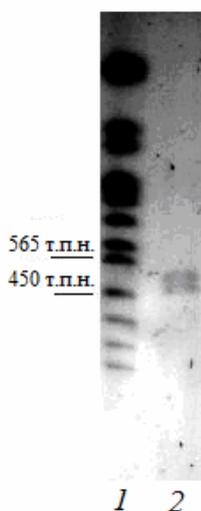


Рис. 1. Электрофореграмма плазмидных ДНК штамма *R. wratislavensis* КТ112-7, выращенного на БСР: 1 – маркер молекулярных масс «DNA Size Markers – Yeast Chromosomal» («Bio-Rad Laboratories», США), 2 – плазмидные ДНК штамма КТ112-7

В результате проведенных исследований было установлено, что штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 эффективно разлагает конгенеры ПХБ, содержащие заместителей в одном из колец молекулы (табл. 1). Уровень деструкции составил 69,0–96,9 %. При этом эффективность разложения зависела не от положения заместителя (*орто*-, *мета*-, *пара*-), а от количества заместителей во втором кольце молекулы бифенила. Так, уровень деструкции монозамещенных ХБ (ПХБ1, ПХБ2, ПХБ3) составил 96,7–96,9 %, а ди- и три-замещенных (ПХБ12, ПХБ29, ПХБ30) – 69,0–89,0 %.

Анализ деградационной активности по отношению к дихлорированным бифе-

нилам, содержащим по одному заместителю в каждом кольце в *орто*- и/или *пара*- положении (ПХБ4, ПХБ8, ПХБ15), а также по отношению к трихлорированным бифенилам, у которых в одном из колец также располагается один заместитель в *орто*- или *пара*- положении, показал, что штамм КТ112-7 предпочтительнее окисляет *орто*хлорированное кольцо молекулы ПХБ (табл. 1). На эффективность деструкции, в случае если заместители располагаются в обоих кольцах молекулы, влияют оба фактора: и расположение заместителей, и их количество.

Таким образом, эффективность разложения ПХБ штаммом КТ112-7 изменяется в ряду незамещенное > *орто*-замещенное > *пара*-замещенное кольцо и моноХБ > диХБ ≥ триХБ.

Анализ метаболического профиля показал, что трансформация хлорированных бифенилов происходит через стадии образования (хлор) ГОФДК и хлорбензойных кислот (ХБК) (см. табл. 1). Также в среде были зафиксированы катехол, 4-ГБК, 3,4-ГБК и свободные ионы хлора. Полученный результат свидетельствует о том, что у штамма КТ112-7 при разложении хлорированных бифенилов индуцируются не только ферменты окислительного пути разложения бифенила, но и ферменты, ответственные за метаболизм моноароматических соединений, в частности хлорбензойных кислот. Таким образом, происходит разложение ПХБ до соединений основного обмена клетки, а ХБК не являются конечным продуктом трансформации ПХБ.

Установлено, что штамм КТ112-7 утилизирует не только индивидуальные ПХБ, но и их смеси, в частности технические смеси торговых марок «Делор 103» и «Совол». В «остром» эксперименте за 5 суток культивирования штамм КТ112-7 разлагает 95 % «Делора 103» и 93,8 % «Совола», проявляя активность ко всем конгенерам ПХБ, входящим в состав смесей. Также показано, что штамм КТ112-7 способен разлагать высокие концентрации «Делора 103» (до 2,0 мг/мл). При этом эффективность деструкции снижалась на 20 %.

Разложение конгенов ПХБ штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7

№ ПХБ (по IUPAC)	Положение заместителей в молекуле	Время, ч	ПХБ, мг/л	Промежуточные продукты			
				ГОФДК		Хлорбензойные кислоты, мкг/л	Гидроксibenзойные кислоты, мкг/л
				Длина волны макс, н.м.	ОП, о.е.		
ПХБ1	2-(орто-)	0	94,25	–	–	–	–
		2	20,6	390	0,268	–	–
		24	3,0	390	0,247	–	–
ПХБ2	3-(мета-)	0	94,25	–	–	–	–
		2	26,2	392	0,401	–	–
		24	2,9	392	0,235	–	–
ПХБ3	4-(пара-)	0	94,25	–	–	–	–
		2	41,7	416	0,196	18,7	25,9
		24	3,1	416	0,291	23,0	19,2
ПХБ12	3,4-	0	22,3	–	–	–	–
		2	7,68	390	0,372	5,51	0,48
		24	5,57	390	0,235	0,53	0,19
ПХБ29	2,4,5-	0	12,5	–	–	–	–
		2	–	394	0,652	7,9	–
		24	1,37	394	0,292	4,8	–
ПХБ30	2,4,6-	0	12,5	–	–	–	–
		2	–	449	0,349	–	–
		24	3,87	449	0,297	–	–
ПХБ4	2,2'-	0	22,3	–	–	–	–
		2	1,42	394	0,962	86,8	–
		24	0,81	394	0,761	12,3	–
ПХБ8	2,4'-	0	22,3	–	–	–	–
		2	15,4	390	0,246	1,2	2,5
		24	2,2	390	0,245	0,7	0,6
ПХБ15	4,4'-	0	22,3	–	–	–	–
		2	11,6	428	0,274	3,2	0,5
		24	4,9	428	0,508	0,3	0,3
ПХБ17	2,4,2'-	0	12,5	–	–	–	–
		2	6,25	449	0,277	3,8	–
		24	1,38	449	0,209	2,4	–
ПХБ28	2,4,4'-	0	12,5	–	–	–	–
		2	–	392	0,067	0,2	4,7
		24	4,12	392	0,271	0,1	2,7

Примечание: «–» – вещества не определены.

УТИЛИЗАЦИЯ ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ СМЕСЕЙ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ

Изучена способность штамма *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7 разлагать смесь гидроксипроизводных (три-пента)хлорированных бифенилов. Установлено, что за 5 суток в «остром» эксперименте происходит разложение 0,134 мг/мл смеси. Штамм проявлял активность ко всем компонентам смеси (рис. 2). Следует

отметить, что в среде не были зафиксированы промежуточные продукты трансформации гидроксильированных полихлорбифенилов, но происходило накопление свободных ионов хлора.

