

МИКРООРГАНИЗМЫ, РАЗЛАГАЮЩИЕ ФТОРКАРБОНОВЫЕ КИСЛОТЫ

©2013 Д.А. Шарипов, С.П. Четвериков

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 12.06.2013

Из техногенно загрязненных почв с предприятий Республики Башкортостан выделены 9 бактериальных штаммов, способных к разложению фторкарбонových кислот.

Ключевые слова: микроорганизмы, деструкторы, фторкарбонových кислоты.

Быстрый рост промышленного органического синтеза привел к широкому производству и выпуску ксенобиотиков, судьба которых в биологическом загрязнении окружающей среды неизвестна. Галогенированные соединения, часто обнаруживаемые в потоках отходов, и их токсические свойства стимулировали исследования по их микробному метаболизму. Биодegradация многих хлорированных органических соединений уже была изучена. Поведение фторированных соединений было менее изучено (хотя их использование в сельскохозяйственных и промышленных процессах велико, и случаи загрязнения окружающей среды становятся более частыми). Фторированные соединения используются в качестве агрохимикатов, лекарственных препаратов. Такие соединения считаются биологически более инертными и, следовательно, меньше оказывают влияние на здоровье человека или окружающую среду. С другой стороны, инертные молекулы, как правило, сохраняются и накапливаются в трофических цепях и более трудно удаляются. Фторсодержащие соединения имеют значительные биологические эффекты, они являются ингибиторами ферментов и модификаторами межклеточных коммуникаций и они могут привести к нарушению мембранного транспорта и процессов преобразования энергии. Фторкарбонových кислоты представляют собой бесцветные жидкости или кристаллические вещества. Они кипят при температуре примерно на 50°C ниже температуры кипения соответствующих карбонových кислот. Плотность этих кислот очень велика [1, 2]. Благодаря своеобразию свойств фторкарбонových кислот и возможности широко использовать их для научных и промышленных целей, они служат объектом интенсивных исследований и в настоящее время являются хорошо изученной группой веществ. К наиболее интересным свойствам кислот следует отнести низкое поверхностное натяжение, хорошую растворимость, высокую кислотность (приближающуюся к кислотности минеральных кислот), стойкость к окислению.

Производные фторкарбонových кислот считались во время второй мировой войны пригодными для заражения питьевой воды, так как они не

имеют ни запаха, ни вкуса. Несомненно, что для этой цели они сохраняют свое значение и впредь [3]. Перфторкарбонových кислоты — синтетические химические соединения, применяемые в производстве широко используемых фторполимеров. Перфторкарбонových кислоты являются поверхностно-активными веществами, обладают высокой химической стабильностью, что делает их идеальными материалами для широкого применения (например, антипригарное покрытие для посуды, влаго- и пятноустойчивые покрытия для текстиля, смазки, упаковка пищевых продуктов, противопожарная пена и т. д.). Будучи крайне устойчивыми к биоразложению, перфторкарбонových кислоты к настоящему времени обнаруживаются во многих объектах окружающей среды и живых организмах. Перфтороктановая кислота является наиболее часто детектируемым загрязнителем этого класса [4, 5]. Исследования показывают, что перфторкарбонových кислоты очень медленно выводятся из организма человека — от 2 лет до 21 года, практически не подвергаются метаболизму и накапливаются в организме (в основном в почках и печени) [9]. Также они влияют на репродуктивную и эндокринную системы [7, 8]. Доказаны их канцерогенные свойства [9]. Перфторкарбонových кислоты, а также перфтороктансульфонат внесены в Список опасных веществ, представляющих угрозу для Балтийского моря, разработанный странами — членами Хельсинской комиссии, включающей и Российскую Федерацию [10]. Эти соединения признаны характерными загрязнителями экосистемы Балтийского моря и поэтому подлежат мониторингу и нормированию в биоте, воде и донных отложениях [11]. Работы по определению содержания перфторкарбонových кислот в объектах окружающей среды, в частности в природной воде, ведутся во многих странах. По литературным данным, уровень концентраций в пробах природной воды составляет от десятков мг/л до сотен нг/л [6, 12].

