

УДК 579.362, 582.28

Салманов М.А., Велиев М.Г., Бабашлы А.А., Бекташи Н.Р.**БИОДЕГРАДАЦИЯ ХЛОРСОДЕРЖАЩИХ
АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ БАКТЕРИЯМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ
ИЗ АЗЕРБАЙДЖАНСКОГО ПОБЕРЕЖЬЯ КАСПИЙСКОГО МОРЯ***

Аннотация. Выделенные из прибрежных вод и грунтов Каспийского моря Азербайджанского побережья бактерии из родов: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus* активно утилизировали некоторые хлорсодержащие ароматические соединения в качестве единственного источника углерода в лабораторных условиях. Методами обращенно-фазовой жидкостной хроматографии, ИК и ЯМР¹ Н спектроскопии изучены продукты деградации вышеуказанных продуктов. Установлено, что при трансформации галогенсодержащих ароматических соединений под воздействием бактерий образуются продукты, полученные окислением алкильного радикала по боковой цепи ароматического кольца, а также его гидроксильрованием и раскрытием.

Ключевые слова: Каспийское море, бактерии, ароматические соединения, биотрансформация, биodeградация, жидкостной хроматографии.

В настоящее время остро стоит проблема очистки окружающей среды от устойчивых ксенобиотиков. К числу таких соединений относятся галогенпроизводные органические соединения, широко используемые в промышленности и сельском хозяйстве. Поступая в водную среду, указанные вещества угнетают жизнедеятельность гидробионтов, трансформируют структуру их сообществ и в большинстве случаев заметно снижают выживаемость водных организмов [4; 9; 11; 12]. В связи с этим большое внимание уделяется исследованию путей разложения различных по химической природе галогенпроизводных бактериями как в аэробных [10; 14], так и в анаэробных условиях [3; 13]. Использование способности микроорганизмов деградировать ксенобиотики позволяет решить ряд экологических проблем, связанных с применением химических пестицидов, а также со сбросом промышленных стоков [1]. Активные «местные» культуры микроорганизмов, адаптированные к конкретным абиотическим условиям, могут быть использованы не только для очистки сточных вод, но и для интенсификации процессов ремедиации экосистем в случае хронического загрязнения [6].

Как известно, Каспийское море наиболее сильно подвержено загрязнению общего характера [9; 11]. Помимо нефти, в море поступает огромное количество других, не менее опасных поллютантов, ксенобиотиков, канцерогенов [2; 4; 7; 11]. Роль фенолусваивающих бактерий в очистке Каспийского моря от галогенсодержащих ароматических соединений, в том числе фенолов, изучена недостаточно. Это и предопределило нашу цель – изучить способность бактерий, выделенных из прибрежных участков Каспия, деградировать галогенсодержащие ароматические соединения.

Материалы и методы

Объектом настоящего исследования стали бактерии, выделенные из воды и грунта прибрежных участков Каспийского моря Азербайджанской территории. Родовой состав выделенных фенолусваивающих бактерий установили на основании их морфологических и физиолого-биохимических признаков по определителю Берджи [8]. Для изучения

* © Салманов М.А., Велиев М.Г., Бабашлы А.А., Бекташи Н.Р.

способности роста на средах, содержащих в качестве единственного источника углерода хлорсодержащие ароматические соединения, использовали четыре наиболее активных штамма фенолусваивающих бактерий (*Micrococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Arthrobacter sp.*).

Динамику биodeградации хлорсодержащих ароматических соединений растущими клетками изучали в среде следующего состава (г/л): Na_2HPO_4 -0,7 г, KH_2PO_4 -0,5 г, NH_4NO_3 -0,75 г, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2 г, MnSO_4 -0,01 г; FeSO_4 -0,02 г, NaCl -13 г в колбах емкостью 250 мл со 100 мл питательной среды. В качестве единственного источника углерода и энергии в колбы вносили исследуемые соединения (п-хлорфенол, тетрахлорпирокатехин, п-, м-, о-хлортолуол, хлорбензол) в концентрации 50, 100, 300 мг/л. Культивирование проводили при температуре 28°C, интенсивность процесса деградации была показана на основе полученных результатов по биомассе микроорганизмов, развивающихся на хлорсодержащих ароматических соединениях в течение 30 дней.