Впервые показана возможность применения бактериальной деструкции в аэробных условиях (на примере штамма

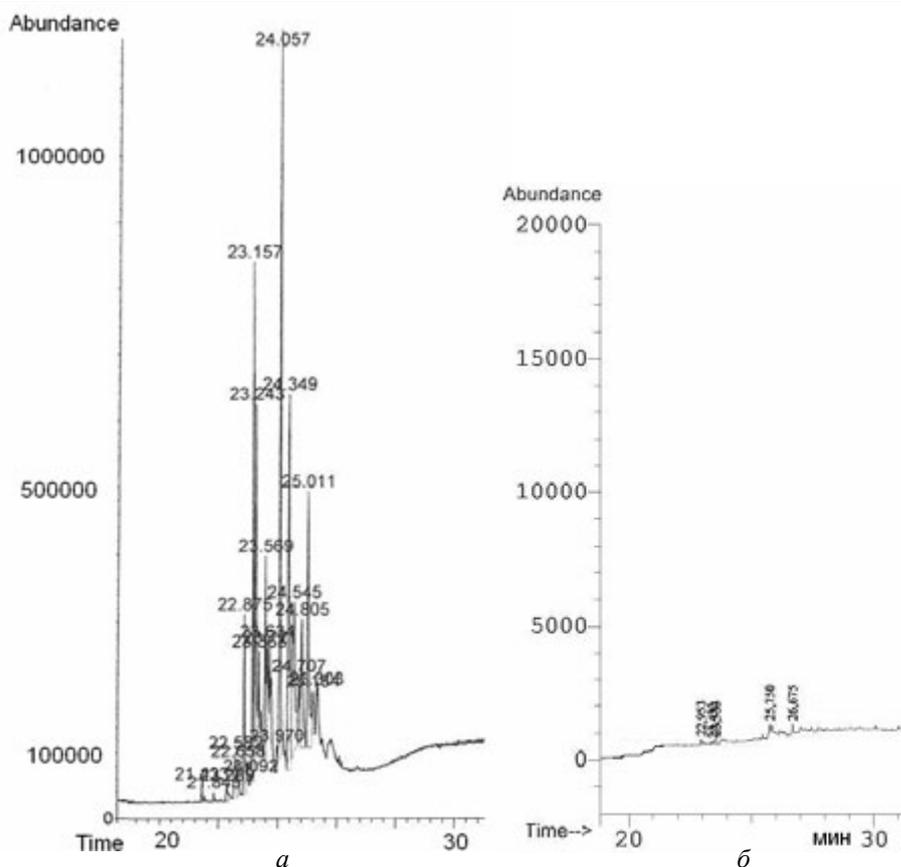


Рис. 2. ГХ-хроматограмма смеси (три-пента)хлорированных гидроксибифенилов до (а) и после (б) бактериальной деструкции с использованием штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7

R. wratislaviensis КТ112-7) к смесям, образованным в результате химической модификации технической смеси полихлорбифенилов (ПХБ) торговой марки «Совол» под действием полиэтиленгликолей (ПЭГ) в присутствии гидроксида калия или под действием 2-аминоэтанола.

По данным газожидкостной хроматографии с пламенно-ионизационным и масс-спектрометрическим детектированием, штамм *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7 осуществляет разложение всех химических соединений, присутствующих в смесях С1 и С2, образованных в результате взаимодействия «Совола» с ПЭГ различной молекулярной массы ($M_{\text{ПЭГ-4}} \sim 200$, $M_{\text{ПЭГ-22}} \sim 1000$) (рис. 3, 4).

Установлено, что за 5 суток эксперимента штамм КТ112-7 разлагает 100 % монополиэтиленгликоксипроизводных и полихлорбифениолов и 90–95 % конгенов ПХБ в смесях С1 и С2, при этом в среде не обнаружены продукты трансформации и накапливаются свободные ионы хло-

ра (72–94 % от максимально возможного).

Достигнута 100 %-ная деструкция смеси продуктов взаимодействия «Совола» и 2-аминоэтанола за 14 суток. Методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием (ГХ-ПИД) установлено, что штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 в первую очередь разрушает производные с аминоэтоксигруппой, так как характерные для них пики не регистрируются на хроматограмме уже на 7-е сутки эксперимента. При этом показано, что в среде не происходит накопления токсичных продуктов биоразложения (рис. 5, 6).

Иная закономерность разложения смеси продуктов ПХБ марки «Совол» и 2-аминоэтанола штаммом КТ112-7 получена при использовании ПАВ для предварительного перевода соединений в водную фазу. В качестве ПАВ использованы сульфонол и Verol LFG 61 (соотношение 1:2,5 по массе). При этом получена стабильная эмульсия. В результате

