

## БАКТЕРИИ - ДЕСТРУКТОРЫ СТОЙКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ – ЭФИРОВ ФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЭКОБИОТЕХНОЛОГИЙ

©2013 Е.С. Корсакова, А.А. Пьянкова, Е.Г. Плотникова

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь

Поступила 11.06.2013

В данной статье рассмотрена проблема микробиологического разложения экологически опасных поллютантов на примере дибутилфталата - как одного из распространенных загрязнителей, в том числе в отходах калийного производства. Из образцов техногенно-минеральных образований, почвы и грунта территории соледобывающего предприятия ОАО «Уралкалий» (г. Березники, г. Соликамск, Пермский край) выделены активные галотолерантные штаммы-деструкторы дибутилфталата, перспективные для создания биотехнологии на основе микробной деструкции экотоксикантов. Проведен филогенетический анализ изолированных бактерий, на основании которого штаммы-деструкторы были отнесены к родам *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Dietzia*, *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Halomonas* и *Pseudomonas*.

**Ключевые слова:** орто-фталевая кислота, дибутилфталат, бактерии-деструкторы, ген 16S рРНК.

В последнее время перед мировым сообществом все более остро стоит проблема утилизации экологически опасных поллютантов, а именно, соединений, отнесенных к группе стойких органических загрязнителей (СОЗ). Перечень СОЗ включает в себя 28 наименований, большинство из которых имеют техногенное происхождение, детектируются в составе компонентов природных геосистем, обладают токсичностью, биоаккумуляцией и устойчивостью к разложению [1]. Многие из этих поллютантов относятся к полициклической ароматике, галогенуглеводородам или фталатам. Последняя группа соединений вследствие интенсивного производства синтетических полимеров имеет весьма широкое распространение в объектах окружающей среды (воздухе, почве, водоемах, морской воде) [2, 3].

Наличие значительных количеств фталатов выявлено в районах интенсивной работы предприятий горнодобывающей промышленности. Данные соединения обнаружены в глинисто-солевых шламах, избыточных рассолах и отходах калийного производства (разработки Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей, Пермский край). Высокий уровень загрязнения отходов подобного производства обусловлен использованием в технологическом цикле обогащения калийных руд целой гаммы реагентов (оксиэтилированные жирные кислоты, нефтепродукты, диоксановые спирты и другие), продуктами трансформации которых и являются фталаты [4].

Фталаты и их метаболиты обладают гепатотоксичными, тератогенными и канцерогенными свойствами и признаны потенциально опасными для человека и животных. Исследования показали, что данные соединения легко высвобождаются из изделий и попадают в организм человека с пищей,

через кожу и при вдыхании. Даже небольшие дозы фталатов могут приводить к изменению гормонального фона, нарушению работы печени и почек. Несмотря на это, производство продукции, содержащей фталаты, продолжается и в настоящее время [3].

Одним из эфиров фталевой кислоты, наиболее широко используемых в химической промышленности, является дибутилфталат (ДБФ). Он обладает высокой растворяющей способностью и низкой вязкостью, что обуславливает его применение для изменения свойств полимеров с целью повышения их эластичности, морозостойкости, а также понижения температуры переработки в готовые изделия. ДБФ применяется в резинотехническом производстве, а также при изготовлении искусственных пленок и кож. Большие объемы этого вещества используют предприятия, изготавливающие кабельные пластикаты, эфир целлюлозы, линолеум, лаки и искусственные смолы. Кроме этого, дибутилфталат применяется как репеллент и растворитель, имеющий высокую температуру кипения.

Разложение ДБФ может осуществляться как с помощью химических методов (гидролиз, фотолиз и т.п.), так и биологическими методами (микробная деструкция).

Известно, что период полураспада данного экотоксиканта в окружающей среде составляет от нескольких месяцев до 20 лет и основную роль в процессе разложения ДБФ выполняют бактерии-деструкторы [3].