Происходящие при биodeградации структурные преобразования исследуемых ароматических проб изучались хроматографическим анализом (методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии). Использовали жидкостной хроматограф фирмы «Kovo» (Чехия), с УФ-спектрофотометрическим детектором с рабочей длиной волны $\lambda=254$ нм; использованы две хроматографические колонки размером 3.3 x 150 мм, заполненные обращенной неподвижной фазой «Separon SGX-C18», с размером частиц 7 мкм, температура среды 20-25°C; элюент метанол:вода (75:25 об. %), скорость подвижной фазы 0,3 мл/мин. Идентификация компонентов выполнялась сопоставлением параметров удерживания стандартной смеси и продуктов биотрансформации. Стандартные растворы с концентрацией 1-1.5 мг/мл готовили в элюирующей системе метанол: вода (75:25 об. %).

Структурный состав биodeградации галогенсодержащих ароматических соединений определяли методами: ИК-спектроскопии (UR-20) (тонкий слой) в диапазоне спектра 4000-700 cm^{-1} ; съемка спектров ЯМР¹H производилось на приборе «Tesla BS - 487B» с рабочей частотой 80 МГц в CCl_4 с использованием гексаметилдисилоксана (ГМДС) в качестве внутреннего стандарта. Для всех экспериментов проведены контрольные опыты (без внесения биодеструкторов-бактерий) [5; 7].

Результаты и их обсуждения

Из отобранных проб воды и грунта прибрежных участков Апшеронского полуострова Каспия были выделены фенолусваивающие бактерии из родов *Micrococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Sarcina*, *Alcaligenes*.

Результаты проведенных экспериментов показали, что исследуемые бактерии из родов *Micrococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* активно усваивали галогенсодержащие ароматические соединения в качестве единственного источника углеводорода. Полное исчезновения этих соединений было зафиксировано в опытных образцах с концентрациями 50-100 мг/л. При увеличении количества хлорсодержащих ароматических соединений в пробе до 300 мг/л деструкция не начиналась в течение всего времени наблюдения.

Процесс деградации хлорсодержащих ароматических соединений более четко наблюдался при использовании метода обращенно-фазовой хроматографии.

Процесс биотрансформации хлорпроизводных бензола и толуола протекает аналогично по ранее установленному нами идентичному механизму деградации бензола и толуола [4]. Так, в обоих случаях продуктами биотрансформации оказались те же хлорпроизводные аналогичных ароматических соединений, получившихся в первом случае.

Сходство обнаруживается даже в количественных соотношениях продуктов деградации. Из представленной хроматограммы рис. 1 (кривая а) видно, что хлорбензол в промежуточной стадии процесса деградации превращается в 3-хлорпирокатехин (30 %) и м-хлорфенол (65%) (пики 1 и 2).

