

УДК 631.46:579.222.2

**БАКТЕРИАЛЬНАЯ АССОЦИАЦИЯ – ДЕСТРУКТОР СТОЙКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ
ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ (ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ)**

Д.О. Егорова^{1,2}, Е.А. Шестакова¹, А.А. Пьянкова¹, Т.Д. Кирьянова², Л.Н. Ананьина¹

¹ «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

² Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Полихлорированные бифенилы (ПХБ) на протяжении полувека (1930–1980 гг.) производились в значительных масштабах и использовались при производстве поливинилхлоридов, неопрена, пластмасс, пенорезины, кровельных и изоляционных материалов (торговые марки Galbestos, Armaflex, Arobor), гидравлических и смазочных жидкостей (торговые марки Turbinol, Santovac). Одним из направлений являлось включение ПХБ в качестве пластификатора в полимеры, синтетические покрытия для различных поверхностей, копировальную бумагу, печатные платы, изоляционную ленту. На долю ПХБ в данных материалах приходилось от 3 до 30 %. Другим направлением использования полихлорированных бифенилов являлось их применение в качестве самостоятельных материалов в трансформаторах и конденсаторах. В СССР для этих целей выпускали коммерческие смеси ПХБ марок Совол, Совтол-10 и Трихлорбифенил. Объем их производства составил 127 тыс. т. В США при производстве электротехнического оборудования было использовано более 430 тыс. т. полихлорированных бифенилов торговой марки Aroclor (Трегер, 2013; Erikson, Kaley II, 2011).

Согласно Стокгольмской конвенции «О стойких органических загрязнителях» (2001 г.), полихлорированные бифенилы запрещены к производству и применению как особо опасные для животных и человека соединения, а их запасы должны быть уничтожены до 2028 г. (<http://chm.pops.int>). Россия приняла на себя обязательства по выполнению положений Стокгольмской конвенции в 2011 г., о чем свидетельствует Федеральный закон от 27.06.2011 № 164-ФЗ «О ратификации Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях» (РГ, 2011).

В настоящее время производство и применение полихлорированных бифенилов на данный момент запрещено международным соглашением (Стокгольмская конвенция., 2001; Aken et al., 2010), однако ПХБ продолжают оставаться в составе использованного оборудования и материалов на предприятиях и местах складирования, а также в окружающей среде.

В силу физико-химических особенностей ПХБ являются трудноразлагаемыми материалами. Наиболее перспективными в этом направлении рассматриваются биотехнологии, основанные на использовании деградационного потенциала аэробных бактерий.

Таким образом, представляется актуальным изучение особенностей трансформации полихлорированных бифенилов бактериальными ассоциациями

Цель работы – изучение видового состава и деградационных свойств бактериальной ассоциации, полученной в результате селекции в присутствии бифенила/ПХБ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ассоциация PN2 была получена в результате трехэтапной селекции, в основе которой лежал метод накопительного культивирования. Образец почвы был отобран на территории предприятия, длительное время использовавшего для производства продукции «Совол» (г. Пермь, Россия). В качестве селективного фактора на первой стадии использовали коммерческую смесь полихлорированных бифенилов марки «Совол», в последующих стадиях – бифенил. На третьем этапе была получена стабильная ассоциация аэробных бактерий.

Для изучения бактериального разнообразия ассоциации PN2 проведен ДГГЭ-анализ генов 16S рРНК, амплифицированных с тотальной ДНК ассоциаций. Фрагменты 16S рДНК, отличающиеся электрофоретической подвижностью (ДГГЭ), были реамплифицированы после элюирования из геля. У 4 фрагментов 16S рДНК были определены нуклеотидные последовательности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что в ассоциации PN2 доминировали представители рода *Pseudomonas*. Наиболее близкородственным штаммом являлся *P. japonensis* 12–3 (AB008507) (99.2–99.4 % уровень сходства по гену 16S рРНК). Так же в ассоциации выявлены бактерии, близкородственные штаммам родов *Pseudoxanthomonas* (97.4 % уровень сходства по гену 16S рРНК) и *Acidovorax* (уровень сходства по гену 16S рРНК – 99.2 %).

Путем высева на агаризованную минеральную среду, содержащую в качестве источника углерода бифенил (в концентрации 1 г/л), получены 15 чистых культур. В результате ВОХ-ПЦР установлено, что ряд выделенных штаммов обладают одинаковыми профилями (рисунок). В одну геномную группу были выделены изоляты под номерами 2, 4 и 8, а также самостоятельную группу образуют изоляты 10 и 13. Для дальнейшего исследования из каждой группы были взяты по одному изоляту.

