

ПРИМЕНЕНИЕ ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ-ДЕСТРУКТОРОВ В ПРОЦЕССАХ РАЗЛОЖЕНИЯ ХИМИЧЕСКИХ ПОЛЛЮТАНТОВ

©2013 Д.О. Егорова¹, М.Г. Первова²

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь

²Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, г. Екатеринбург

Поступила 11.06.2013

В статье представлены результаты разложения коммерческих смесей полихлорированных бифенилов (ПХБ), особо опасных химических поллютантов, под действием природных аэробных бактериальных штаммов. Штаммы-деструкторы выделены из почвы, подвергнутой длительному химическому загрязнению, и принадлежат родам *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*. В результате их применения, уровень деструкции смеси ПХБ торговой марки «Делор 103» составил 78.6-98.3%, торговой марки «Совол» - 84.0-87.5%.

Ключевые слова: ПХБ, деструкция, *Rhodococcus*.

Загрязнение окружающей среды, чужеродными для природы токсичными соединениями – одна из актуальных проблем современности. Миром осуществляется несколько международных программ, направленных на оценку количества накопленных токсикантов и уровня загрязненности различных территорий, а также на разработку методов утилизации поллютантов различных классов. Одним из результатов работы ЮНЕП стало принятие в 2001 г. Стокгольмской конвенции, согласно которой выделен перечень особо опасных химических загрязнителей (стойкие органические загрязнители - СОЗ), подлежащих выводу из производства и полному уничтожению [1].

Анализ литературы показал, что одним из перспективных способов разложения соединений группы СОЗ является биодеструкция с использованием штаммов аэробных бактерий [2]. Методы биодеструкции позволяют утилизировать химически стойкие вещества и являются менее затратными, чем химические и физические методы разложения соединений группы СОЗ.

Основную долю веществ, включенных в список СОЗ, составляют хлорированные ароматические соединения, в частности полихлорированные бифенилы (ПХБ). Для ПХБ характерны: стойкость в окружающей среде, биоаккумуляция, устойчивость к деградации, острая и хроническая токсичность, трансграничный перенос на большие расстояния. Семейство полихлорированных бифенилов содержит 209 конгенов, отличающихся по количеству и расположению в молекуле в качестве заместителей ионов хлора. Также одной из особенностей, затрудняющих утилизацию ПХБ, является то, что в промышленности выпускали смеси, содержащие 20–60 конгенов, отличающихся по своей биодоступности [3].

Известны штаммы аэробных бактерий, способные окислять ПХБ, тем самым разрушая их молекулу [4,5].

В результате деятельности большинства штаммов-деструкторов разлагаются в основном низко- и среднехлорированные конгены ПХБ [4]. При этом, молекула хлорбифенила окисляется под действием бактериальных ферментов и разлагается на пентадиеновую и (хлор)бензойную кислоты. Пентадиеновая кислота используется микроорганизмами в реакциях основного обмена клетки, (хлор)бензойные кислоты служат субстратом для других групп штаммов-деструкторов.

Цель исследования – изучить эффективность применения биодеструкции с использованием природных аэробных бактериальных штаммов в процессах утилизации коммерческих смесей полихлорированных бифенилов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали почву, отобранную вблизи захоронения химических отходов г. Калуш (Ивано-Франковская обл., Украина). Анализ показал, что в данном образце почвы присутствуют два основных загрязнителя – полихлорированные бифенилы и гексахлорбензол (соединения группы СОЗ). Анализ почвы на наличие загрязнителя проводили согласно «Методике выполнения измерений массовой концентрации полихлорбифенилов в воздухе рабочей зоны, промвыбросах, природных и сточных водах и почвах методом газожидкостной хроматографии» № 88-16358-25-2000. Концентрация ПХБ в данном образце почвы превышает ПДК в 8000 раз [6].

Общее количество гетеротрофных микроорганизмов в почве оценивали методом серийных разведений с последующим высевом на чашки Петри с полноценной питательной средой LB состава (мг/л): триптон – 10, дрожжевой экстракт – 5, NaCl – 10, агар – 15; и подсчетом образовавшихся колоний. Подсчет производили по формуле

$M = (a \times 10^n) / V$, где M – количество колониеобразующих единиц в 1 мл; a – среднее число колоний, выросших после посева из данного разведения; V – объем суспензии, взятый для посева, мл; 10^n – коэффициент разведения.