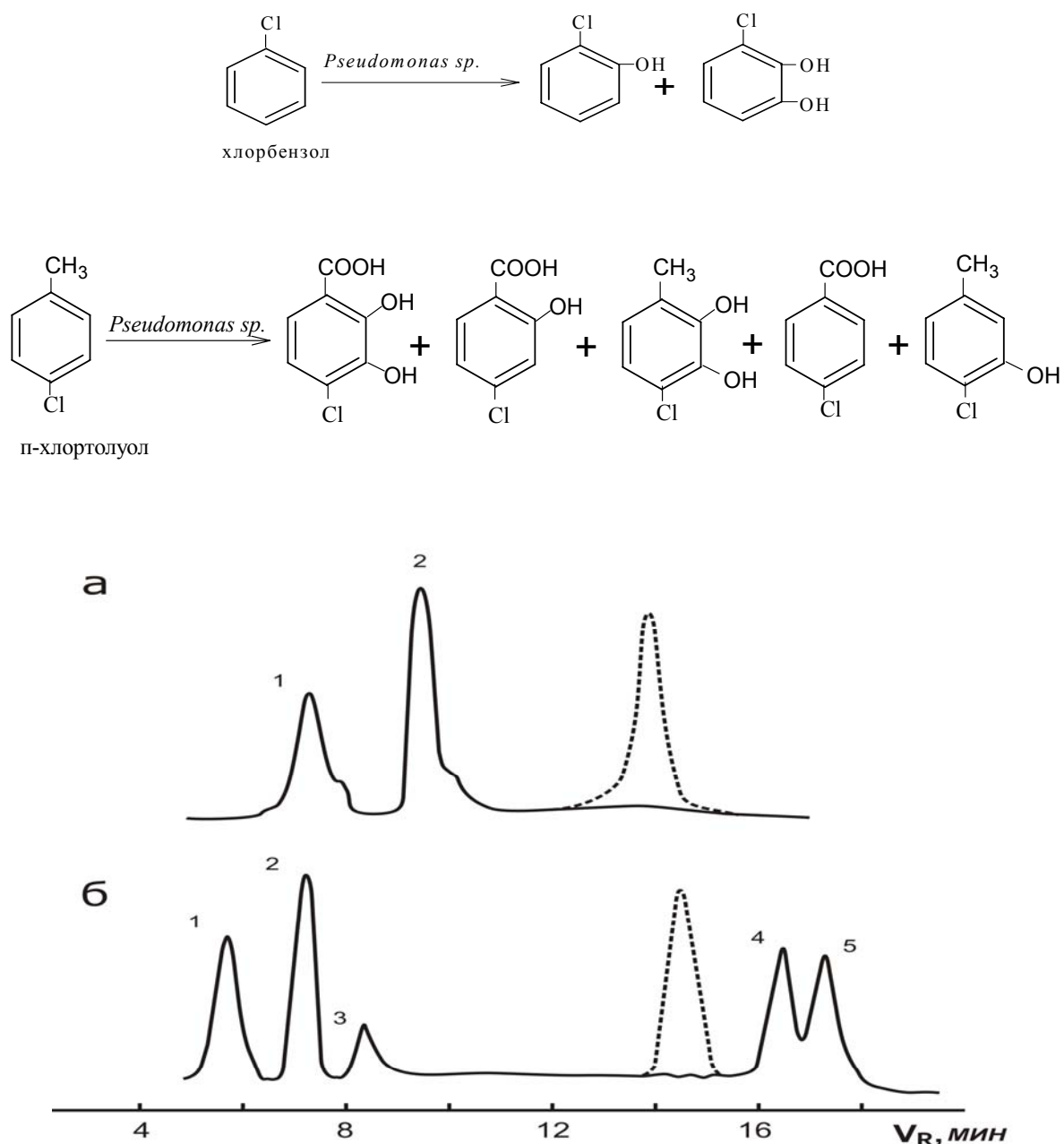
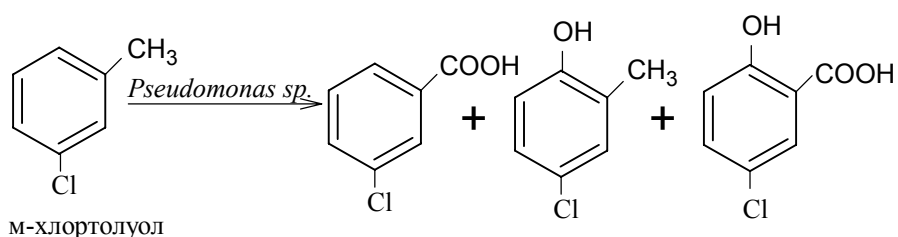
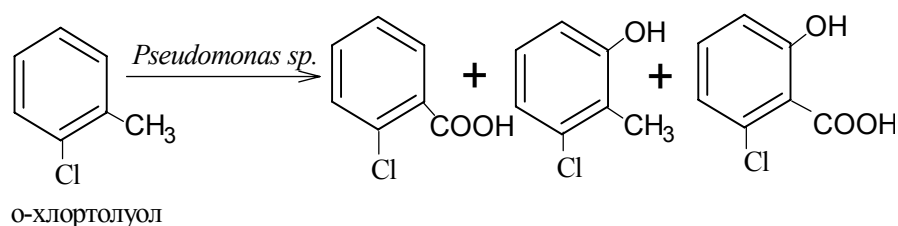