Среди бактерий, способных осуществлять разложение фталатов (дибутилфталата), выявлены представители родов *Sphingomonas*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Bacillus*, *Delftia*, *Acinetobacter* [3]. Метаболические пути разложения дибутилфталата сочетают два процесса: первичная биodeградация ДБФ до монобутилфталата и последующая его деструкция до орто-фталевой кислоты (о-ФК), являющейся ключевым интермедиатом. Разложение о-ФК аэробны-

Корсакова Екатерина Сергеевна, аспирант, e-mail: Camomille-08@mail.ru; Пьянкова Анна Александровна, инженер; Плотникова Елена Генриховна, д.б.н., ведущий научный сотрудник, e-mail: peg@iegpm.ru

ми бактериями осуществляется через образование протокатеховой кислоты до основных продуктов жизнедеятельности микробной клетки (рис.) [5].

Таким образом, одним из приоритетных направлений исследований в развитии новых экобиотехнологий детоксикации опасных поллютантов является изучение бактериальной деструкции фта-

латов на примере дибутилфталата (ДФФ) как широко распространенного загрязнителя [5].

Цель настоящей работы – выделение и характеристика бактерий-деструкторов *орто*-фталата и дибутилфталата из районов промышленных разработок Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей.

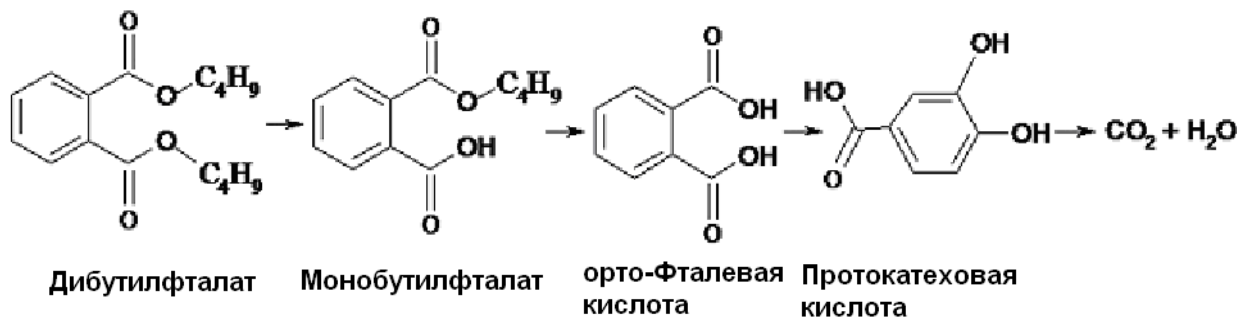


Рис. Схема бактериальной деструкции дибутилфталата (по [5])

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве материалов для исследования были использованы образцы техногенно-минеральных образований (ТМО) из шламохранилищ соледобывающего предприятия ОАО «Уралкалий» (г. Березники, Пермский край), а также образцы почвы и грунта, отобранные около солеотвалов (г. Соликамск, Пермский край). Выделение бактерий проводили как методом прямого посева, так и методом накопительного культивирования на минеральной среде Раймонда с *о*-фталатом [6]. Для более подробного изучения были отобраны штаммы микроорганизмов, способных к активному росту на *орто*-фталевой кислоте как основном интермедиате метаболического пути разложения ДБФ (рис. 1).

Оценка роста при культивировании на агаризованной минеральной среде Раймонда проводилась по формированию колоний: слабый рост «+» – колонии размером менее 1 мм, средний рост «++» – колонии размером 1-2 мм, хороший рост «+++» – колонии размером более 2 мм, «-» – отсутствие роста, а также при культивировании в жидкой минеральной среде Раймонда. В качестве субстратов использовали *о*-ФК в концентрации 1 г/л и ДБФ в концентрации 0.2 г/л. NaCl добавляли до конечной концентрации 30 г/л.

Оптическую плотность (ОП) культуральной жидкости определяли на спектрофотометре UV-Visible BioSpec-mini («Shimadzu», Япония) при 600 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Устойчивость бактерий к NaCl (0-12%) определяли на богатой агаризованной среде Раймонда, в составе которой присутствуют триптон (5.0 г/л) и дрожжевой экстракт (2.5 г/л).

Филогенетический анализ полученных изолятов был основан на определении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК 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 программ CLUSTAL W, Sequence Scanner v1.0. Поиск гомологичных последовательностей производили по базам данных GenBank [7] и EzTaxon [8].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенной работы из исследуемых образцов было выделено 17 штаммов бактерий, способных к активному росту на *о*-ФК в качестве единственного источника углерода и энергии (таб. 1). Было показано, что оптическая плотность (ОП<sub>600</sub>) бактериальных культур, растущих в жидкой минеральной среде Раймонда с *о*-ФК, составляла от 0.2 до 0.4 о.е. Далее все 17 штаммов-деструкторов *о*-ФК были проверены на способность к росту на дибутилфталате в концентрации 0.2 г/л в качестве субстрата (табл. 1).