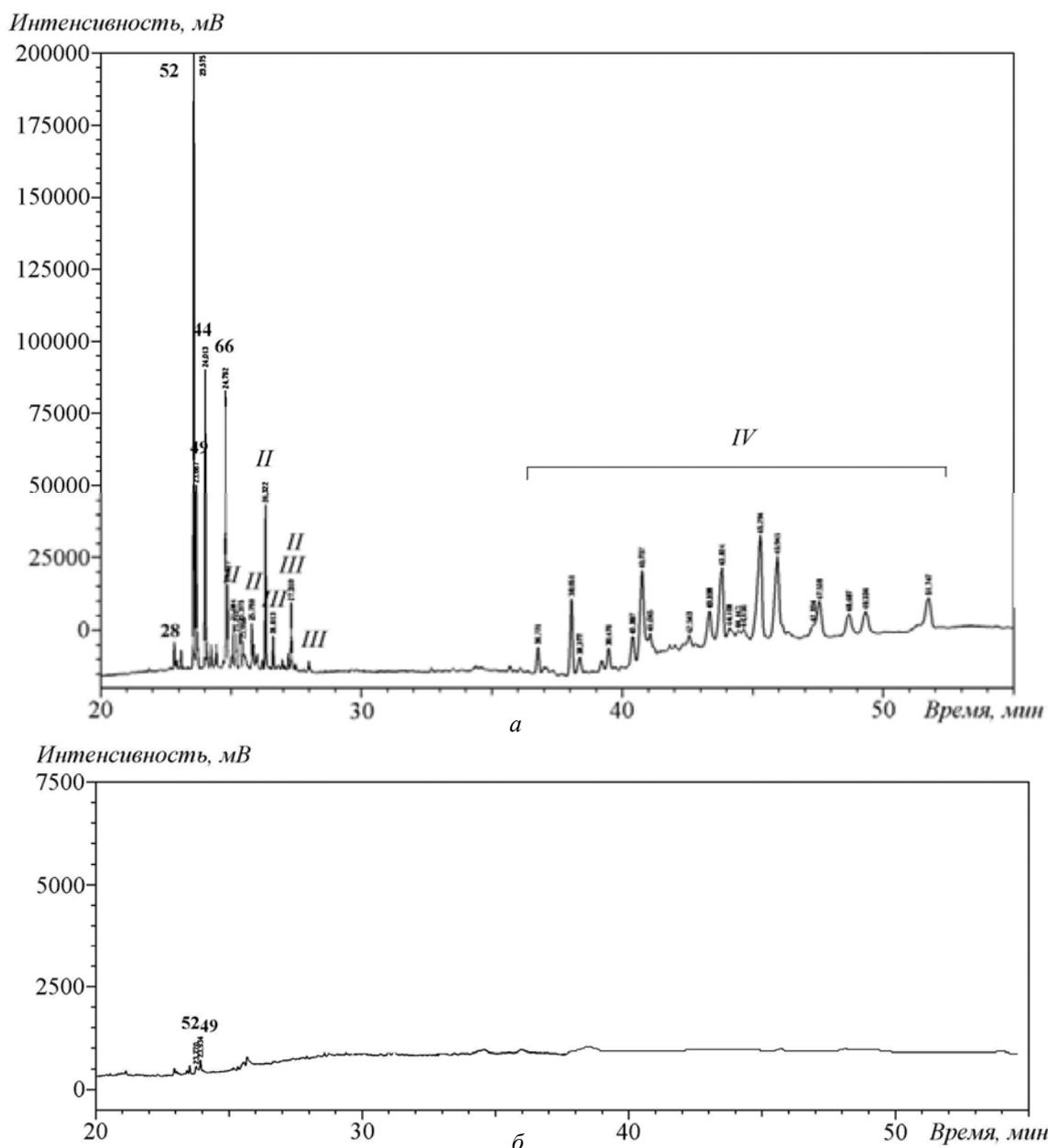


Рис. 3. Хроматограмма смеси С1 до (а) и после (б) бактериальной деструкции:
 II – тетрахлорбифенилолы, III – пентахлорбифенилолы, IV – монозамещенные производные
 с ПЭГ-4 из пента- и гексахлорбифенилов. Жирным шрифтом указаны номера конгенов ПХБ,
 не вступивших в реакцию

разложения полученной эмульсии штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7 концентрация смеси ПХБ с 2-АЭ в культуральной среде понизилась на 85 % за 14 суток (рис. 7). При этом установлено, что происходит разложение не только смеси продуктов ПХБ с 2-АЭ, но и присутствующих ПАВ. Динамика убыли смешанного ПАВ описывается экспоненциальной кривой (величина достоверности аппроксимации 0,94), тогда как динамика убыли смеси соединений ПХБ с 2-АЭ носит ли-

нейный характер (величина достоверности аппроксимации 0,99) (см. рис. 7). Вероятно, изменение тенденции убыли исследуемых соединений связано с появлением дополнительного источника углерода для бактериальных клеток в виде представленных в эмульсии ПАВ. При этом скорость деструкции ПАВ штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7 составляет 0,09 (мг/мл)/сут., что на порядок выше скорости деструкции смеси соединений (1а,б-4) в составе эмульсии (0,009 (мг/мл)/сут.).

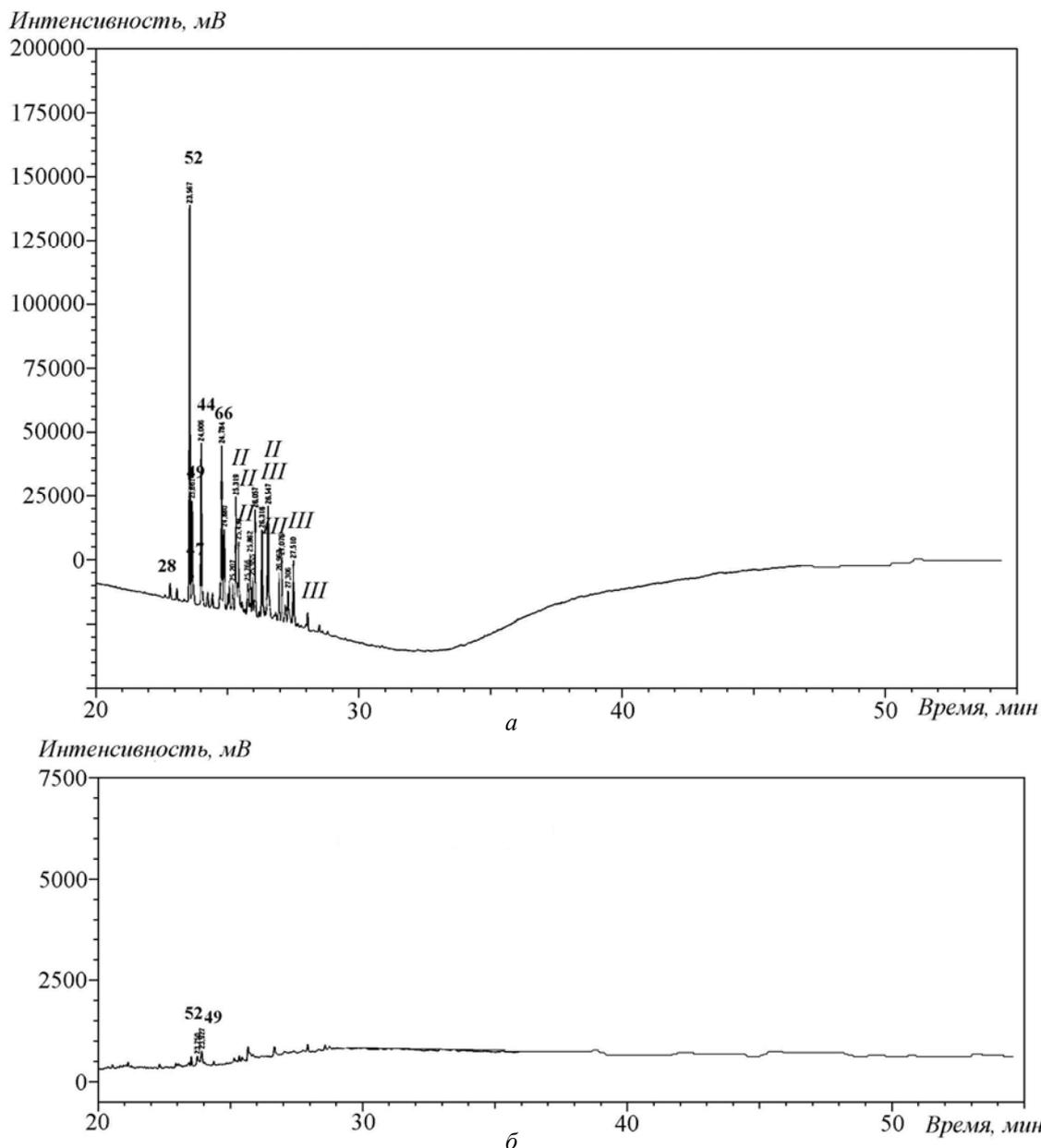


Рис. 4. Хроматограмма смеси С2 до (а) и после (б) бактериальной деградации: II – тетрахлорбифенилолы, III – пентахлорбифенилолы. Жирным шрифтом указаны номера конгенов ПХБ, не вступивших в реакцию