Егорова Дарья Олеговна, к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: daryao@rambler.ru; Первова Марина Геннадьевна, к.х.н., старший научный сотрудник, e-mail: pervova@ios.uran.ru

Выделение аборигенных штаммов-деструкторов осуществляли как описано [7], используя метод накопительных культур и бифенил (1 г/л) в качестве источника углерода и энергии. Культивирование штаммов осуществляли в жидкой минеральной среде с бифенилом, как описано [8].

Таксономическое положение изолированных штаммов-деструкторов определяли используя анализ последовательности гена 16S рРНК [8]. Амплификацию нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК проводили, как описано ранее, с использованием бактериальных праймеров 27F и 1492R. Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК определяли с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL ("Applied Biosystems", США).

Полученные нуклеотидные последовательности были проанализированы с использованием программы CLUSTAL X 1.83. Поиск гомологичных последовательностей производили по базам данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и EzTaxon (<http://www.eztaxon.org>).

Активность аборигенных штаммов-деструкторов в отношении коммерческих смесей ПХБ «Делор 103» и «Совол» изучали в эксперименте с «отмытыми» клетками, как описано [9]. Смеси ПХБ вносили до конечной концентрации 0.6 мг/мл. Эффективность деструкции оценивали в течение 8 сут.

Анализ промежуточных продуктов бактериальной деструкции ПХБ проводили с использованием методов высокоэффективной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе LC-10ADvp ("Shimadzu", Япония) с колонкой Lichrosorb RP-18 10U (250 x 4.6 мм) ("Alltech", США) и спектроскопии на приборе UV-Visible BioSpec-mini ("Shimadzu", Япония), как описано [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ образца почвы показал, что в ней присутствуют конгенеры ПХБ с разной степенью хлорирования молекулы (рис. 1).

По составу конгенов можно предположить, что в данной почве присутствуют такие коммерческие смеси ПХБ как «Делор 103» (Словакия), «Трихлорбифенил» и «Совол» (СССР). Концентрация ПХБ составила 485 мг/кг сухой почвы.

Известно, что длительное загрязнение почвы токсическими веществами приводит к формированию уникальной микрофлоры, в которой присутствуют аэробные бактериальные штаммы, способные разлагать различные поллютанты [7].

Методом накопительного культивирования из исследуемой почвы были выделены 8 штаммов бактерий, использующих бифенил в качестве ростового субстрата (табл. 1).

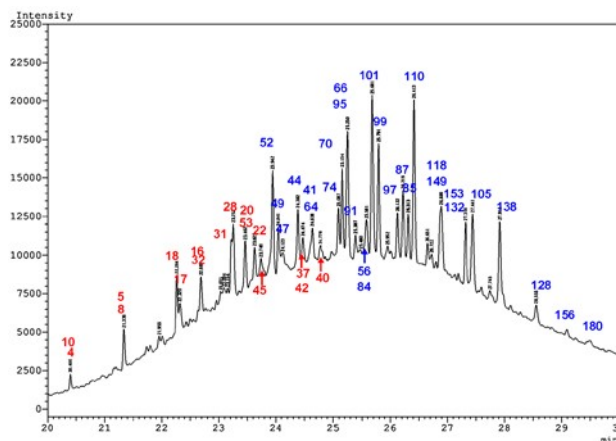


Рис. 1. ГХ-МСД хроматограмма образца почвы (цветом обозначены номера конгенов ПХБ по классификации ИЮПАК)

Таблица 1. Рост штаммов в минеральной среде с бифенилом, в качестве единственного источника углерода и энергии

Штамм	Оптическая плотность культуры (ОП ₆₀₀), оп. ед.		
	5 сут	8 сут	11 сут
MD1	0.116±0.001	0.921±0.003	1.426±0.003
MD2	0.185±0.002	1.449±0.002	1.587±0.002
MD3	0.008±0.001	0.009±0.001	0.007±0.001
MD4	0.074±0.002	0.091±0.002	0.090±0.001
MD5	0.086±0.002	0.095±0.002	0.096±0.002
MD6	0.082±0.002	0.089±0.003	0.090±0.001
MD7	0.009±0.001	0.008±0.001	0.006±0.001
MD8	0.095±0.003	0.388±0.004	1.129±0.002

Среди изолированных штаммов у пяти был проведен анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, на основании которого установлена их таксономическая принадлежность (табл. 2).