Среди исследуемых изолятов выявлены наиболее активные штаммы-деструкторы (BO25, 2RN2-1, 9RN1-12, 9RN3-21, 9RN9-111, 18CN2-222), различные по грампринадлежности и морфологическим признакам, но характеризующиеся эффективным ростом на *о*-ФК и ДБФ.

Выделенные бактерии способны к росту как при отсутствии в среде хлорида натрия, так и при его повышенной концентрации, т.е. являются галотолерантными микроорганизмами. Большинство исследуемых штаммов растет в диапазоне концентрации NaCl от 0% до 6%. Три изолята (BO4, BO141, BO33) более устойчивы к повышенной минерализации и растут в присутствии 120 г/л соли в среде культивирования.

Ранее нами был подробно исследован штамм *Rhodococcus wratislavensis* КТ112-7, выделенный из ТМО шламохранилища предприятия БКРУ-1 ОАО «Уралкалий» (г. Березники, Пермский край). Было показано, что *R. wratislavensis* КТ112-7 осуществляет утилизацию высоких концентраций *о*-ФК (до 8 г/л) и растет на данном субстрате при содержании

**Таблица 1.** Штаммы бактерий, выделенные из ТМО, почвы и грунта района солеразработок (ОАО «Уралкалий», Пермский край)

Штамм	Источник выделения	Рост на о-ФК	Рост на ДБФ
BO1	ТМО, шламохранилище БКПРУ-2 (г. Березники), образец № 1, глубина отбора пробы 0,5 м	+++	++
BO4		+++	+
BO9		+++	++
BO11		+++	–
BO141		+++	–
BO19		++	++
BO25	ТМО, шламохранилище БКПРУ-2 (г. Березники), образец № 2, глубина отбора пробы 0,2 м	+++	+++
BO33	ТМО, шламохранилище БКПРУ-2 (г. Березники), образец №3, глубина отбора пробы 0,4 м	++	+++
BO34-1		++	+++
BO34-2		++	+++
КТ723	ТМО, шламохранилище БКПРУ-1 (г. Березники), образец №4, глубина отбора пробы 0,1 м	+++	++
2RN2–1	Почва, 10 м от солеотвала (СКПРУ-2, г. Соликамск)	+++	+++
9RN1–12		+++	+++
9RN3–21		+++	+++
9RN9–111		+++	+++
9CN1	Грунт, 15 м от солеотвала (СКПРУ-2, г. Соликамск)	++	++
18CN2–222	Грунт, берег р. Черной, 30 м от солеотвала (СКПРУ-2, г. Соликамск)	+++	+++

NaCl в среде культивирования до 75 г/л. Штамм обладает широкой субстратной специфичностью и растет на нафталине, бифениле, бензоле, толуоле, феноле, бензойной кислоте, 2,5-гидроксibenзойной кислоте (ГБК), 3,4-ГБК, 4-ГБК [6]. В результате настоящего исследования было показано, что штамм КТ112-7 также способен к росту и на ДБФ как единственном источнике углерода и энергии.

Все изолируемые в настоящей работе штаммы были идентифицированы на основе анализа гена 16S рНК. Установлено, что штаммы являются

представителями классов *Actinobacteridae*, *Bacilli* и *Gammaproteobacteria*. Среди актинобактерий выявлено пять штаммов рода *Rhodococcus*, четыре штамма рода *Arthrobacter* и один штамм рода *Dietzia* (таб. 2). Изоляты филогенетически близкие к спорообразующим бактериям класса *Bacilli* порядка *Bacillales* представлены двумя родами *Bacillus* и *Exiguobacterium*. Кроме того, выявлены представители класса *Gammaproteobacteria*, относящиеся к порядкам *Oceanospirillales* (род *Halomonas*) и *Pseudomonadales* (род *Pseudomonas*) (табл. 2).