Рис. 1. Хроматографические кривые биодеградации хлорбензола (а) и п-хлортолуола

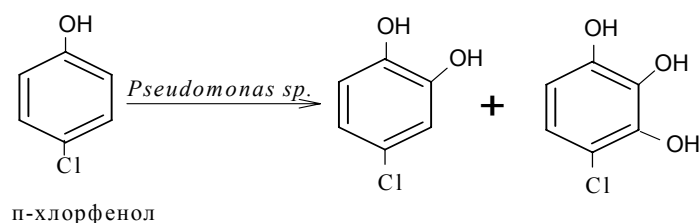
а) пики 1 и 2: 4-хлорпирокатехин, п-хлорфенол;
 б) пики 1-5: 2,3-дигидрокси-п-хлорбензойная кислота, 4-хлорсалициловая кислота, 2,3-дигидрокси-п-хлортолуол, п-хлорбензойная кислота, 3-гидрокси-п-хлортолуол (пунктиры-исходные хлорбензол и п-хлортолуол).

В случае п-хлортолуола (кривая б) деградация преимущественно происходит по смешанному механизму, т.е. по боковой цепи и ароматическому кольцу одновременно,

что приводит к образованию фенолкарбоновых кислот: 2,3-дигидрокси-п-хлорбензойной (20 %), 4-хлорсалициловой (27 %), и п-хлорбензойной кислоты (30 %) (пики 1, 2 и 4). А деградация, происходящая при окислении ароматического кольца, сопровождается образованием 2,3-дигидрокси-п-хлортолуола (7 %) и 3-гидрокси-п-хлортолуола (18 %) (пики 3 и 5). Как следует из полученных данных, на начальной стадии деградации хлорбензола и хлортолуола разложение ионов хлора не происходит, что указывает на их устойчивость в составе продуктов трансформации в подобранных условиях. При деградации о-хлортолуола воздействием указанных бактерий в составе продуктов его трансформации были обнаружены 6-гидрокси-о-хлорбензойная (25 %) и м-хлорбензойные кислоты (20%), а также 6-гидрокси-о-хлортолуол (15 %). Аналогичные соединения зафиксированы в случае м-хлортолуола: 4-хлорсалициловая (25%) и м-хлорбензойная кислоты (23%) и 6-гидрокси-м-хлортолуол (20%):



Наиболее быстрое разложение было установлено в случае п-хлорфенола и тетрахлорпирокатехина (рис. 2) Так, в случае п-хлорфенола продуктами его биотрансформации в основном оказались 4-хлорпирокатехин (15%) и 2,3-дигидрокси-м-парахлорфенол (25%) (кривая а). А в случае тетрахлорпирокатехина лишь одно соединение – тетрахлормуконовая кислота (кривая б). Установлено, что в этих случаях деградации исследуемых соединений, в отличие от предыдущих, происходят одновременно с дехлорированием и разрывом фенольного кольца.