Таблица 2. Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК изолированных штаммов

Штамм	Размер фрагмента гена, н.	Типовой штамм	Номер в GenBank	% сходства
MD1	631	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> NCIMB 13082 ^T	Z37138	99.8
MD2	630	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> NCIMB 13082 ^T	Z37138	99.8
MD6	820	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> KMM 1447 ^T	AB176954	97.9
MD7	165	<i>Bacillus vietnamensis</i> 15-1 ^T	AB099708	100
MD8	705	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> IH5 ^T	AY152673	98.3

Таким образом, на основании молекулярно-генетических признаков штаммы MD1 и MD2 идентифицированы как *Rhodococcus* sp., штаммы MD6 и MD8 – как *Pseudomonas* sp., а штамм MD7 – как *Bacillus* sp. Для дальнейших исследований были отобраны штаммы *Rhodococcus* sp. MD1, *Rhodococcus* sp. MD2, *Pseudomonas* sp. MD8.

В «остром» эксперименте установлено, что штаммы *Rhodococcus* sp. MD1, *Rhodococcus* sp. MD2 и *Pseudomonas* sp. MD8 эффективно разлагают коммерческую смесь ПХБ «Делор 103» и «Совол» в концентрации, сопоставимой с уровнем загрязненности хлорбифенилами исследуемой почвы (табл. 3, 4).

Таблица 3. Разложение «Делора 103» изолированными штаммами-деструкторами

Время, сут	Концентрация «Делор 103», мг/мл		
	MD1	MD2	MD8
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

Анализ результатов показал, что уровень деструкции «Делора 103» штаммом *Pseudomonas* sp. MD8 составил 78.6%, а при использовании штам-

мов рода *Rhodococcus* – 89.5-98.3%. При разложении смеси «Совол» установлено, что штамм *Pseudomonas* sp. MD8 разлагает 87.5% смеси, тогда как штаммы *Rhodococcus* sp. MD1 и MD2 – 84.0% и 86.9% соответственно. По видимому, штамм *Pseudomonas* sp. MD8 проявляет большую активность к конгенерам ПХБ, содержащим более 4 заместителей в молекуле (в «Соволе» преобладают пента- и гексахлорированные бифенилы [2]), тогда как штаммы *Rhodococcus* sp. MD1 и MD2 эффективнее разлагают ди- три- и тетрахлорированные бифенилы.

Таблица 4. Разложение «Совола» изолированными штаммами-деструкторами

Время, сут	Концентрация «Совола», мг/мл		
	MD1	MD2	MD8
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

Анализ образующихся промежуточных соединений показал, что разложение конгенов ПХБ происходит с разрывом молекулы и образованием хлор- и гидроксibenзойных кислот (рис. 2).