Проблема очистки наземных и водных экосистем, загрязненных токсичными, устойчивыми к разложению химическими соединениями, занимает центральное место в ряду важнейших задач современной эковиотехнологии. Преимущество применения биологических методов дезактивации фторорганических соединений объясняется тем, что

Шарипов Данил Альмирович, аспирант, e-mail: biolab316@yandex.ru; Четвериков Сергей Павлович, д.б.н., ведущий научный сотрудник, e-mail: biolab316@yandex.ru

микроорганизмы минерализуют их и другие продукты органического синтеза в естественном цикле круговорота веществ, не оказывая отрицательного влияния на окружающую среду. Поэтому скрининг и идентификация штаммов микроорганизмов-деструкторов фторорганических соединений является актуальной задачей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Выделение штаммов-деструкторов фторорганических соединений производили из образцов почв с территории промышленных предприятий Республики Башкортостан. Для получения микроорганизмов методом накопительных культур 1 г почвы помещали в колбы (объем 250 мл) со 100 мл жидкой минеральной среды Раймонда (г/л): $\text{Na}_2\text{CO}_3 - 0,1$; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O} - 0,2$; $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O} - 0,02$; $\text{CaCl}_2 - 0,01$; $\text{MnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O} - 0,02$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O} - 1,0$; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O} - 1,5$; $\text{NH}_4\text{Cl} - 3$ [13].

В качестве единственного источника углерода и энергии вносили стерильную перфторэнантовую (перфторгексановую) или перфторпеларгоновую (перфторнонановую) кислоту в количестве 0,1–3% (по объему). Культивирование проводили в статических условиях при температуре 28°C в течение 7 сут при периодическом встряхивании.

Бактериальные штаммы выделяли из накопительных культур на агаризованной минеральной среде Раймонда без пептона, на поверхность которой наносили углеводородный субстрат – 100 мкл стерильной перфторэнантовой кислоты. Культивирование микроорганизмов в чашках Петри осуществляли при температуре 28°C. Изолирование полученных колоний микроорганизмов проводили по морфолого-физиологическим признакам.

Чистоту выделенных культур проверяли общепринятыми методами – микроскопическим контролем и высевом на агаризованную среду МПА [14].

Идентификацию чистых культур микроорганизмов – деструкторов фторорганических соединений проводили по морфологическим, физиологическим и биохимическим признакам, используя общепринятые руководства [15–18].

Культивирование штаммов проводили в колбах со 100 мл питательной среды Раймонда без пептона, в которую инокулировали 1 мл бактериальной суспензии. В качестве источника углерода и энергии добавляли перфторпеларгоновую кислоту в количестве 0,2 г. Инкубирование осуществляли в стационарных условиях при температуре 28°C в

течение 7 сут на протяжении которых несколько раз измеряли титр микроорганизмов.

Определение титра бактериальных суспензий производили их посевом в чашках Петри на агаризованной питательной среде с 0,1% пептоном поверхностным способом в трех повторностях. В качестве углеводородного субстрата вносили 200 мкл стерильной перфторпеларгоновой кислоты.

Способность к деструкции оценивали по способности роста в жидкой среде с единственным источником углерода в виде фторкарбонной кислоты. Каждую колбу инокулировали бактериальной суспензией до начальной оптической плотности при 450 нм около 0,02. Определение оптической плотности бактериальных суспензий проводили на спектрофотометре модели СФ-56 (Россия). Инкубирование осуществляли при температуре 28°C в течение 7 сут, на протяжении которых несколько раз измеряли оптическую плотность бактериальной суспензии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе работы выделены 9 бактериальных изолятов, способных деградировать перфторпеларгоновую кислоту в жидкой среде.

Дальнейший эксперимент показал, что исследованные культуры различались по способности утилизировать перфторпеларгоновую и перфторэнантовую кислоты. Некоторые штаммы демонстрировали очень низкую деструктивную активность, что могло быть вызвано уменьшением растворимости субстратов.

