

УДК 579.6 + 579.017.8 + 579.695

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *RHODOCOCCLUS* ДЛЯ ОЧИСТКИ АБСОРБЦИОННЫХ РАСТВОРОВ

Наркевич Д. А., младший научный сотрудник, аспирант
Государственное научное учреждение «Институт микробиологии
Национальной академии наук Беларуси»

Исходя из литературных данных, среди представителей рода *Rhodococcus* обнаружено много видов и штаммов, способных к деградации таких органических соединений, как нафталин, ксилол, толуол, этилбензол, дибензофураны, бифенил, стирен, катехол, флуорен, индол, нитрофенол и др.

Rhodococcus используют о-ксилол, бензол, алкибензол, фенол, фталаты и другие ароматические соединения в качестве источников углерода и азота. В этом процессе участвует фермент о-ксилолдиоксигеназа (в ее состав входят ферредоксиновая и железосерная-оксигеназная компоненты).

Фенол и подобные ему ароматические соединения могут обнаруживаться в промышленных сточных водах. Бактерии *родококки* способны использовать фенол как единственный источник углерода и энергии, параллельно утилизируя формальдегид, который также присутствует в сточных водах. Фермент фенолгидроксилаза катализирует структурный переход фенола в катехол для его дальнейшей биodeградации.

Как показывает практика, после предварительной механической очистки в стоках могут присутствовать остаточные количества фенола, удаление которых затруднено из-за плохой аэрации и низкого содержания питательных веществ. С учетом того, что родококки отличаются способностью длительно оставаться жизнеспособными в олиготрофных (при низкой концентрации доступных для питания органических соединений) условиях за счет азотфиксации, запасаения и эффективного использования эндогенных фосфорных соединений, проведено исследование возможности доочистки загрязненных фенолом сточных вод двух промышленных предприятий, занимающихся нефтехимическим производством (НХП) и производством дубильных экстрактов (ПДЭ) культурой *R. erythropolis*. Содержание

фенола в пробах сточных вод предприятия НХП составляло 0,09 мг/л, а в стоках компании ПДЭ – 0,74 мг/л. После 3 сут воздействия бактерий концентрация фенола снижалась до 0,012 и 0,155 мг/л, соответственно. Полученные данные показывают, что данная культура проявляет активность в реальных условиях загрязненных сточных вод обоих производств. Существенное изменение содержания фенола в сточных водах при использовании *родококков* наблюдалась уже после первых суток воздействия. Степень очистки сточных вод, достигаемая при их использовании, составляла для стоков НХП 86,7 %, а для стоков ПДЭ – 79,1 % [1].

Бактерии *R. aetherivorans* синтезируют фермент поли-(3-гидроксibuтират-3-гидроксиwалериат) и могут использовать толуол как единственный источник энергии. Этот полимер характеризуется гибкостью и прочностью наравне с обычными пластмассами.

Бензотиазолы принадлежат к большой группе синтетических гетероциклических соединений и используются в различных промышленных процессах: при производстве шин как катализаторы процессов вулканизации, как лекарственные средства при онкозаболеваниях и заболеваниях ЦНС. Из сточных вод был выделены бактерии *R. rhodochrous*, способные разлагать производные бензотиазола, в том числе 2-гидроксибензотиазол, 2-аминобензотиазол (АБТ) и меркаптобензотиазол. Для увеличения биодеструктивного потенциала штамма по отношению к бензотиазолам было предложено сочетание фото- и/или биодеградации с присутствием комплекса нитрилтриацетата, который является фото индуктором. При его наличии даже без источника света существенно увеличивалась скорость биодеградации АБТ. Позже было также показано наличие ассоциированных с клеткой поверхностно активных веществ (далее ПАВ) – гликолипидов. Их синтез позволяет переводить гидрофобные компоненты веществ в доступную форму для микроорганизмов [2].

Трихлорэтилен (ТХЭ) относится к алифатическому соединению и, исходя из аэробных условий биологического распада данного вещества, процесс происходит преимущественно в результате кометаболизма (сопряженного разложения) с метанолом, аммиаком, пропаном, фенолом, толуолом или кумолом в качестве ростового субстрата.

Ранее также был отмечен рост биодеградации полихлорированных дифенилов несколькими видами микроорганизмов с помощью

растительных эфирных масел. Такие компоненты как кумол, карвон, лимонен и пинен проверены на способность индуцировать деградацию ТХЭ для *R. gordoniae* и *R. erythropolis*. Наиболее эффективным оказался кумол.

N-нитрозодиметиламин (НДМА) обладает сильной канцерогенной активностью и высвобождается вместе с промышленными сточными водами, как побочный продукт после дезинфицирования хлорамином и другими веществами. Осуществляется разложение пропанотрофами у которых есть ферменты монооксигеназы с широкой субстратной специфичностью. У *R. ruber* установлен специфический путь разложения НДМА, в чем-то похожий с денитрифицирующим путем у млекопитающих, который катализируется Р-450 изозимами. Конечными продуктами такого распада являются закись азота, нитрат, нитрит, формальдегид, формиат и метиламин. *R. ruber* способен к снижению концентрации НДМА в среде с 8,3 мкг/л до 2 нг/л во время роста на пропане в качестве единственного источника углерода [3].

