

## ПЕРСПЕКТИВНЫЕ БАКТЕРИИ ДЛЯ ДЕСТРУКЦИИ СТОЙКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ – ПЕРФТОРКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Шарипов Д.А., Юлгутлина Э.В., Четвериков С.П.

ФГБУН Уфимский институт биологии РАН, г. Уфа, Россия (450054, г. Уфа, просп. Октября, 69), e-mail: chekov@mail.ru

В данной статье рассмотрена проблема микробиологической деструкции такого класса стойких органических загрязнителей, как перфторкарбоновые кислоты на примере перфторэнантовой кислоты. Из почвенных проб с территории промышленных предприятий Республики Башкортостан, а также образцов грунта, отобранных около мест хранения средств тушения пожаров, выделены активные штаммы-деструкторы перфторэнантовой кислоты. По результатам предварительной идентификации на основе морфологических, физиологических и биохимических признаков изоляты являются представителями классов *Alphaproteobacteria* (порядок *Rhizobiales*), *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*. По выходу свободных фторид – ионов в среду оценено деструктирующее воздействие микроорганизмов на перфторэнантовую кислоту, степень биодеструкции этой кислоты достигает до 63,8 % за 35 суток инкубации. Выделенные бактерии, имея большой деградативный потенциал, являются перспективными для создания биологических препаратов – деструкторов стойких органических загрязнителей – перфторорганических соединений.

Ключевые слова: бактерии, деструкторы, перфторорганические кислоты.

## PERSPECTIVE BACTERIA FOR DESTRUCTION OF PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS-PERFLUOROCARBOXYLIC ACIDS

Sharipov D.A., Yulgutlina E.V., Chetverikov S.P.

UfaInstitute of Biology, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia (450054, Ufa, pr. October 69), e-mail: chekov@mail.ru

In this article reviewed the problem of microbial degradation of this class of persistent organic pollutants as perfluorocarboxylic acid, for example perfluoroenanthic acid. From the soil samples from the territory of the industrial enterprises of the Republic of Bashkortostan, as well as soil samples, selected near the storage sites of extinguishing means, isolated active strains-destructors perfluoroenanthic acid. As a result of preliminary identification based on morphological, physiological and biochemical features, isolates are representatives of the class *Alphaproteobacteria* (order *Rhizobiales*), *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*. At the exit of free fluoride - ions in the environment estimated the degrade influence of microorganisms on perfluoroenanthic acid, the degree of biodegradability of this acid reaches 63.8% in the 35 days of incubation. Isolated bacteria having a large degradative potential, are promising for the development of biopreparations – destructors of persistent organic pollutants – perfluoroenanthic compounds.

Keywords: bacteria, destructors, perfluoroorganicacids.

Современному росту химической промышленности и органического синтеза в частности сопутствует загрязнение окружающей среды широким спектром ксенобиотиков, которые детектируются в составе компонентов природных геосистем, обладают токсичностью, биоаккумуляцией и устойчивостью к разложению. Многие из этих поллютантов являются галогенированными соединениями, часто обнаруживаемыми в потоках отходов, а их токсические свойства в свое время стимулировали исследования по их микробному метаболизму. Самыми устойчивыми из них являются фторсодержащие соединения.

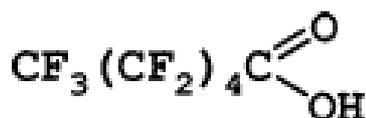
Фторированные соединения используются в качестве агрохимикатов, лекарственных препаратов. Фторсодержащие компоненты являются ингибиторами ферментов и

модификаторами межклеточных коммуникаций, они способны также к нарушению мембранного транспорта и процессов преобразования энергии.

Благодаря своеобразию свойств перфторкарбоновых 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.

Перфторкарбоновые кислоты – синтетические химические соединения, применяемые в производстве широко используемых фторполимеров. Они также являются поверхностно-активными веществами, обладают высокой химической стабильностью, что делает их идеальными материалами для широкого применения (например, антипригарное покрытие для посуды, влаго- и пятностойкие покрытия для текстиля, смазки, упаковка пищевых продуктов, противопожарная пена и т. д.). Будучи крайне устойчивыми к биоразложению, перфторкислоты к настоящему времени обнаруживаются во многих объектах окружающей среды и живых организмах. Например, перфтороктановая кислота является наиболее часто детектируемым загрязнителем этого класса [9, 10]. Исследования показывают, что перфторкарбоновые 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) [5]. Также они влияют на репродуктивную и эндокринную системы [6, 7], доказаны их канцерогенные свойства [5].