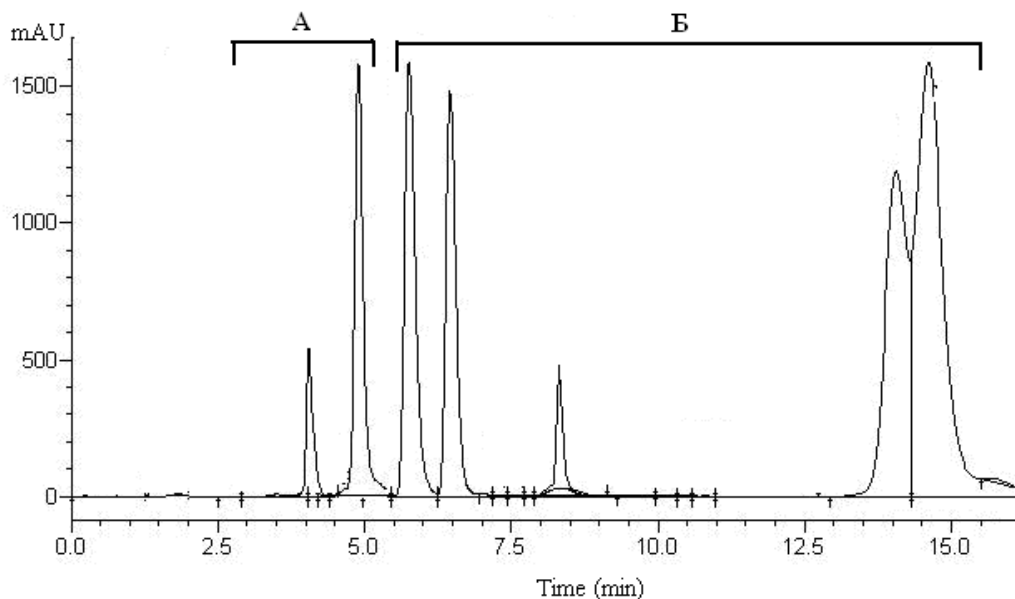


Рис. 2. ВЭЖХ-хроматограмма продуктов бактериальной деструкции коммерческих смесей ПХБ штаммами *Rhodococcus* sp. MD1, *Rhodococcus* sp. MD2, *Pseudomonas* sp. MD8: А – гидроксизамещенные бензойные кислоты, Б – хлорзамещенные бензойные кислоты

Известно, что гидроксibenзойные кислоты являются основными метаболитами при разложении хлорированных бензойных кислот [9].

Полученные результаты позволяют предположить, что штаммы осуществляют разложение не только ПХБ, присутствующих в коммерческих смесях, но и хлорбензойные кислоты, образующиеся как основной продукт бактериальной деструкции ПХБ.

В результате использования природных аэробных бактериальных штаммов удалось достичь вы-

сокого уровня деструкции коммерческих смесей ПХБ торговых марок «Делор 103» и «Совол». Установлено, что штамм *Pseudomonas* sp. MD8 эффективнее разлагает смесь «Совол» - 87.5%, а штаммы *Rhodococcus* sp. MD1 и MD2 проявляют высокую деградационную активность к смеси «Делор 103» (уровень деструкции 89.5 – 98.3%).

Также применение данных штаммов позволяет осуществить разложение ПХБ без образования опасных промежуточных продуктов.

Работа поддержана Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» №01201256872, грантом РФФИ-Урал №11-04-96028-р_урал_а, междисциплинарным проектом УрО РАН №12-М-34-2036.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. URL: <http://chm.pops.int>
2. Васильева Г.К., Стрижакова Е.Р. Биоремедиация почв и седиментов, загрязненных полихлорированными бифенилами // Микробиология. 2007. Т. 76. № 6. С. 725-741.
3. Полихлорбифенилы: Проблемы экологии, анализа и химической утилизации / Под ред. В.Н. Чарушина. М.: КРАСАНД; Екатеринбург: УрО РАН, 2011. 400 с.
4. *Unterman R.* A history of PCB biodegradation // *Bioremediation. Principles and Applications* / Eds Crawford R.L., Crawford D.L. 1996. P. 209-253.
5. *Pieper D.H.* Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. V. 67. N 2. P. 170-191.
6. Приказ МЗ СССР от 08.09.86 г № 697.
7. Плотникова Е.Г., Рыбкина Д.О., Ананьина Л.Н., Ястребова О.В., Демаков В.А. Характеристики микроорганизмов, выделенных из техногенных почв прикамья // *Экология.* 2006. № 4. С. 261-268.
8. Егорова Д.О., Корсакова Е.С., Демакова В.А., Плотникова Е.Г. Деструкция ароматических углеводородов штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7, выделенным из отходов соледобывающего предприятия // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2013. Т. 49. № 3. С. 267-278.
9. Егорова Д.О., Шумкова Е.С., Демаков В.А., Плотникова Е.Г. Разложение хлорированных бифенилов и продуктов их биоконверсии штаммом *Rhodococcus* sp. В7а // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2010. Т. 46. № 6. С. 644-650.

APPLICATION OF NATURAL STRAINS-DESTRUCTORS IN THE DEGRADATION PROCESS OF THE CHEMICAL POLLUTANTS

©2013 D.O. Egorova¹, M.G. Pervova²

¹Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm

²Institute of Organic Synthesis, UB RAS, Ekaterinburg

The results of the decomposition of commercial mixtures of polychlorinated biphenyls (PCBs), highly hazardous chemical pollutants, under the influence of natural aerobic bacterial strains were demonstrated. Strains-destructors isolated from soils subjected to long-term chemical contamination, and belong to the genus *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*. As a result of their use, the level of destruction of PCB mixtures brands "Delors 103" was 78.6-98.3%, the brands "Sovol" - 84.0-87.5%.

Key words: PCB, degradation, *Rhodococcus*.