БИОРЕМЕДИАЦИЯ ПОЛИХЛОРБИФЕНИЛ-ЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА БИОАУГМЕНТАЦИИ

Штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 эффективно разлагает присутствующие в почве в результате длительного химического загрязнения конгены ПХБ, по своему составу близкие к смесям «Совол» и «Трихлорбифенил». В результате внесения культуры штамма КТ112-7 ($0,75 \times 10^9$ КОЕ/г почвы) в почву с длительным загрязнением хлорароматиче-

скими соединениями концентрация ПХБ за два месяца снижается с 485 до 15,45 мг/кг почвы. Эффективность деградации составляет 96,8 % (рис. 8). Анализ конгенового состава ПХБ в почве при биоремедиации показал, что происходит снижение всех, в том числе высокохлорированных, ПХБ.

Установлено, что в результате биоре-

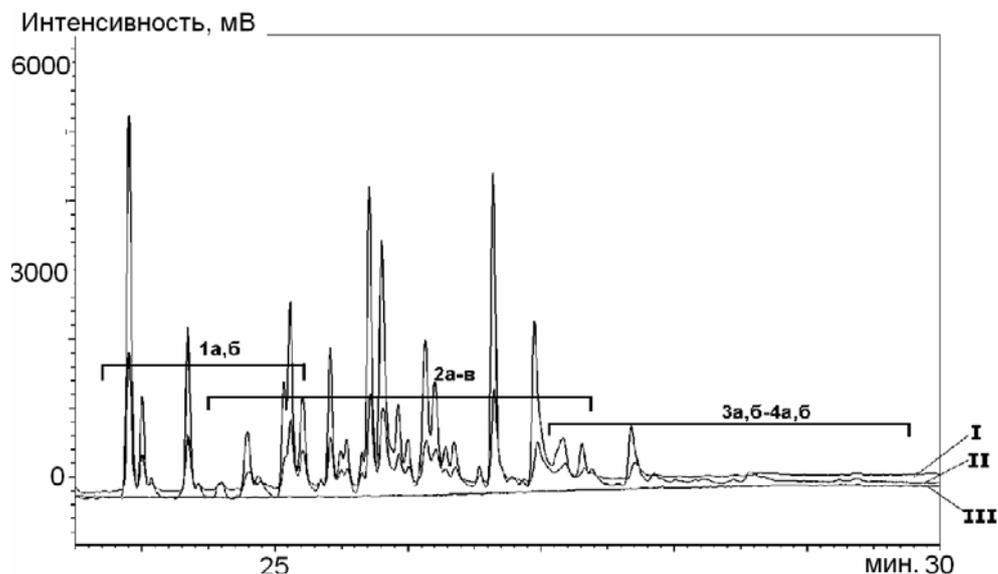


Рис. 5. Хроматограммы (ГХ-МС) анализа экстрактов продуктов взаимодействия «Совола» и 2-аминоэтанола (1a,б – ПХБ, 2a-в – гидрокси-ПХБ, 3a,б – аминоэтокси-ПХБ, 4a,б – гидрокси-аминоэтокси-ПХБ) после микробиологической деструкции штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7: 0 сут. (I), 7 сут. (II), 14 сут. (III)

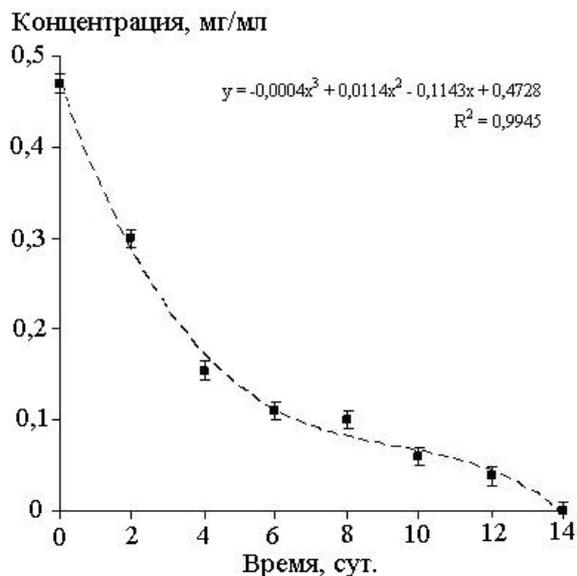


Рис. 6. Динамика разложения смеси продуктов взаимодействия «Совола» и 2-аминоэтанола штаммом-деструктором *R. wratislaviensis* КТ112-7

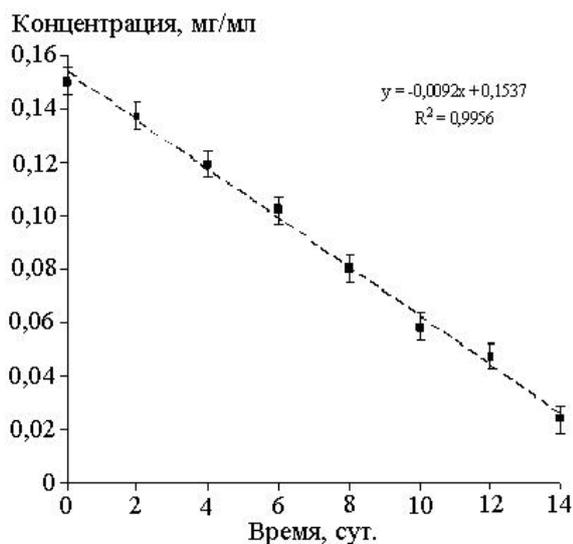


Рис. 7. Динамика разложения смеси продуктов ПХБ марки «Совол» с 2-аминоэтанолом штаммом-деструктором *R. wratislaviensis* КТ112-7 в присутствии ПАВ

медиации происходит снижение токсичности почвы, что ведет к развитию микрофлоры (рис. 9). На первых этапах при высоком уровне токсичности наблюдается значительное снижение количества жизнеспособных клеток аугментированного штамма, а так же практически отсутствует динамика в численности гетеротрофных бактерий.