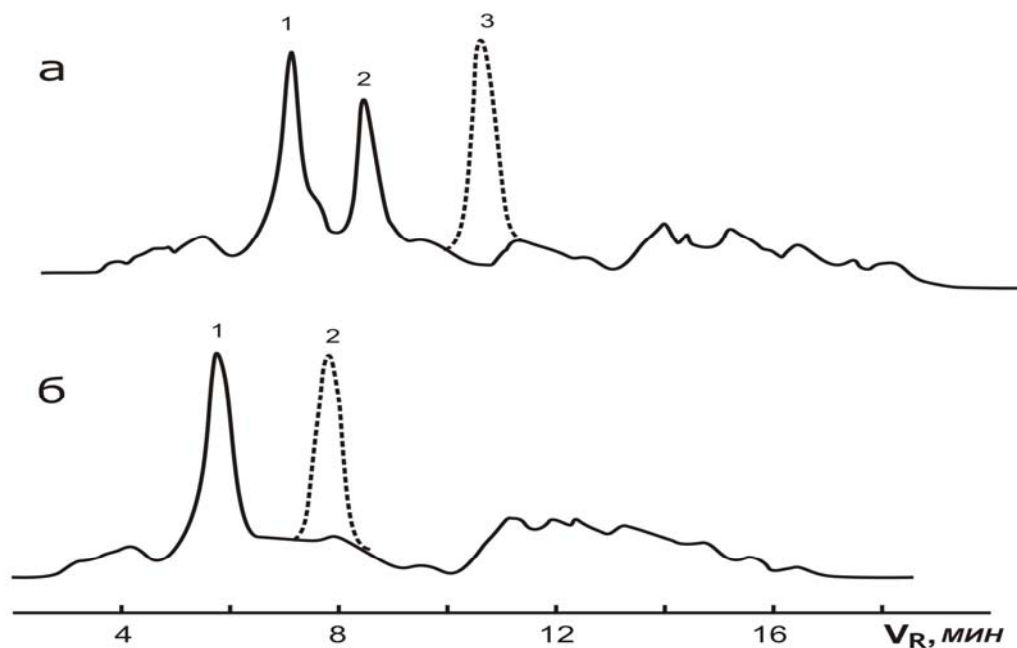


Рис. 2. Хроматографические кривые биодegradации хлорфенола (а) и тетраxлорпирокатехина (б)

а) пики 1-3: 4-хлорпирокатехин, 2,3-дигидрокси-п-хлорфенол и исходной хлорфенол;

б) пики 1 и 2: тетраxлормуконовая кислота и исходный тетраxлорпирокатехин.

Помимо хроматографического анализа, строение продуктов биодegradации хлорсодержащих ароматических соединений анализировалось также на основе данных спектров ИКС и ПМР (протонно-магнитный резонанс). В ИК – спектрах полосы поглощения при 1600-1640 и 3030-3045 см^{-1} характеризуют наличие ароматического кольца. Полосы при 740-770 см^{-1} характерны для С-Сl связи. Присутствие же полос поглощения в области 1710-1735 см^{-1} (С=О) и 3450-3600 см^{-1} (О-Н) указывает на карбоксильную группу [13].

В ПМР- спектрах имеются сигналы химических сдвигов 6.70-6.85; 7.50-7.70; 10.10-10.50 м.д., характерные, соответственно, протонам ароматического кольца, гидроксильной и карбоксильной групп [14]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что выделенные активные штаммы фенолусваивающих бактерий из родов: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus* способны активно дegradировать галогенсодержащие ароматические соединения. По результатам хроматографических, ИК и ЯМР¹Н спектроскопических анализов продуктов биодegradации установлено, что при трансформации галогенсодержащих ароматических соединений под воздействием бактерий образуются продукты, полученные окислением алкильного радикала по боковой цепи ароматического кольца, а также его гидроксильрованием и раскрытием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Адылова А.Т., Черникова Т.Н., Абдукаримов А.А. Биодegradация фенола штаммом *Pseudomonas* sp., маркированным gfp-геном // Приклад. биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44. № 2. – С. 308-313.
2. Бабашлы А.А., Салманов М.А., Велиев М.Г. Дegradация фенола и его производных микроорганизмами выделенными из Азербайджанского побережья Каспийского моря // Материалы II Международной научно-практической конференции. Экология биосистем: Проблемы изучения, индикации и прогнозирования, 25-30 августа 2009 г. – С. 130-132.

