

ПОИСК НОВЫХ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ГРУППЫ «СТОЙКИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ ЗАГРЯЗНИТЕЛИ», ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ИННОВАЦИОННЫХ ЭКОБИОТЕХНОЛОГИЙ*

Д.О. Егорова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*
Д.Н. Андреев, *Пермский государственный национальный исследовательский университет*
Е.С. Корсакова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*
А.А. Пьянкова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*
А.С. Максимов, *Пермский государственный национальный исследовательский университет*
А.Н. Васянин, *Пермский государственный национальный исследовательский университет*
М.И. Дёгтев, *Пермский государственный национальный исследовательский университет*

В работе проанализированы образцы почв из регионов с различной техногенной нагрузкой. Более подробно изучен микробный состав почвенных образцов ООПТ «Осинская лесная дача» и г. Чапаевска Самарской области. Получены ассоциации аэробных бактерий, эффективно разлагающие ДДТ и линдан. Выделены штаммы, способные разлагать несколько соединений группы СОЗ. Установлено, что внесение культуры штамма *Rhodococcus wratislaviensis* Ch628 в почву приводит к снижению концентрации основных загрязнителей (ДДТ, линдан, другие изомеры гексахлорциклогексана) и эффективному снижению уровня токсичности почвы для растений и животных.

Ключевые слова: полихлорированные бифенилы, бактериальные штаммы, линдан, гексахлорбензол, ДДТ, деструкция, ремедиация, метаболиты.

Введение

Одними из наиболее острых проблем современности являются вопросы, связанные с экологической ситуацией, сохранением окружающей среды и ее восстановлением. Результатом признания данного факта явилось принятие мировым сообществом в 2001 г. Стокгольмской конвенции. В данном документе выделена группа веществ – стойких органических загрязнителей (СОЗ), представляющих серьезную угрозу для окружаю-

щей среды и подлежащих уничтожению (<http://chm.pops.int>). В настоящее время конвенцию ратифицировали 176 стран, в том числе и Российская Федерация.

Линдан, гексахлорциклогексан (ГХЦГ), ДДТ – пестициды, широко применявшиеся при обработке сельскохозяйственных культур и территорий, для уничтожения вредителей. Начиная с 50-х годов XX века были произведены и вынесены в окружающую среду сотни тысяч тонн данных соединений. В связи с этим

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Пермского края (грант № 14-04-96021).

остро стоит проблема очистки и ремедиации обширных территорий в России, и в том числе в Пермском крае, от хлороорганических пестицидов (<http://www.ecoaccord.org>).

Полихлорированные бифенилы (ПХБ) – хлорароматические вещества, получившие применение в разных областях химической, электротехнической и лакокрасочной промышленности. Заводы, использовавшие данные соединения в своих технологических процессах, были расположены по всей территории России. В Перми основными потребителями ПХБ являлись «Нефтеоргсинтез» и завод смазок и охлаждающих жидкостей, (<http://www.ecoaccord.org>; <http://www.siteresources.worldbank.org>).

Проведенные ранее исследования выявили наличие ПХБ в почве и в плазме крови популяций птиц, обитающих на территории города [2].

Известно, что одними из наиболее перспективных способов снижения содержания СОЗ в окружающей среде являются биологические методы [1, 6]. Преимущества и ограничения биодеструкции исследуются на протяжении нескольких десятилетий. К настоящему моменту выделены и описаны штаммы бактерий, осуществляющих разложение ПХБ, ДДТ, линдана и α (β)-гексахлорциклогексана [3–5, 7–14]. Однако анализ литературных данных показал, что существует ряд проблем, в применении описанных штаммов для очистки территорий, загрязненных хлорароматическими пестицидами и ПХБ.

В связи с этим цель исследования – поиск штаммов, способных разлагать несколько соединений группы СОЗ как в лабораторных условиях, так и в природных.

Методы

Культивирование штаммов-деструкторов осуществляли в селективных условиях (на минеральных средах, где в качестве единственного источника углерода и энергии присутствовал ДДТ, линдан, бифенил, хлорбензойная кислота).

Скрининг штаммов на способность к разложению одного или нескольких соеди-

нений группы СОЗ проводился в условиях эксперимента с «отмытыми клетками».

Наращивание биомассы штаммов-деструкторов проводилось в режиме периодического культивирования в селективных условиях.

Таксономическую принадлежность ранее не идентифицированных активных штаммов определяли с использованием современных генетических методов: ПЦР-анализа, определения нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК.

Экологическая безопасность активных штаммов установлена на основании анализа их таксономической принадлежности и списков патогенных и условно-патогенных штаммов, отраженных в международных и российских нормативных документах (<http://www.zakonobase.ru>; <http://www.osha.europa.eu>; <http://www.biosafety.be>).