Однако в результате снижения концентрации ПХБ к концу первого месяца ремедиации до уровня 260 ПДК в течение второго месяца эксперимента отмечается значительное понижение токсичности и переход почвы в категорию среднетоксичных, что обуславливает положительную динамику в развитии численности бактериальной популяции.

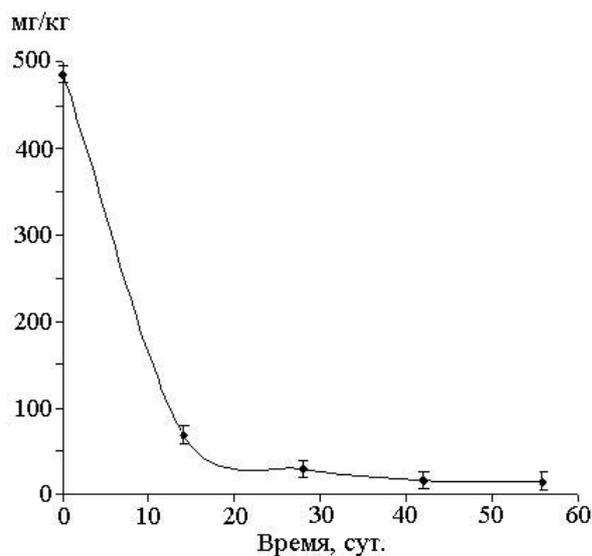


Рис. 8. Концентрация ПХБ в почве в процессе биоремедиации при биоаугментации штамма *R. wratislaviensis* KT112-7

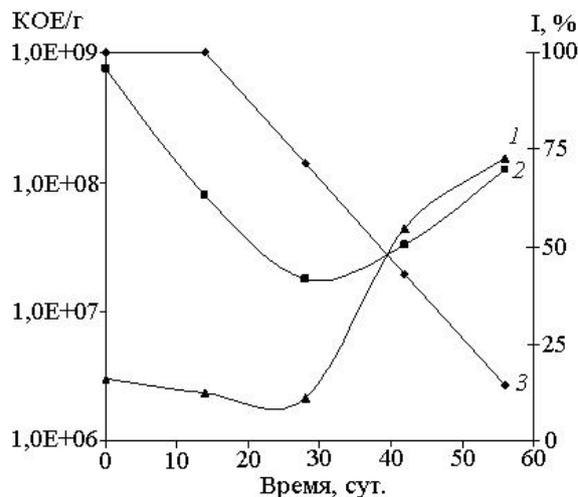


Рис. 9. Динамика изменения численности бактерий в почве и индекса ингибирования почвы в процессе биоремедиации: 1 – численность гетеротрофных бактерий, 2 – численность штамма KT112-7, 3 – индекс ингибирования почвы

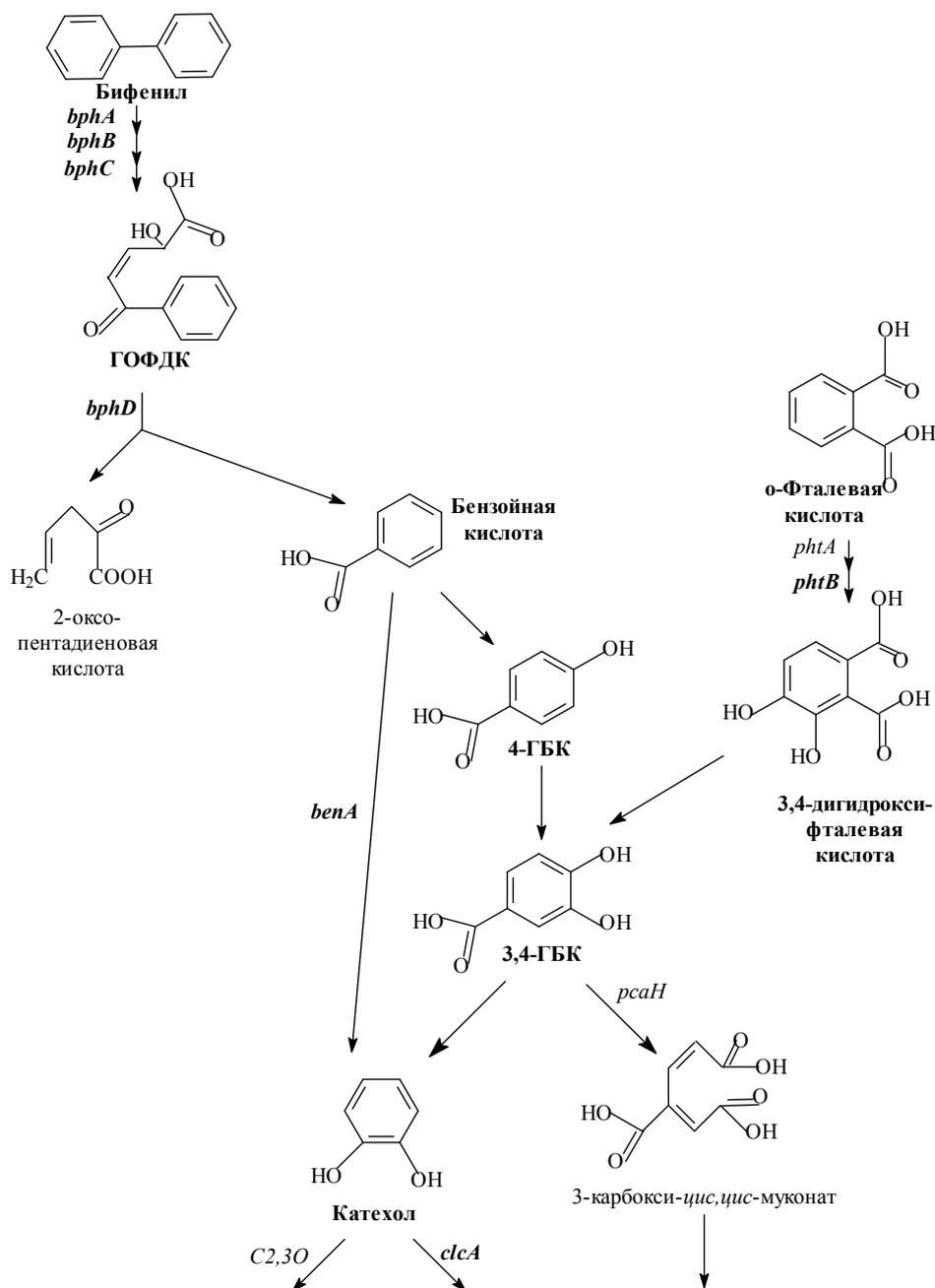
МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПУТИ ТРАНСФОРМАЦИИ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В РАЗЛИЧНЫХ ОСМОТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

На основании результатов предыдущего этапа исследования проведен анализ метаболического профиля штамма KT112-7 при культивировании на бифениле, о-фталевой (о-ФК) и бензойной кислотам (БК) в условиях различной солености среды с учетом данных о наличии в геноме штамма функциональных генов, ответственных за основные этапы трансформации данных субстратов. В результате предложена схема метаболических путей деструкции бифенила, о-ФК и БК (рис. 10).