Осуществлять вышеперечисленные процессы бактериям рода *Rhodococcus* помогают следующие синтезируемые ими компоненты:

Экзополисахариды – высокомолекулярные полимеры, состоящие из остатков сахаров, которые секретируются микроорганизмами в окружающую среду и могут служить барьером между клетками и окружающей средой, а также прикрепления к твердым поверхностям. Например, бензотоллерантный *родококк* может синтезировать большое количество экзополисахаридов. Они способствуют повышенной устойчивости клеток продуцента к бензину, особенно на первых стадиях взаимодействия клеток с токсическим агентом.

R. rhodochrous синтезируют внеклеточный полисахарид массой в несколько миллионов дальтон, который состоит из D-глюкозы, D-галактозы, D-маннозы, D-глюкуроновой кислоты в отношении 1:1:1:1, а также в его структуре были найдены 0,8 % (массовая доля) октодекановой и 2,7% (массовая доля) гексадекановой кислот. Было показано, что дикие штаммы родококков без этого ЭПС при его получении приобретают способность усваивать углеводороды нефти. Данный клеточный метаболит также принимает участие в эмульгировании гидрофобной фракции нефти, что приводит к увеличению площади поверхности раздела фаз вода-углеводород и способствует более быстрому процессу биодеградации последнего [4].

Широкий спектр ферментов обеспечивает возможность утилизации микроорганизмами широкого спектра веществ, некоторые из них были описаны выше.

Мощным регулятором активности микробной популяции, в том числе той, которая окисляет гидрофобные соединения, являются поверхностно-активные вещества (ПАВ), в частности ПАВ микробного происхождения. Эмульгирование (солюбилизация) углеводов с помощью ПАВ улучшает поступление гидрофобных органических загрязнителей (ГОЗ) из почв и воды в микробные клетки и, соответственно, их деградацию. Таким образом, ПАВ выполняют роль «посредников» между клеткой и ГОЗ. Поэтому целесообразным является применение поверхностно-активных компонентов или культур, которые их активно синтезируют, в технологиях и препаратах для очистки почв и воды от нефтепродуктов.

Rhodococcus wratislaviensis синтезируют ПАВ в присутствие лимитирующих концентраций азота и лишь на гидрофобных субстратах (используют *n*-алканы – от *n*-октана до *n*-гептадекана).

R. erythropolis способны к синтезу свободных и ассоциированных с клеточной стенкой ПАВ. Гликолипидная компонента может быть представлена трегалозомоно- и димиколатами, фосфолипидная – фосфотидилглицеролом, фосфотидилэтаноламином, дифосфотидилглицеролом, а нейтральные жиры – цетиловый спирт, пальмитиновая кислота, метиловый эфир *n*-пентадекановой кислоты, триглицеридом, миколовыми кислотами и т. д.

Синтез данных соединений позволяет на 20–25 % увеличить разложение ароматических и алифатических соединений [5].

Родококки – экстремотолерантные бактерии. Они обитают в холодных полярных пустынях, антарктических и альпийских почвах, почв тундры с ежегодным промерзанием и оттаиванием в соседствующих с ледниками районах, болотных солончаках, сухом песке в пустыне, поверхностных пресных, грунтовых, минеральных и пластовых водах, обнаруживаются в коралловых рифах, снеге и керне.

Биологические особенности родококков, способствующие их выживанию в загрязненных экосистемах включают:

– большой геном размером более 5 млн п.н. с высоким (50–70 %) содержанием в геноме пар гуанин-цитозин, что обуславливает физическую стабильность нуклеиновых кислот;

– «избыточный» геном с множеством функциональных генов-аналогов с дублирующими функциями;

– разнообразие ферментов оксидоредуктаз и гидролаз (дегидрогеназы, пероксидазы, оксигеназы, сульфатазы, нитрилгидратазы, фенолгидролазы, полимедные оксидазы и др.), среди которых присутствуют оксигеназные комплексы с широкой субстратной специфичностью, что позволяет *родококкам* использовать необычайно широкий спектр метаболических и кометаболических субстратов;

– наличие жесткой липофильной клеточной стенки с высоким содержанием миколовых кислот (длинноцепочечные α -разветвленные β -гидроксилированные жирные кислоты), обеспечивающей защиту от поедания простейшими и обладающей повышенным сродством к гидрофобным соединениям;

– образование капсулоподобных структур вокруг клеток для защиты от неблагоприятных факторов среды, в частности, от осмотического стресса и высыхания;

– естественная колониально-морфологическая изменчивость (диссоциация) и связанные с ней изменчивость многих физиолого-биохимических свойств и возможность существования родококков в виде гетерогенных популяций с разной выраженностью признаков у членов популяции;