Особенности разложения ПХБ, ДДТ, линдана и гексахлорциклогексана бактериальными штаммами изучали в опытах с «отмытыми клетками».

Определение концентраций ПХБ, ДДТ, линдана и гексахлорциклогексана осуществляли методом газовой хроматографии с применением трех типов детекторов: пламенно-ионизационного, электронно-захватного и масс-спектрометрического; продуктов расщепления – методами хромато-масс-спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и спектрофотометрии.

Аmplификацию функциональных генов с использованием тотальной ДНК исследуемых штаммов и праймеров осуществляли на приборе MyCycler («Bio-Rad Laboratories», США). Пробоотбор образцов почв с исследуемых территорий осуществлен в соответствии с государственной нормативной документацией. Токсичность почвы определяли методами биотестирования по методикам, зарегистрированным в реестре природоохранной нормативной документации. Модельные почвенные эксперименты проводили с использованием образцов почв, более 40 лет загрязненных смесью изомеров ГХЦГ

и ДДТ. В качестве бактериального агента-деструктора использовали штамм *Rhodococcus wratislaviensis* Ch628.

Результаты и их обсуждение

Для поиска новых активных бактериальных штаммов-деструкторов были отобраны образцы почв с территорий, с различной техногенной нагрузкой.

Установлено, что наибольшее разнообразие загрязняющих веществ присутствует в почвах г. Березники (территория г. Березники, прилегающая к промышленным предприятиям, Пермский край): хлорароматические и хлорциклические углеводороды, полиароматические и замещенные алифатические углеводороды.

В пробах почв с территории предприятия ОАО «СВЗХ» (г. Чапаевск Самарской области), ранее производившего вещества группы СОЗ, выявлено высокое содержание ПХБ (0,4 мг/кг), линдана (5,5 мг/кг), гексахлорбензола (0,8 мг/кг).

Почвы ООПТ «Осинская лесная дача» содержат высокие концентрации гексахлорциклогексана, в том числе линдана, хлорбензолов и ДДТ.

По составу загрязнителей почвы лесопарковых зон г. Перми качественно аналогичны. В почве присутствуют бромированные и хлорированные ароматические соединения, в том числе хлорбифенилы, ДДТ и ДДЕ, входящие в группу СОЗ, а также ряд тяжелых алифатических углеводородов.

Анализ показал, что почвы заказника «Предуралье» не содержат синтетических химических соединений, в том числе входящих в группу СОЗ, и могут служить

контрольными при проведении скрининговых исследований.

Более подробно были изучены микробные сообщества почв ООПТ «Осинская лесная дача» и г. Чапаевска.

В результате накопительного культивирования с использованием бифенила в качестве селективного фактора из почв ООПТ «Осинская лесная дача» выделено 30 морфотипов аэробных бактерий. В случае, когда селективным фактором выступал ДДТ, выделено и описано 40 морфотипов, распределенных на 40 геномогрупп, при этом в индивидуальную культуру выделено 97 штаммов. На основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК установлено, что в микробных сообществах данных почв присутствуют представители родов *Cupriavidus*, *Bosea*, *Kocuria*, *Sphingobium*, *Chryseobacterium*, *Mesorizobium*, *Terrabacter* (табл. 1).

Установлено, что 22% выделенных штаммов способны разлагать два и более сложных ароматических субстрата. Среди них 47% осуществляют деструкцию (хлор)бифенила, ДДТ, (хлор)бензойной кислоты, 53% – двух из перечисленных соединений в разном сочетании. Показано, что бактериальные ассоциации, в состав которых входят исследованные штаммы, осуществляют аэробное разложение ДДТ – 89,3–100% за 10 месяцев периодического культивирования. Однако проведенные исследования не позволили выделить чистый штамм бактерий, осуществляющий эффективное разложение нескольких соединений группы СОЗ, который можно было бы рекомендовать для использова-

Таблица 1

Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, штаммов-деструкторов, изолированных из почв ООПТ «Осинская лесная дача»

Штамм	Типовой штамм	Сходство, %
WD4p	<i>Cupriavidus basilensis</i> CCUG 49340 ^T	99,90
WD5p	<i>Bosea thiooxidans</i> DSM 9653 ^T	99,68
WD24	<i>Kocuria rosea</i> DSM 20447 ^T	99,37
WD25	<i>Kocuria rhizophila</i> DSM 11926 ^T	99,87
WD100	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230 ^T	100
WD13p	<i>Mesorhizobium qingshengii</i> CCB AU 33460 ^T	96,69
WD16p	<i>Terrabacter carboxydivorans</i> PY2 ^T	100
WD10.1	<i>Cupriavidus basilensis</i> CCUG 49340 ^T	99,88

ния в экобиотехнологиях очистки почв.

Иная картина получена при исследовании микробного сообщества почв, отобранных на территории г. Чапаевска.