Расщепление о-ФК происходит через стадию образования 3,4-дигидрокси-фталевой кислоты с последующей ее трансформацией до 3,4-дигидроксибензойной кислоты (3,4-ГБК).

Разложение бифенила осуществляется по классическому пути, через стадию образования 2-гидрокси-6-оксо-фенилгекса-2,4 диеновой кислоты (ГОФДК) до расщепления молекулы бифенила на пентадиеновую и бензойную кислоты.

Интересный результат получен при анализе метаболического пути разложения БК (как самостоятельного субстрата, так и метаболита бифенила) штаммом KT112-7. При высоких концентрациях соли (60 г/л), для которых отмечено снижение эффективности деструкции бифенила, среди возможных метаболитов бензойной кислоты фиксировался только катехол, тогда как при более низких концентрациях хлорида натрия в среде (10–50 г/л) в качестве метаболитов были обнаружены 4-ГБК, 3,4-ГБК и катехол. По-видимому, в штамме *R. wratislaviensis* KT112-7 присутствуют два метаболических пути разложения бензоата и при высоком уровне осмотической нагрузки на клетки штамма активируется только классический путь трансформации БК. Образовавшиеся продукты (3,4-ГБК и катехол) трансформируются далее ферментными системами штамма KT112-7 до соединений основного обмена клетки.



Соединения основного обмена клетки

Рис. 10. Схема метаболических путей разложения бифенила, БК и о-ФК штаммом *R. wratislaviensis* KT112-7. Выделены соединения и гены, детектированные в настоящем исследовании

ОСОБЕННОСТИ РАЗЛОЖЕНИЯ ТЕХНИЧЕСКИХ СМЕСЕЙ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ (ПХБ) РАЗЛИЧНЫХ ТОРГОВЫХ МАРК У АКТИВНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ-ДЕСТРУКТОРОВ

Штамм *Rhodococcus* sp. В7а осуществляет деградацию технических смесей полихлорированных бифенилов (ПХБ)

торговых марок «Делор 103» (0,3 мг/мл) и «Совол» (0,5 мг/мл) в условиях «острого» опыта. К концу 5-х суток количество

«Совола» и «Делора 103» в культуральной среде составляло 13 % (рис. 11).

Штаммы *Pseudomonas* sp. MD8, *Rhodococcus* sp. MD1 и *Rhodococcus* sp. MD2 проявляют деградативную активность ко всем конгенерам ПХБ, входящим в состав смесей «Совол» и «Делор 103». Уровень деструкции данных смесей составляет 87,5–98,3 % при начальной концентрации 0,6 мг/мл (табл. 2). Так же установлено, что данные штаммы

способны утилизировать бифенил в присутствии в среде повышенного содержания хлорида натрия (до 60 г/л).

Таким образом, штаммы *Rhodococcus* sp. B7a, *Pseudomonas* sp. MD8, *Rhodococcus* sp. MD1 и *Rhodococcus* sp. MD2 эффективно разлагают технические смеси ПХБ торговых марок «Делор 103» и «Совол» и могут быть рекомендованы для использования в технологиях переработки данных поллютантов.

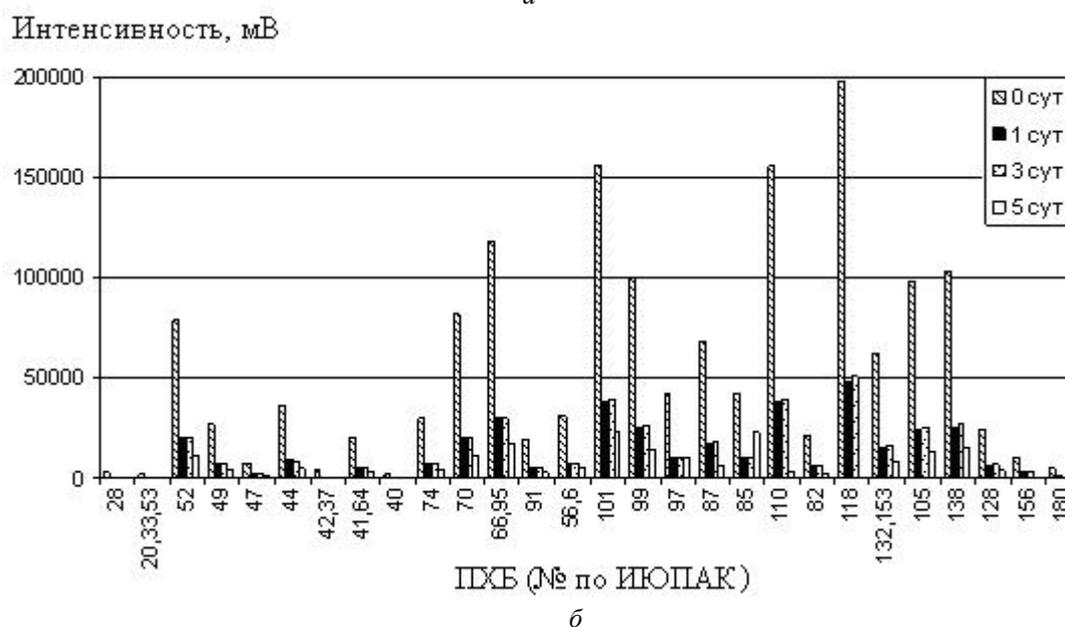
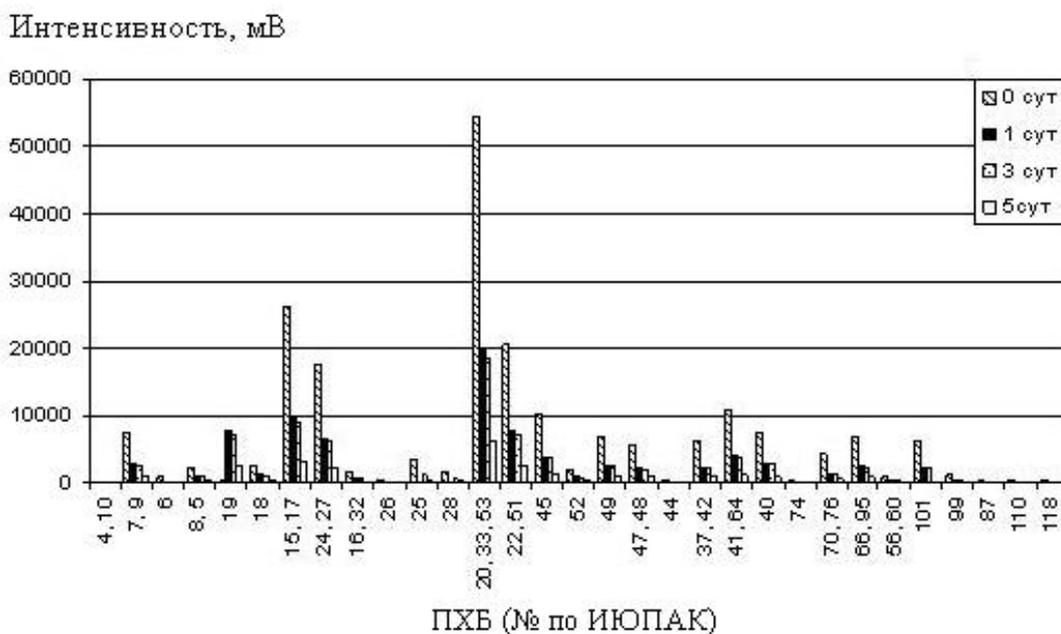