– клеточный полиморфизм и наличие в цикле развития переживающей стадии временно покоящихся, но потенциально активных цистоподобных клеток, а также низкий уровень эндогенного дыхания, что обеспечивает выживание родококков в условиях длительного голодания;

– синтез протекторных и макроэргических соединений, каротиноидных пигментов, экстрацеллюлярных и клеточно связанных гликолипидов;

– способность к азотфиксации в присутствии углеводов и олигонитрофилия;

– отсутствие катаболитной репрессии, способность к диауксо-, олиго- и психротрофии – свойства, обеспечивающие быстрый переход клеток с углеводородного субстрата на углеводный и сохранение метаболизма в условиях низкой концентрации субстрата и низкой скорости протекания биохимических процессов;

– ацидо-, алкало-, гало-, ксеро-, термо- и осмоотолерантность [6].

В ряде работ было отмечено, что *родококки* обладают широким метаболическим потенциалом и способны к росту в присутствии различных органических субстратов в концентрациях, не всегда потребляемых другими микроорганизмами. Показано, что *родококки* – постоянный и доминирующий компонент микробиоценозов нефтезагрязненных почв. Их активность в 70 раз превосходит активность других нефтеоокисляющих микроорганизмов. Это связано с более крупными размерами клеток и их способностью окислять большие количества *n*-алканов, чем это необходимо для удовлетворения своих энергетических и конструктивных потребностей. Избыток окисленного *n*-алкана *родококки* переводят в нейтральные липиды, тогда как другие нефтеоокисляющие микроорганизмы (например, псевдомонады) внутреннего пула углеводов не имеют и резервных липидов не образуют.

Родококки имеют большее сродство к границе раздела фаз углевод-вода, где и происходит постепенный процесс разложения гидрофобных соединений, нежели бактерии рода *Pseudomonas*. Соответственно, последние будут находиться в более водной фазе. Несмотря на то, что их совместное использование в препаратах является эффективным, т. к. у них разные биодegradативные пути, *родококки* начнут процесс разложения быстрее из-за более близкого расположения клеток относительно гидрофобного субстрата, который будет являться источником углерода и энергии [7].

Почему следует использовать биопрепараты для очистки? Они содержат необходимый титр микроорганизмов, которые обладают способностью к утилизации широкого спектра загрязняющих веществ, а правильное использование биодобавок и самих препаратов может увеличить их биодеструктивный потенциал, в то время как процесс «самозарождения» является неконтролируемым. Каждый раз в биореакторе могут появляться разные культуры с различными активностями, в том числе антагонистическими (что может спровоцировать гибель более активного по деструктивной способности штамма, но менее конкурентоспособного в данном сочетании + может происходить общее снижение титра клеток в биореакторе). Главные недостатки процесса «самозарождения» – невозможность контроля в условиях технологического процесса очистки, так как момент появления деструктивно активной биомассы клеток при таких условиях является непрогнозируемым и неизвестно доподлинно в какой момент

времени будет получен достаточный титр активных биодеструкторов. Соответственно, вышеперечисленные недостатки исключают возможность использования данного метода на предприятиях ввиду невозможности прописать четкий временной характер и условия очистки производственных сред в технической документации. Помимо этого, для контроля очистки необходимо знать состав и количество микроорганизмов в препарате при его использовании, что также не является возможным при процессах «самозарождения».

Литература

1. Коробов, В. В. Возможность использования штамма-деструктора фенола и 2, 4-дихлорфенола, *Rhodococcus erythropolis* 17S, для очистки промышленных стоков / В. В. Коробов [и др.] // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. – 2017. – №. 4. – С. 235–240.
2. Фаттахова, А. М. Применение катализаторов в окислительных процессах очистки природных и сточных вод / А. М. Фаттахова [и др.] // Вестник СГАСУ. Градостроительство и архитектура. – 2011. – № 2. – С. 83–87.
3. Осипенко, Б. Г. Нитрозодиметиламин (НДМА)-гепатотропный яд и канцероген: токсиколого-гигиенические аспекты его биологического действия (сообщение 1) / Б. Г. Осипенко, Л. О. Полякова // Сибирский медицинский журнал. – Иркутск, 2005. – Т. 53, № 4. – С. 5–9.
4. Беседнова, Н. Н. Экзополисахариды морских бактерий: перспективы применения в медицине / Н. Н. Беседнова [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2018. – Т. 63, № 7-8. – С. 67–78.
5. Мансураева, Л. М. Поверхностно-активные вещества: свойства и применение / Л. М. Мансураева, И. И. Юсупова, С. А. Булаев // Вестник магистратуры. – 2022. – № 2-1 (125). – С. 30–35.
6. Li H. Bioadsorption behavior of *Rhodococcus opacus* on the surface of calcium and magnesium minerals / H. Li [et al.] // JOM. – 2015. – Т. 67, № 2. – С. 382–390.
7. Захарова, Н. Г. Краткий курс по микробиологии, вирусологии и иммунологии / Н. Г. Захарова, В. И. Вершинина, О. Н. Ильинская // Казань: Бриг, 2015. – С. 562–640.