В результате накопительного культивирования с использованием линдана (гамма-гексахлорциклогексана) в качестве источника углерода и энергии получены шесть аэробных бактериальных ассоциаций. Данные ассоциации росли в минеральной среде с 0,03% линдана, при этом зафиксировано увеличение оптической плотности культур и выделение в среду свободных ионов хлора (от 1,0 до 5,2% от теоретически возможного у разных ассоциаций). Установлено, что за 6 месяцев культивирования две ассоциации полностью разлагают линдан, в остальных случаях количество линдана значительно снижается, так как линдан – труднодоступный субстрат для бактерий, данный уровень деструкции можно считать довольно высоким.

Методом культивирования на твердой минеральной среде с линданом из бактериальных ассоциаций выделено 159 чистых культур. На основании анализа последовательности гена 16S рРНК установлено, что данные штаммы являются представителями родов *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rizobium*, *Ochrobactrum*, *Pseudoxanthomonas*, *Brevundimonas*, *Stenotrophiminas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Rhodococcus*.

Из тотальной ДНК бактериальных ассоциаций получены фрагменты генов *benA* и *linA*, кодирующие ферменты первичной атаки труднодоступных субстратов. Установлен высокий уровень гомологии исследованных генов с уже известными последовательностями (табл. 2).

Методом прямого высева установлено, что в образцах почв из г. Чапаевска в значительном количестве присутствуют бактерии, способные расти на минеральной среде с бифенилом ($8,6 \times 10^6$ КОЕ/г почвы). Методом накопительного культивирования с последующим рассевом до единичных колоний из образцов СН получено $25,9 \times 10^6$ КОЕ/г почвы, способных использовать бифенил в качестве ростового субстрата. Для дальнейшего исследования отобран штамм Ch628. Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК длиной 1390 п.н. и сравнение с гомологичными последовательностями выявил филогенетическую близость исследуемого штамма с типовым штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* NCIMB 13082^T (GenBank Z37138).

Согласно СП 1.3.2322-08 и СП 1.3.3118-13, а также классификации микроорганизмов по степени риска, определяемой на основании таксономического положения и возможных патогенных свойств штамма, разработанной Национальным институтом здоровья (США), Европейской федерацией биотехнологии и OECD (Organization of economical cooperation & development), выделенный в данной работе штамм является безопасным и может быть использован в биотехнологиях.

Установлено, что штамм *R. wratislaviensis* Ch628 проявляет высокую активность к хлорированным бифенилам, линдану, ДДТ и хлорбензолу (табл. 3).

Так как данные вещества особо устойчивы как к химическому, так и к биологическому разложению, то уровень деструкции, показанный данным штаммом, несомненно, является значимым.

Таблица 2

Анализ сходства гена *linA* с известными последовательностями

Штамм	Номер в GenBank	Длина фрагмента, н	Сходство, %
<i>Sphingobium</i> sp. TKS	CP005088.1	382	99
<i>Sphingobium</i> sp. M11205	CP005191.1	382	99
<i>Sphingobium japonicum</i> UT26S	AP010803.1	382	99
<i>Sphingobium francense</i> strain Sp+	AY690622.3	382	99
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> strain B90	AY150580.3	382	99

Таблица 3

Разложение соединений группы СОЗ штаммом *R. wratislaviensis* Ch628

Вещество	Начальная концентрация, мкг/мл	Концентрация через 4 суток, мкг/мл	Деструкция, %
Хлорбензол	10±0,1	0	100
Линдан	0,2±0,01	0,15±0,01	20,7
ПХБ	18,9±0,2	0,05±0,01	99,7
ДДТ	0,2±0,01	0,13±0,01	30,5

Модельные почвенные эксперименты показали, что внесение культуры штамма *R. wratislaviensis* Ch628 в почву, длительное время загрязненную ДДТ и гексахлорциклогексаном, приводит к значительному снижению концентрации загрязнителя в почве, а также снижению токсичности почвы для растительных и животных тест-объектов.

Таким образом, штамм *R. wratislaviensis* Ch628 обладает уникальным сочетанием деградативных свойств в отношении ряда соединений группы СОЗ и может быть рекомендован для применения в экобиотехнологиях, направленных на биоремедиацию окружающей среды, в частности почвы.