Идентификация 12 штаммов на основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК показала принадлежность штаммов к родам *Micrococcus*, *Pseudoxanthomonas*, *Strakeya*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Stenotrophomonas*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Achromobacter* и *Bosea* (таблица).

Однако в чистую культуру не были выделены бактерии рода *Acidovorax*, выявленные методом ДГГЭ. Можно предположить, что бактерии рода *Acidovorax* не способны использовать бифенил в качестве ростового субстрата, однако входят в состав ассоциации как «консументы», то есть способны использовать как источник углерода соединения, образующиеся при трансформации бифенила другими членами ассоциации PN2.

В результате анализа ростовых параметров установлено, что удельная скорость роста ассоциации PN2 в среде К1 с бифенилов в качестве источника углерода PN2 – 0.516 ч⁻¹. Установлено, что ассоциация PN2 осуществляет разложение моно-, ди- и трихлорированных бифенилов, а также коммерческие смеси полихлорированных бифенилов торговых марок «Делор 103» и «Совол».

Наибольшую активность бактериальная ассоциация проявляет по отношению к 2-хлорбифенилу, осуществляя 100 %-ю деструкцию за 1 сутки культивирования. При этом в среде отмечено накопление 2-хлорбензойной кислоты, незначительное содержание промежуточного метаболита (ГОФДК) и свободных ионов хлора. Разложение 3- и 4-хлорированных бифенилов происходит несколько медленнее, однако за трое суток культивирования также достигается 100 %-разложение исходного субстрата.

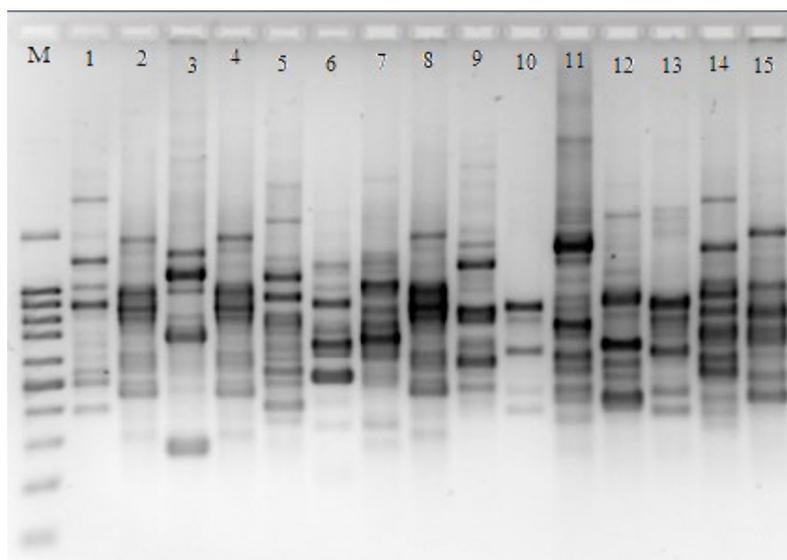


Рисунок. Электрофореграмма фрагментов ДНК, полученных методом ВОХ-ПЦР. М – маркер молекулярных масс O’GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (“Fermentas”, Литва), номера дорожек соответствуют номеру изолированного штамма

Таблица Результаты филогенетического анализа фрагментов гена 16S рРНК штаммов, выделенных из ассоциации PN2