Были отобраны 5 наиболее эффективных штаммов, среди них оказались представители рр. *Pseudomonas* и *Rhodococcus*, они были способны использовать в качестве единственного источника углерода перфторпеларгоновую и перфторэнантовую кислоты.

Концентрация биомассы при культивировании на среде с перфторэнантовой кислотой увеличилась в 3000 раз у штамма 2,4-D, в 200 раз у штамма 1.4, в 15–20 раз у 3 штаммов 1.1, 1.2, 1.3.

В то же время на среде с перфторпеларгоновой кислотой увеличение было выше и составило для штамма 2,4-D в 3500 раз, в 300 раз для штамма 1.4, в 15–30 раз для 3 штаммов 1.1, 1.2, 1.3 (табл. 1), что согласуется с данными о том, утилизация перфторированных карбоновых кислот с длиной цепи меньше 8 атомов углерода происходит намного хуже.

Таблица 1. Динамика численности штаммов – деструкторов фторкарбонных кислот

Штамм	Численность микроорганизмов, КОЕ/мл					
	Перфторэнантовая кислота (1%)			Перфторпеларгоновая кислота (1%)		
	Исходная суспензия	4 сутки	7 сутки	Исходная суспензия	4 сутки	7 сутки
1.1	$2,1 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$	$4,0 \times 10^6$	$4,9 \times 10^6$
1.2	$2,5 \times 10^5$	$3,2 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$2,4 \times 10^5$	$3,8 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$
1.3	$2,1 \times 10^5$	$3,0 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$	$5,0 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$
1.4	$2,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$	$2,1 \times 10^5$	$2,5 \times 10^7$	$5,8 \times 10^7$
2,4-D	$2,1 \times 10^5$	$5,0 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	$2,2 \times 10^5$	$6,6 \times 10^8$	$7,3 \times 10^8$

При анализе данных изменения оптических плотностей бактериальных суспензий исследуемых штаммов при культивировании на фторкарбонных кислотах можно заметить ее увеличение во всех вариантах эксперимента, причем максимальное

увеличение наблюдается также у штамма 2,4-D (табл. 2). Ранее штамм 2,4-D был описан в качестве деструктора хлорорганических соединений [19], в частности 2,4 – дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), являющейся основой для ряда гербицидов.

Таблица 2. Изменение оптической плотности бактериальных суспензий штаммов-деструкторов фторкарбонных кислот

Штамм	Оптическая плотность при 450 нм					
	Перфторэнантовая кислота (1%)			Перфторпеларгоновая кислота (1%)		
	Исходная суспензия	4 сут	7 сут	Исходная суспензия	4 сут	7 сут
1.1	0,026	0,160	0,186	0,021	0,120	0,191
1.2	0,028	0,202	0,260	0,025	0,155	0,176
1.3	0,028	0,136	0,169	0,021	0,163	0,240
1.4	0,029	0,149	0,205	0,025	0,154	0,180
2,4-D	0,022	0,303	0,381	0,026	0,286	0,361

После 7-х сут культивирования увеличения концентрации биомассы и оптической плотности при 450 нм не наблюдалось. Возможно, это свидетельствует о накоплении промежуточных продуктов.

Тормозящее влияние исходных концентраций фторкарбонных кислот на темп роста микроорганизмов сказывается при их концентрации выше 1 %, на примере штамма 2,4-D данные в таблице 3.