Перфторкарбоновые кислоты внесены в Приложение В Стокгольмской конвенции по стойким органическим загрязняющим (СОЗ) веществам, что предусматривает принятие мер по минимизации и, по возможности, прекращению производства и использования. И в свою очередь более остро встает проблема утилизации этих экологически опасных поллютантов неприродного происхождения со всеми вытекающими последствиями по их включению в естественный обмен веществ и энергии с участием микроорганизмов, которые минерализуют их, не оказывая отрицательного влияния на окружающую среду. Поэтому **целью данной работы** являлось выделение и характеристика перспективных бактерий для деструкции стойких органических загрязнителей – перфторкарбоновых кислот на примере перфторэнантовой кислоты (рис. 1).



*Рис. 1. Перфторэнантовая (перфторгексановая) кислота*

### **Материалы и методы исследования**

Выделение штаммов-деструкторов перфторорганических кислот производили из образцов почв с территории промышленных предприятий (Республики Башкортостан), а

также образцов грунта, отобранных около мест хранения средств тушения пожаров (Мальдивская Республика). Для получения микроорганизмов методом накопительных культур 1 г почвы помещали в колбы (объем 250 мл) со 100 мл жидкой минеральной среды Раймонда [8] (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) кислоту в количестве 0,1 % (по объему). Культивирование проводили в статических условиях при температуре 28 °С в течение 7 суток 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 °С. Изолирование получившихся колоний микроорганизмов проводили по морфолого-физиологическим признакам.

Чистоту выделенных культур проверяли общепринятыми методами – микроскопическим контролем и высевом на агаризованную среду МПА [4].

Характеризацию чистых культур микроорганизмов – деструкторов фторорганических соединений проводили по морфологическим, физиологическим и биохимическим признакам, используя общепринятые руководства [2, 3].

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 перфторэнантовую кислоту в количестве 0,2 г. Инкубирование осуществляли в стационарных условиях при температуре 28 °С в течение 5 недель, на протяжении которых несколько раз измеряли титр микроорганизмов и динамику изменения фторид-иона ( $\text{F}^-$ ) в среде.

Способность к деструкции оценивали по способности роста в жидкой среде с единственным источником углерода в виде фторкарбоновой кислоты. Каждую колбу инокулировали бактериальной суспензией до начальной оптической плотности (ОП) при 450 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм около 0,02. Определение оптической плотности бактериальных суспензий проводили на спектрофотометре модели СФ-56 (Россия). Инкубирование осуществляли при температуре 28 °С в течение 5 недель, на протяжении которых несколько раз измеряли оптическую плотность бактериальной суспензии.

Концентрацию фторид-иона в среде измеряли при помощи ионселективного кристаллического электрода ЭЛИС-131F (ООО «Измерительная техника», Россия).

## Результаты и их обсуждение

В ходе проведенной работы из исследованных образцов методом накопительных культур было выделено 9 бактериальных штаммов, способных использовать перфторэнантовую кислоту в жидкой среде в качестве единственного источника углерода и энергии (маркировка М у штаммов, выделенных из образцов из Мальдивской Республики, цифровая – Республики Башкортостан).

Установлено, что среди выделенных штаммов были как грамположительные, так и грамотрицательные микроорганизмы. Все изоляты аэробные, каталазоположительные, оксидазоположительные, растущие в интервале температур 10–35 °С.

Все новые выделенные бактерии-деструкторы были способны к нитратредукции, использовали в качестве источника углерода широкий спектр органических веществ (таблица).

### Признаки штаммов штаммов-деструкторов перфторэнантовой кислоты

Свойства	1.1	1.2	1.3.2	2.4	М1	М2	М3	М4
Образование индола	+	+	+	+	+	-	-	-
Рост на среде Эшби	-	-	-	-	-	-	-	-
Гидролиз крахмала	+	+	+	+	+	+	+	+
Разжижение желатина	+	+	-	-	+	+	+	+
Каталазная активность	+	+	+	+	+	+	+	+
Образование сероводорода	-	-	-	-	-	+	-	+
Образование аммиака из аргинина	-	-	-	+	-	-	+	-
Реакция Фогес-Проскауэра	-	-	-	-	-	-	-	-
Лецитиназа	+	+	-	+	-	+	+	+
<b>Ассимиляция субстратов</b>								
Сахароза	+	+	-	-	+	+	-	-
Глюкоза	+	+	+	-	+	+	-	+
Глицерин	+	+	-	-	+	+	-	+
Галактоза	-	-	-	-	+	-	-	+
Рамноза	-	+	-	-	+	-	-	+
Мальтоза	+	-	+	-	+	+	-	+
Фруктоза	+	+	-	-	+	+	-	+
Ксилоза	+	+	-	-	+	+	-	+

Таким образом, изолированные штаммы-деструкторы по результатам предварительной идентификации являлись представителями классов *Alphaproteobacteria*

(порядок Rhizobiales), *Gammaproteobacteria*, *Actinbacteria*. Работа по уточнению родовой и видовой принадлежности требует привлечения генетических методов и филогенетического анализа.