Рис. 11. Разложение технических смесей ПХБ марки «Делор 103» (а) и «Совол» (б) штаммом *Rhodococcus* sp. B7a

Таблица 2

Разложение технических смесей ПХБ штаммами-деструкторами *Pseudomonas* sp. MD8, *Rhodococcus* sp. MD1 и *Rhodococcus* sp. MD2

Время, сут	Штаммы		
	MD1	MD2	MD8
«Делор 103», мг/мл			
0	0,6±0,01	0,6±0,01	0,6±0,01
1	0,026±0,001	0,17±0,01	0,112±0,002
5	0,021±0,002	0,16±0,01	0,107±0,003
8	0,007±0,002	0,05±0,01	0,100±0,002
«Совол», мг/мл			
0	0,6±0,01	0,6±0,01	0,6±0,01
1	0,087±0,002	0,197±0,002	0,093±0,001
5	0,076±0,002	0,070±0,002	0,074±0,001
8	0,075±0,002	0,062±0,002	0,059±0,002

РЕМЕДИАЦИЯ ПОЧВЫ, ЗАГРЯЗНЕННОЙ ПХБ, ПРИ ВНЕСЕНИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ-ДЕСТРУКТОРОВ

Штаммы *Rhodococcus* sp. B7a и *Rhodococcus* sp. G12a в составе консорциума эффективно разлагают промышленную смесь хлорированных бифенилов торговой марки «Совол» в лесной подзолистой почве (модельные условия).

Для создания модельных условий в почву вносили смесь ПХБ «Совол» до конечной концентрации 100 мг/кг и биомассу штаммов до концентрации 0,4 г/кг почвы. Установлено, что внесение бактериального консорциума приводит к значительному, статистически достоверному по отношению к контролю, снижению уровня загряз-

ненности почвы полихлорированными бифенилами. К концу третьего месяца эксперимента в почвенных образцах, содержащих консорциум, обнаруживалось 3,8 мг/кг «Совола», тогда как в образцах, содержащих только аборигенную микрофлору, количество «Совола» составляло 62,4 мг/кг.

Таким образом, исследованный бактериальный консорциум эффективно разлагает хлорбифенилы в условиях модельного почвенного эксперимента и может служить основой для разработки биопрепаратов, направленных на ремедиацию ПХБ-загрязненных почв.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основной целью проекта являлось исследование новых физиологических и молекулярно-биологических свойств штаммов аэробных бактерий, способных разлагать широкий спектр органических поллютантов, на примере биотрансформации устойчивых к микробному разрушению ароматических соединений.

На основании генетического, морфофизиологического и хемотаксономического анализов показано, что почвы с различным уровнем загрязнения содержат гетеротрофные бактерии-деструкторы ароматических соединений, принадлежащих родам *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Arthro-*

bacter, *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Microbacterium*, *Psychrobacter*, *Exiguobacterium*, *Pseudomonas*, *Halomonas*.

Установлена прямая корреляционная зависимость между уровнем загрязнения почвы и количеством бактерий-деструкторов бифенила, содержащихся в данных почвах.

Выявлено уникальное сочетание метаболических путей разложения ароматических соединений в условиях повышенной солености среды у штамма *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7. На основании анализа метаболического профиля и нуклеотидных последовательностей генов *bphA1*,

benA и *phtB* установлено, что штамм КТ112-7 осуществляет разложение о-ФК через стадии образования 3,4-дигидроксифталевой и 3,4-дигидроксибензойной кислот, разложение бифенила – через БК и далее, при низких концентрациях NaCl (до 50 г/л) через образование 4-гидроксибензойной кислоты с последующим ее окислением, а при высоких концентрациях NaCl (от 60 г/л) – путем прямого окисления бензойной кислоты до катехола.

Впервые на примере штамма *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7 показана возможность полной утилизации гидрокси-производных хлорированных бифенилов, а также всех соединений, образующихся при химической модификации технической смеси ПХБ торговой марки «Совол» под действием полиэтиленгликолей (ПЭГ) или 2-аминоэтанола (2-АЭ). Установлено, что штамм КТ112-7

разлагает 100 % смеси соединений ПХБ с 2-АЭ за 14 суток, а также 100 % монополиэтиленгликолюксипроизводных и полихлорбифениолов и 90–95 % конгенов ПХБ в смесях ПХБ с ПЭГ.

Штамм *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7 эффективно разлагает как индивидуальные конгены ПХБ, так и их технические смеси, проявляя активность ко всем конгенам. Установлено, что разложение происходит до продуктов основного обмена клетки, исключая возможность накопления токсичных метаболитов.

Практически и теоретически обоснована возможность ремедиации ПХБ-загрязненной почвы путем внесения в нее как индивидуальных штаммов-деструкторов ПХБ (на примере *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7), так и консорциумов штаммов (на примере консорциума *Rhodococcus* sp. В7а и *Rhodococcus* sp. G12а).