Таблица 3. Динамика численности штамма 2,4-D в зависимости от исходной концентрации фторкарбонной кислоты в среде

Концентрация кислоты, %	Численность микроорганизмов, КОЕ/мл					
	Перфторэнантовая кислота			Перфторпеларгоновая кислота		
	Исходная суспензия	4 сут	7 сут	Исходная суспензия	4 сут	7 сут
0,1	$2,2 \times 10^5$	$4,8 \times 10^8$	$3,3 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$	$5,2 \times 10^8$	$3,5 \times 10^6$
1,0	$2,1 \times 10^5$	$5,0 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	$2,2 \times 10^5$	$6,6 \times 10^8$	$7,3 \times 10^8$
1,5	$2,2 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$\leq 10^3$	$2,1 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$\leq 10^3$
3,0	$2,2 \times 10^5$	$\leq 10^3$	$\leq 10^3$	$2,1 \times 10^5$	$\leq 10^3$	$\leq 10^3$

Таким образом, показано, что природные микроорганизмы, выделенные из почв промышленных предприятий Республики Башкортостан, обладают способностью роста на фторсодержащих субстратах и утилизации фторкарбонных кислот.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кнунянц И.Л., Фокин А.В. Покорение неприступного элемента. М.: Издательство Академии наук СССР, 1963. 133 с.
2. Дж Саймонс. Фтор и его соединения. М.: Издательство иностранной литературы, 1953. 122 с.
3. Лос К. Синтетические яды. М.: Издательство иностранной литературы, 1963. 258 с.
4. Yamashita N., Kannan K., Taniyasu S. A global survey of perfluorinated acids in oceans // Marine Pollution Bulletin. 2005. V. 51. P. 658 – 668.
5. Tao L., Kannan K., Kajiwara N. Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in Albatrosses, Elephant Seals, Penguins, and Polar Skuas from the Southern Ocean // Environmental Science and Technology. 2006. V. 40. P. 7642–7648.
6. Hazardous substances of specific concern to the Baltic Sea. Final report of the HAZARDOUS project Balt. Sea Environ. HELCOM. 2009. Proc. N 119. 96 p.
7. Apelberg B.J., Witter F.R., Herbstman J.B. Cord serum concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in relation to weight and size at birth // Environmental Health Perspectives. 2007. V. 115. P. 1670-1676.
8. Betts K. PFOS and PFOA in humans: new study links prenatal exposure to lower birth weight // Environmental Health Perspectives. 2007. V. 115. P. 550.
9. Anderson M.E., Butenhof J.L., Chang S. Perfluoroalkyl acids and related chemistries — Toxicokinetics and Modes of Action // Toxicological Sciences. 2008. V. 102. P. 3-14.
10. Proposals for measures and actions for the reduction of pollution from hazardous substances for the Baltic Sea Action Plan, September, 2007.
11. Сборник рекомендаций Хельсинской комиссии. Справочно-методическое пособие. Санкт-Петербург: Экология и бизнес, 2008.
12. Innovative approaches to chemicals control of hazardous substances. WP3 final report, October, 2011. Finnish Environment Institute SYKE.
13. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // Develop. Industr. Microbiol. 1961. V. 2. P. 23-32.
14. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / под ред. Н.С. Егорова. М.: Изд-во Московского ун-та, 1983. 215 с.
15. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхардта. М.: Мир, 1984. Т. 3. 264 с.
16. Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н., Лысак Л.В. Методы идентификации и выделения почвенных бактерий. М.: Изд-во Московского ун-та, 1990. 76 с.
17. Определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Хоулт. М.: Мир, 1997. Т. 1, 2.
18. The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications / Eds. A. Balows. Berlin, New York: Springer-Verlag, 1992. V. 1-4.

19. *Кориунова Т.Ю., Шарипов Д.А., Логинов О.Н.* Бактерии *Pseudomonas* sp., разлагающие 2,4 – дихлорфеноксиуксусную кислоту // Биомика. 2012. Т. 3. № 1: Материалы

III Всероссийской школы-конференции «Биомика – наука XXI века» (Уфа, 30 октября – 1 ноября 2012 г.). Уфа, 2012. С. 57.

MICROORGANISMS DECOMPOSING FLUOROCARBONIC ACIDS

© 2013 D.A. Sharipov, S.P. Chetverikov

Institute of Biology of Ufa Scientific Center RAS, Ufa

From anthropogenic contaminated soils of Bashkortostan Republic are allocated 9 bacterial strains capable to degradation fluorocarbonic acids.

Keywords: *microorganisms, degradation, fluorocarbonic acids.*