Далее было показано (рис. 2), что ОП культуральных жидкостей растущих бактериальных культур находились в интервале 0,2–0,4 о.е. Максимальный уровень роста показывали штаммы М1, 1.3.02, 2.4 и 2.1, причем штамм 2.4 был описан еще и в качестве деструктора хлорорганических соединений [1], в частности 2,4 – дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), являющейся основой для ряда гербицидов. Максимумы ОП культуральных жидкостей наблюдали на седьмые сутки культивирования, после которых увеличения концентрации биомассы и ОП при 450 нм не наблюдалось, но не наблюдалось и ее снижения, что, возможно, свидетельствует о накоплении промежуточных продуктов.

Анализ данных по высвобождению ионов фтора в среду (рис. 3) показал, что перфторкарбоновые кислоты, судя по всему, очень тяжело подвергаются биодеструкции, с этим, вероятно, также связан долгий период адаптации Изучаемых культур микроорганизмов к субстрату, который в наших условиях составил 7 суток.

В среду было внесено 0,2 % субстрата в виде перфторгексановой кислоты, т.е. 6,4 mM, а с учетом, что она состоит из фтора на 66,6 %, следует, что в среду вносили 4,2 mM фтора. По выходу свободных фторид – ионов в среду в результате деструктирующего воздействия микроорганизмов на перфторкислоту была определена степень биодеструкции этой кислоты. Для лучших штаммов ее величина составила более 30 % и находилась на уровне для следующих штаммов: 1.3.02 – 63,8 %, 2.4 – 42,6 %, 1.2 – 41,4 %, М1 – 30,0 %, остальных – менее 20 %.

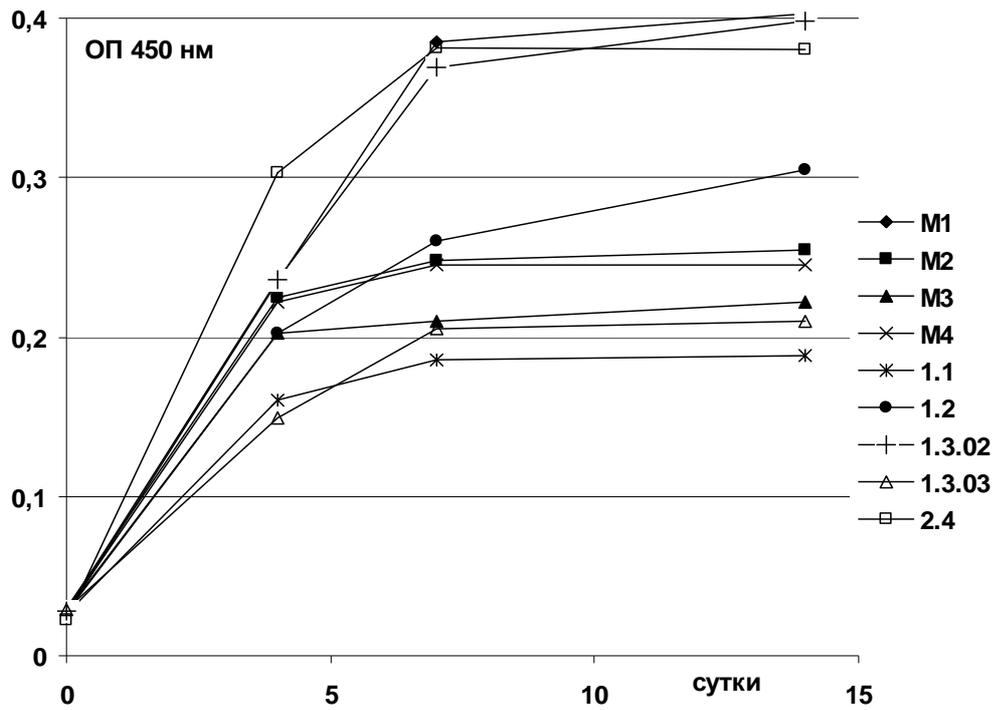


Рис. 2. Динамика роста штаммов-деструкторов в жидкой минеральной среде, содержащей перфторэнантовую кислоту