Библиографический список

1. Рыбкин А.В., Рыбкина Д.О. Оценка уровня загрязненности хлорорганическими соединениями крови мухоловки-пеструшки (*Ficedula hypoleuca*) на территории крупного промышленного центра // Поволжский экологический журнал. – 2006. – № 1. – С. 51–60.
2. Strategies for bioremediation of polychlorinated biphenyls / Y. Ohtsubo, T. Kudo, M. Tsuda, Y. Nagata // Appl Microbiol Biotechnol. – 2004. – Vol. 65. – P. 250–258.
3. Васильева Г.Н., Стрижакова Е.Р. Биоремедиация почв и седиментов, загрязненных полихлорированными бифенилами // Микробиология. – 2007. – Т. 74. – № 6. – С. 725–741.
4. Организация метаболических путей и молекулярно-генетические механизмы биодеградации ксенобиотиков у микроорганизмов / В.Г. Хоменков, А.Б. Шевелев, В.Г. Жуков, Н.А. Загустина, А.М. Безбородов, В.О. Попов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44. – № 2. – С. 133–152.
5. Kim S., Picardal F.W. A novel bacterium that utilizes monochlorobiphenyls and 4-chlorobenzoate as a growth substrates // FEMS Microb. Letters. – 2000. – Vol. 185. – P. 225–229.
6. Extensive biodegradation of highly chlorinated biphenyl and Aroclor 1242 by *Pseudomonas aeruginosa* TMU56 isolated from contaminated soils / A. Hatamian-Zarmi, S.A. Shojaosadati, E. Vasheghani-Farahani, S. Hosseinkhani, A. Emamzadeh // Int. Biodeter. Biodegrad. – 2009. – Vol. 63. – P. 788–794.
7. Новый аэробный грамположительный микроорганизм с уникальными свойствами деструкции орто- и пара-хлорированных бифенилов / Д.О. Рыбкина, Е.Г. Плотникова, Л.В. Дорофеева, Ю.Л. Мироненко, В.А. Демаков // Микробиология. – 2003. – Т. 72. – № 6. – С. 759–765.
8. Плотникова Е.Г., Рыбкина Д.О., Демаков В.А. Штамм бактерий *Rhodococcus ruber* – деструктор полихлорированных бифенилов. – Патент RU 2262531 С2. 2005. Бюл. № 29.
9. Pieper D.H. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – Vol. 67. – P. 170–191.
10. Seeger M., Pieper D.H. Genetics of Biphenyl Biodegradation and Co-Metabolism of PCBs // in Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. 2010.
11. Wattiau P. Microbial Aspects in Bioremediation of Soils Polluted by Polyaromatic Hydrocarbons // in Biotechnology for the Environment: Strategy and Fundamentals. 2002.
12. Variation in stable carbon isotope fractionation during aerobic degradation of phenol and benzoate by contaminant degrading bacteria / M.J. Larkin, C.C.R. Allen, J.A. Hall, R.M. Kalin, D.B. Harper // Organic Geochemistry. – 1999. – Vol. 30. I. 8. Part 1. – P. 801–811.
13. Varyability of enzyme system of *Nocardioform* bacteria as a basis of their metabolic activity / I.P. Solyanikova, V.M. Travkin, D.O. Rybkina, E.G. Plotnikova, L.A. Golovleva // J. Environmental Science and Health. Part B. – 2008. – Vol. 43. – P. 241–252.

14. Manilal V.B., Alexander M. Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1991. – Vol. 35. – P. 401–405.
15. Analysis of changes in congener selectivity during PCB degradation by *Burkholderia* sp. strain TSN101 with increasing concentrations of PCB and characterization of the bphBCD genes and gene products / G. Mukerjee-Dhar, T. Hata, M. Shimura, K. Kimbara // Arch Microbiol. – 1998. – Vol. 169. – P. 61–70.
16. Бабошин М.А., Головлева Л.А. Повышение концентрации 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты как причина временной остановки роста *Arthrobacter* sp. К3: кинетический анализ // Микробиология. – 2009. – Т. 78. – № 2. – С. 213–219.
17. Бабошин М.А., Головлева Л.А. Деградация полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) аэробными бактериями и ее кинетические аспекты // Микробиология. – 2012. – Т. 81. – № 6. – С. 695.
18. Рыбкина Д.О., Гусев В.А., Плотникова Е.Г. Почвенные микроорганизмы, разлагающие ароматические углеводороды и карбоновые кислоты // Вестник Пермского ун-та. – 2005. – Вып. 6. – С. 115–122.
19. Характеристика микроорганизмов, выделенных из техногенных почв Прикамья / Е.Г. Плотникова, Д.О. Рыбкина, Л.Н. Ананьина, О.В. Ястребова, В.А. Демаков // Экология. – 2006. – № 4. – С. 261–268.

NEW PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR BIOLOGICAL PROPERTIES OF BACTERIA-DESTRUCTORS OF (CHLORO)AROMATIC COMPOUNDS

D.O. Egorova

The isolation and study of bacterial strains – destructors of aromatic compounds from soils with different levels of hydrocarbon contamination has been carried out. It has been found that the strains belong to the genera *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Microbacterium*, *Psychrobacter*, *Exiguobacterium*, *Pseudomonas*, *Halomonas*.

Strains *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7, *Rhodococcus* sp. B7a, *Rhodococcus* sp. MD1, *Rhodococcus* sp. MD2, *Pseudomonas* sp. MD8 is decomposed a wide range of polychlorinated biphenyls, without the accumulation of toxic metabolites.

The paper demonstrates for the first time the possibility to apply bacterial degradation under aerobic conditions to mixtures formed by chemical modification of the technical mixture of polychlorinated biphenyls of «Sovol» trademark under the influence of polyethylene glycol in the presence of potassium hydroxide or with the action of 2-aminoethanol.

The possibility of remediation of PCB-contaminated soils using strains-destructors (*R. wratislaviensis* KT112-7) and their associations (*Rhodococcus* sp. B7a/*Rhodococcus* sp. G12a) has been experimentally demonstrated.

Experimentally demonstrated the possibility of remediation of PCB-contaminated soils using strains-destructors (*R. wratislaviensis* KT112-7) and their associations (*Rhodococcus* sp. B7a/*Rhodococcus* sp. G12a).

Keywords: Rhodococcus, polychlorobiphenyls, degradation, bioremediation.

Сведения об авторе

Егорова Дарья Олеговна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН), 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; e-mail: daryao@rambler.ru

Материал поступил в редакцию 13.05.2014 г.