3. Беретовская Ю.Ю., Игнатов В.В., Маркина Л.Н., Камнев А.А., Макаров О.Е. Деструкция хлорпроизводных фенола: орто-хлорфенола, пара-хлорфенола и 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты бактериальным сообществом анаэробного ила // Микробиология. – 2000. – Т. 69. № 4. – С. 483-487.
4. Велиев М.Г., Бенгт Даниелсон, Салманов М.А., Алиева С.Р., Бекташи Н.Р. Биодegradация Бакинской нефти и углеводов микромицетами // Нефтехимия. – 2008. – Т. 48. – № 1. – С. 55-61.
5. Гордон А, Форд Р. Спутник химика. – М.: Мир, 1976. – 541 с.
6. Каретникова Е.А., Жиркова А.Д. Дegradация фенольных соединений, образующихся в процессе пиролиза лигнина микроскопическими грибами родов *Trichoderma* и *Penicillium* // Известия РАН, Серия биологическая. – 2005. – № 5. – С. 539-544.
7. Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений. Практическое руководство. – М.: Мир, 1965. – 209 с.
8. Определитель бактерий Берджи. Под редакций Дж. Хоулта, Н. Крига П. Снита, Дж. Стейли и С. Уильямса. Перевод с английского под редакцией акад. РАН. Заварзина Г.А. – М.: Мир, 1997.
9. Салманов М.А. Экология и биохимическая продуктивность Каспийского моря. – Баку, 1999. – 400 с.
10. Суровцева Э.Г., Ивойлов В.С., Карасевич Ю.Н. Метаболизм хлорированных анилинов *Pseudomonas diminuta* // Микробиология. – 1981. – Т. 55. – № 4. – С. 591-595.
11. Mamed Salmanov, Mamed Veliyev, Saida Aliyeva, Aynur Babashly, Nazim Bektashi Degradation of phenol and its derivatives by microorganisms of Caspian Sea / 23. Ulusal Kimya Kongresi, 16-20. – Haziran, 2009. – S. 10.
12. Salmanov M.A., Veliyev M.G., Aliyeva S.R., Bektashi N.R. The study of the degradation ability of oil products and oil hydrocarbons by microscopic fungi isolated from the polluted coastal areas of the Absheron Peninsula of the Caspian Sea // International Journal “Ecoloji” 2008. – V. 68. № 17. – P. 59-64.
13. Krone U.R., Thaur R.K., Dehalogenation of trichlorofluora methane (CFC-11) by *Methanosarcina barkeri* // FEMS Mikrobiol. Lett. – 1992. – V. 90. – P. 201-204.
14. Hougler B.E., Nishing S.F., Spain J.C., Degradation of 1,2-dichlorobenzene by a *Pseudomonas* sp. // Appl. Environ. Mikrobiol. – 1989. – V. 54. – P. 2144-2151.

M. Salmanov, M. Veliyev, A. Babashly, H. Bektashi

BIODEGRADATION OF HALOGEN STRUCTURED AROMATIC ASSOCIATIONS WITH BACTERIA ISOLATED FROM AZERBAIJAN COSTS OF CASPIAN

Abstract. Bacteria due to *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus* species isolated from coastal waters and silts of Caspian of Azerbaijan actively utilized some chlor structured aromatic associations as the only carbon source under laboratory conditions. By the reversed-phase liquid chromatography, NMR 1H and IR spectroscopy methods there were studied the biodegradation of above the mentioned products. It was found that while the transformation process of halogen structured aromatic associations affected by bacteria, there are created products obtained from alkenes radical oxidation of edge site chain and by hydroxylation and opening aromatic ring as well.

Key words: Caspian Sea, bacteria, aromatic associations, biotransformation, biodegradation, liquid chromatography.