**Таблица 2.** Филогенетический анализ выделенных бактерий-деструкторов

Штамм	Идентификация по гену 16S рНК		
	Типовой штамм	Сходство, %	Количество анализируемых нуклеотидов
BO1	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> NCIMB 13082 <sup>1</sup>	99,7	670
BO4	<i>Bacillus firmus</i> NCIMB 9366 <sup>1</sup>	99.3	908
BO9	<i>Dietzia maris</i> DSM 43672 <sup>1</sup>	99.8	887
BO11	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> KMM 1447 <sup>1</sup>	99	1434
BO141	<i>Bacillus flexus</i> IFO 15715 <sup>1</sup>	100	722
BO19	<i>Arthrobacter oxydans</i> DSM 20119 <sup>1</sup>	100	1233
BO25	<i>Arthrobacter nicotianae</i> DSM 20123 <sup>1</sup>	99.1	1387
BO33	<i>Bacillus vietnamiensis</i> 15-1 <sup>1</sup>	99	604
BO34-1	<i>Arthrobacter oxydans</i> DSM 20119 <sup>1</sup>	100	1401
BO34-2	<i>Arthrobacter oxydans</i> DSM 20119 <sup>1</sup>	100	1401
КТ723	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> NCIMB 13082 <sup>1</sup>	99.7	669
2RN2–1	<i>Bacillus vietnamiensis</i> 15-1 <sup>1</sup>	100	162
9RN1–12	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> NCIMB 13082 <sup>1</sup>	99.9	1323
9RN3–21	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> NCIMB 13082 <sup>1</sup>	99.9	1321
9RN9–111	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> NCIMB 13082 <sup>1</sup>	100	1344
9CN1	<i>Exiguobacterium mexicanum</i> 8N <sup>1</sup>	100	814
18CN2–222	<i>Halomonas boliviensis</i> LC1 <sup>1</sup>	99.6	796

Таким образом, в результате проведенного исследования выделены в чистую культуру и охарактеризованы перспективные для использования в новых биотехнологиях защиты окружающей среды бактерии-деструкторы дибutilфталата – широко распространенного токсичного загрязнителя. Исследованные в настоящей работе галотолерантные штаммы-деструкторы могут применяться для биоремедиации почв и грунтов с повышенной минерализацией.

Работа выполнена в рамках научного проекта молодых ученых УрО РАН №13-4-НП-448.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. URL: <http://chm.pops.int/>
2. Барштейн П.С., Кирилович В.И., Носовский Ю.Е. Пластификаторы для полимеров. М.: Химия, 1982. 197 с.
3. Liang D.-W., Zhang T., Fang H. Phthalates biodegradation in the environment // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 80. P. 183-198.
4. Бачурин Б.А., Одинцова Т.А. Стойкие органические загрязнители в отходах горного производства // Современные экологические проблемы Севера. Апатиты: Изд-во Кольского НЦ РАН, 2006. Ч. 2. С. 7-9.
5. Jin D.-C., Liang R.-X. Biodegradation of Di-n-Butyl Phthalate by *Rhodococcus* sp. JDC-11 and Molecular Detection of 3,4-Phthalate Dioxygenase Gene // Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 20. N 10. P. 1440-1445.
6. Егорова Д.О., Корсакова Е.С., Демаков В.А., Плотникова Е.Г. Деструкция ароматических углеводов штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7, выделенным из отходов соледобывающего предприятия // Прикладная биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. № 3. С. 267-278.
7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
8. URL: <http://www.eztaxon.org/>

### BACTERIA-DESTRUCTORS OF PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS – PHTHALIC ACID ESTERS, AS A BASIS FOR THE CREATION OF NEW ECOBIOTECHNOLOGY

©2013 E.S. Korsakova, A.A. Pyankova, E.G. Plotnikova

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of RAS, Perm

In this article we analyzed the problem of microbial degradation of environmentally dangerous pollutants by the example of dibutyl phthalate as one of the most common pollutants, including waste potash production. From the samples of technogenic mineral formations, soil and ground of a salt-mining plant JSC "Uralkali" (Berezniki, Solikamsk, Perm krai) there were isolated active halotolerant strains- destructors of dibutyl phthalate being promising for creation a biotechnology based on microbial degradation of toxicants. Following a phylogenetic analysis of the isolated bacteria the strains- destructors were assigned to the genera *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Dietzia*, *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Halomonas* and *Pseudomonas*.

**Key words:** ortho-phthalic acid, dibutyl phthalate, bacteria- destructors, 16S rRNA gene.