Библиографический список

1. Васильева Г.К., Стрижакова Е.П. Биоремедиация почв и седиментов, загрязненных полихлорированными бифенилами // Микробиология. – 2007. – Т. 76. – № 6. – С. 725–741.
2. 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.
3. Abhilash P.C., Srivastava S., Singh N. Comparative bioremediation potential of four rhizospheric microbial species against lindane // Chemosphere. – 2011. – Vol. 82. – P. 56–63.
4. Adebuseye S.A., Picardal F.W., Ilori M.O., Amund O.O., Fuqua C. Characterization of multiple novel aerobic polychlorinated biphenyl (PCB)-utilizing bacterial strains indigenous to contaminated tropical African soils // Biodegradation. – 2008. – Vol. 19. – P. 145–159.
5. Benimeli C.S., Castro G.R., Chaile A.P., Amoroso M.J. Lindane uptake and degradation by aquatic *Streptomyces* sp. Srain M7 // Int. Biodeterior. Biodegrad. – 2007. – Vol. 59. – P. 148–155.
6. Beyer A., Biziuk M. Environmental fate and global distribution of polychlorinated biphenyls // Rev. Environ. Contamin. Toxic. – 2009. – Vol. 201. – P. 137–158.
7. Camacho-Pérez B., Ríos-Leal E., Rinderknecht-Seijas N., Poggi-Varaldo H.M. Enzymes involved in the biodegradation of hexachlorocyclohexane: A mini review // J. Environmental Management. – 2012. – Vol. 95. – P. S306–S318.
8. De J., Ramaiah N., Sarkar A. Aerobic degradation of highly chlorinated polychlorobiphenyls by a marine bacterium, *Pseudomonas* CH07 // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – Vol. 22. – P. 1321–1327.
9. Furukawa K., Fujihara H. Microbial degradation of polychlorinated biphenyls: biochemical and molecular features // J. Biosci. Bioengin. – 2008. – Vol. 105. – P. 433–449.
10. Kolar A.B., Hrsak D., Fingler S., Cetkovic H., Petric I., Kolic N.U. PCB-degrading potential of aerobic bacteria enriched from marine sediments // Int. Biodeterior. Biodegrad. – 2007. – Vol. 60. – P. 16–24.
11. Kumar M., Gupta S.K., Garg S.K., Kumar A. Biodegradation of hexachlorocyclohexane-isomers in contaminated soils // Soil Biology Biochemistry. – 2006. – Vol. 38. – P. 2318–2327.
12. Ortiz I., Velasco A., Le Borgne S., Revah S. Biodegradation of DDT by stimulation of indigenous microbial populations in soil with cosubstrates // Biodegradation. – 2013. – Vol. 24. – P. 215–225.
13. Pieper D.H. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – Vol. 67. – P. 170–191.
14. Xie H., Zhu L., Xu Q., Wang J., Liu W., Jiang J., Meng Y. Isolation and degradation ability of the DDT-degrading bacterial strain KK // Environ. Earth Sci. – 2011. – Vol. 62. – P. 93–99.

THE SEARCH FOR NEW BACTERIA-DESTRUCTORS OF ORGANOCHLORINES
OF THE GROUP «PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS», PROMISING FOR
THE DEVELOPMENT OF INNOVATIVE ECOBIOTECHNOLOGIES

D.O. Egorova¹, D.N. Andreev², E.S.Korsakova¹, A.A. Pjankova¹,
A.S. Maksimov², A.N. Vasjanin², M.I. Degtev²

¹ Institute of ecology and genetics of microorganisms RAS UD

² Perm State University

Soil samples from regions with a various technogenic load were analyzed in this paper. A more detailed study of microbial composition of soil samples from «Osinskaya lesnaja dacha» and from the town of Chapayevsk, Samara Oblast is studied. The associations of aerobic bacteria, effectively decomposing DDT and lindane, were obtained. The strains, capable of degrading several compounds of CO₂, were singled out. It was established that the introduction of the culture strain *Rhodococcus wratislaviensis* Ch628 into the soil reduces the concentrations of the main pollutants (DDT, lindane and other hexachlorocyclohexane isomers) and leads to effective reduction of soil toxicity levels for plants and animals.

Keywords: polychlorinated biphenyls, bacterial strains, lindane, hexachlorobenzene, DDT degradation, remediation, metabolites.

Сведения об авторах

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

Андреев Дмитрий Николаевич, кандидат географических наук, заведующий лабораторией экологии и охраны природы, Пермский государственный национальный исследовательский университет (ПГНИУ), 614990, Пермь, ул. Букирева, 15; e-mail: andreev@psu.ru

Корсакова Екатерина Сергеевна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: korsakovaekaterina08@gmail.com

Пьянкова Анна Александровна, инженер лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: annpjankva@mail.ru

Максимов Андрей Сергеевич, кандидат химических наук, заведующий лабораторией химического мониторинга объектов окружающей среды, ПГНИУ; e-mail: htb03_starosta@rambler.ru

Васянин Александр Николаевич, кандидат химических наук, старший преподаватель кафедры аналитической химии, ПГНИУ; e-mail: avasyanin@gmail.com

Дёгтев Михаил Иванович, доктор химических наук, заведующий кафедрой аналитической химии, ПГНИУ; e-mail: anchem@psu.ru

Материал поступил в редакцию 21.10.2016 г.