Штамм	Типовой штамм ближайшего родственного вида, номер в базе данных GenBank	Сходство фрагмента гена 16S рРНК, %	Количество анализированных нуклеотидов
PNS1	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665 ^T (CP001628)	100	897
	<i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM 65004 ^T (FJ214355)	100	
	<i>Micrococcus aloeverae</i> AE-6 ^T (KF524364)	100	
PNS2	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> AMX 26B ^T (AF273082)	100	890
PNS3	<i>Starkeya novella</i> DSM 506 ^T (CP002026)	98,74	955
PNS4	<i>Pseudomonas monteilii</i> NBRC 103158 ^T (BBIS01000088)	99,77	869
	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> NBRC 103162 ^T (BBIV01000080)	99,77	
PNS5	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC 49188 ^T (CP000758)	100	837
	<i>Ochrobactrum lupini</i> LUP21 ^T (NNRN01000040)	100	
	<i>Ochrobactrum cytisi</i> ESC1 ^T (AY776289)	100	
PNS6	<i>Stenotrophomonas indicatrix</i> WS40 ^T (KJ452162)	99,77	874
PNB1	<i>Brevibacterium sandarakinum</i> DSM 22082 ^T (LT629739)	97,51	843
PNB3	<i>Pseudomonas kunmingensis</i> HL22-2 ^T (JQ246444)	99,3	863
PNB4	<i>Microbacterium resistens</i> NBRC 103078 ^T (BCRA01000173)	99,6	892
PNB5	<i>Brevibacterium epidermidis</i> NBRC 14811 ^T (BCSJ01000023)	98,73	866
PNB6	<i>Achromobacter deleyi</i> LMG 3458 ^T (HG324053)	100	885
PNB7	<i>Bosea enaeae</i> 34614 ^T (AF288300)	99,66	890
	<i>Bosea vestrisii</i> 34635 ^T (AF288306)	99,66	
	<i>Bosea lupini</i> LMG 26383 ^T (FR774992)	99,66	

Стоит отметить, что штаммы, входящие в ассоциацию PN2, способны разлагать 3-хлорбензойную и 4-хлорбензойную кислоты, о чем свидетельствует снижение концентрации данного метаболита при трансформации 3-ХБ и 4-ХБ. Анализ количества выделенного хлора позволяет предположить, что разложение 4-ХБК происходит через стадию отщепления иона хлора от молекулы кислоты, тогда как разложение 3-ХБК осуществляется без стадии дехлорирования с образованием в качестве следующего метаболита хлоркатехола.

Ассоциация PN2 характеризуется наличием бифенил диоксигеназ, способных окислять как орто-, так и пара-замещенное кольцо молекулы хлорбифенила. При этом окисление конгенов ПХБ, содержащих моно(пара)- хлорированное кольцо происходит эффективнее, чем конгенов с моно(орто)- хлорированным кольцом в молекуле. Уровень деструкции 2,4'-ХБ и 2, 4, 4'-ХБ за трое суток составил 86.2 % и 100 % соответственно, тогда как при разложении 2,2'-ХБ и 2,4,2'-ХБ уровень деструкции составил 70 % и 97.4 % соответственно. В процессе трансформации было зафиксировано образование ГОФД с соответствующей длиной волны, подтверждающей окисление по моно-замещенному кольцу молекулы, а также образование 2-хлорбензойной (при разложении диХБ) и 2,4-дихлорбензойных (при разложении триХБ) кислот.

Анализ деградативной активности ассоциации PN2 к коммерческим смесям ПХБ показал, что эффективнее происходит разложение «Совола», несмотря на то, что в данной смеси преобладают конгены ПХБ с 5 и 6 заместителями в молекуле, тогда как в смеси «Делор 103» преобладают менее хлорированные конгены ПХБ. В процессе деструкции коммерческих смесей ПХБ было зафиксировано накопление в среде незначительного количества ионов хлора, а также на ВЭЖХ-хроматограммах было зафиксировано присутствие моно-, ди- и три-хлорированных бензойных кислот (количественный анализ не производился).

Таким образом, бактериальная ассоциация PN2 обладает уникальным деградативным потенциалом – эффективно разлагает хлорированные бифенилы, содержащие от 1 до 6 заместителей в молекуле, как в составе коммерческих смесей, так и в виде индивидуальных конгенов и может быть использована как основа в биотехнологиях, направленных на уничтожение ПХБ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18–29–05016мк.

ЛИТЕРАТУРА.

Российская Федерация. Законы. О ратификации Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях: федер. закон : [принят Гос. Думой 17 июля 2011 г. : одобр. Советом Федерации 22 июня 2011 г.]. – Российская Газета, 29 июня 2011.

Стокгольмская конвенция «О стойких органических загрязнителях».
http://chm.pops.int/Portals/0/sc10/files/a/stockholm_convention_text_r.pdf

Трегер Ю. СОЗ – стойкие и очень опасные // The Chemical Journal. 2013. № 1. P. 30–34.

Aken B.V., Correa P.A., Schnoor J.L. Phytoremediation of polychlorinated biphenyls: new trends and promises // Environ. Sci. Technol. 2010. V.44. P. 2767–2776.

Erikson M.D., Kaley II R.G. Applications of polychlorinated biphenyls // Environ. Sci. Pollut. Res. 2011. V.18. P. 135–151.