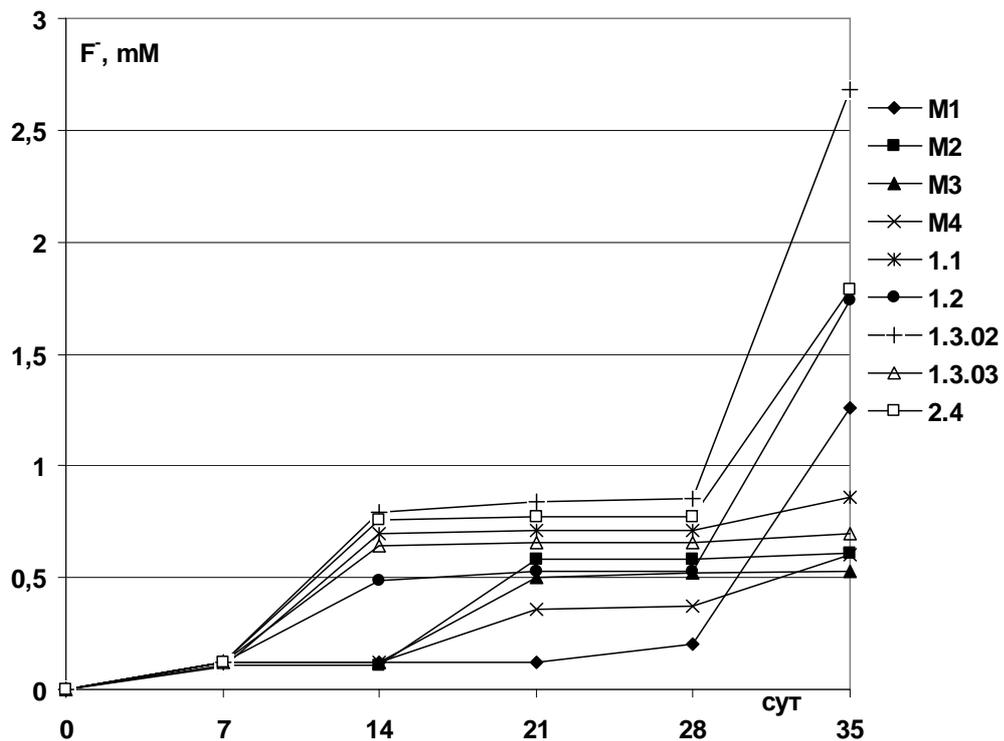


Рис. 3. Динамика изменения концентрации фторид-иона в жидкой минеральной среде, содержащей перфторэнантовую кислоту, при росте штаммов-деструкторов

### Заключение

Основываясь на полученных результатах, можно утверждать, что выделенные бактерии – деструкторы перфторэнантовой кислоты, имея большой деградативный

потенциал, способны к росту и утилизации фторорганических субстратов и являются перспективными для создания биологических препаратов – деструкторов стойких органических загрязнителей – перфторорганических кислот.

### Список литературы

1. Коршунова Т.Ю., Шарипов Д.А., Логинов О.Н. Бактерии *Pseudomonas* sp., разлагающие 2,4 – дихлорфеноксисульфоновую кислоту // Материалы III Всероссийской школы-конференции «Биомика – наука XXI». – Уфа, 2012. – С. 57.
2. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхардта. – М.: Мир, 1984. – Т.3. – 264 с.
3. Определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Хоулт. – М.: Мир, 1997. – Т.1, 2.
4. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / под ред. Н. С. Егорова. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1983. – 215 с.
5. 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.
6. Apelberg B.J., Witter F.R., Herbstman J.B.. Cord serum concentrations of perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in relation to weight and size at birth // *Environmental Health Perspectives*. – 2007. – V. 115. – P. 1670–1676.
7. Betts K. PFOS and PFOA in humans: new study links prenatal exposure to lower birth weight // *Environmental Health Perspectives*. – 2007. – V. 115. – P. 550.
8. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // *Develop. Industr. Microbiol.* – 1961. – V. 2. – P. 23–32.
9. 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.
10. Yamashita N., Kannan K., Taniyasu S. A global survey of perfluorinated acids in oceans // *Marine Pollution Bulletin*. – 2005. – V. 51. – P. 658–668.

### Рецензенты:

Горбунова В.Ю., д.б.н., заместитель заведующего кафедры генетики, ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы», г. Уфа;  
Чемерис А.В., д.б.н., заместитель директора по научной работе, ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, лаборатория молекулярной биологии и нанобиотехнологии, г. Уфа.