

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования
«Пушкинский государственный естественно-научный
институт»
Факультет Микробиологии и биотехнологии**

**На правах
рукописи**

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
«Способность почвенных бактерий разлагать фенол»**

**Направление подготовки
06.04.01 Биология
Профиль
«Микробиология и биотехнология»**

**Выполнил(а) студент(ка) _____ Иминова Л.Р.
Научный руководитель
д.б.н. _____ Соляникова И.П.**

**«Работа допущена к защите»:
Декан факультета,
д.б.н. _____ А.А. Леонтьевский**

Пушино, 2020 г.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
1.Основные физические и химические свойства фенола.....	7
1.1. Синтез фенола и области его применения.....	11
1.2. Способы очистки окружающей среды от фенола.....	13
2.Организмы и методы культивирования.....	17
2.1. Микроскопия и идентификация. Филогенетический анализ.....	22
2.2. Активности основных ферментов пути деградации фенола.....	25
3.Биохимические свойства исследуемых штаммов.....	30
3.1. Потенциальная способность выделенных культур к деструкции ароматических соединений.....	34
3.2. Условия культивирования и деградативный потенциал штамма 7В.....	37
3.3. Биотехнологический потенциал штаммов - деструкторов ароматических соединений.....	54

Заключение.....	58
Список использованной литературы.....	61

Введение

Ароматические соединения и их производные широко распространены в природе и участвуют в загрязнении окружающей среды. Фенол – это один из широко распространённых промышленных загрязнителей, его источниками являются производства нефтехимии, часть фенола поступает в окружающую среду в результате разложения растений и животных. Фенол и особенно его производные токсичны для животных, человека, для многих микроорганизмов, поэтому промышленные сточные воды с высоким содержанием фенола плохо поддаются биологической очистке. Фенол и его производные как естественные, так и антропогенные ароматические соединения, классифицированы Агентством по токсическим субстанциям и регистрации заболеваний (ATSDR, 2013), как приоритетные опасные

вещества в силу их потенциального токсического, мутагенного, канцерогенного и тератогенного эффектов.

Биологические способы очистки, в частности микробная биodeградация, имеют огромный потенциал и конкурентные преимущества, прежде всего вследствие экологической безопасности и низкой стоимости. Многие бактерии способны к деструкции фенола, среди них грамотрицательные бактерии родов *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, и представители грамположительных бактерий родов *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Rhodococcus* и *Bacillus*. Микроорганизмы разлагают токсичные ароматические соединения до безопасных для живого легко утилизируемых субстратов. Поэтому выделение и характеристика новых штаммов-деструкторов являются перспективным направлением исследований для создания эффективных биопрепаратов, пригодных для биоремедиации.

Источники загрязнения окружающей среды разнообразны, они имеют как природное естественное происхождение, так и могут представлять собой синтезированные соединения.

Данные, раскрывающие особенности биологической конверсии фенола и его производных, чаще всего касаются представителей рода *Pseudomonas*, несколько меньше известно о представителях родов *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus* и *Sphingomonas* (Козловский С. и др., 1993; Lang E., 1996; Prieto M. et al., 2002; Rehfuss M., Urban J., 2005; Gouda M., 2007; Agarry S. et al., 2008; Liu Y. et al., 2008; Wang C. et al., 2008; Wasi S. et al., 2008; Плотникова Е.Г., 2010).

К настоящему времени хорошо исследованы грамтрицательные бактерии-деструкторы (галоген)ароматических соединений (Pieper, 2005; Field, Sierra-Alvarez, 2008). Грамположительные бактерии, в частности представители порядка Actinomycetales (класс Actinobacteria) (Stackebrandt et al., 1997), изучены в гораздо меньшей степени, хотя обладают обширным потенциалом в отношении разложения устойчивых ксенобиотиков, а также широко распространены в природных и антропогенных почвах, сохраняют метаболическую активность в разных диапазонах температур, рН и минерализации среды (Нестеренко и др., 1985; Ившина, 1997; Martinkova et al., 2009). Среди них описаны деструкторы бифенила/полихлорированных бифенилов (ПХБ), хлорбензойных кислот, фенольных соединений. Наиболее полно биохимические и генетические особенности катаболизма таких веществ исследованы у представителей рода *Rhodococcus* (Соляникова, 2007; Häggblom et al., 1988; Labbe et al. 1997; Takeda et al., 2004). Информация о биодegradативных свойствах актиномицетов других родов, в том числе *Arthrobacter*, *Dietzia*, *Janibacter*, ограничена (Sierra et al., 2003; Abraham et al., 2005).

В целлюлозно-бумажном производстве используется не менее токсичное соединение – лигнин, который является нежелательными компонентом, снижающим качество бумаги и целлюлозных полуфабрикатов. Несмотря на то, что лигнин является вторым по распространению природным полимером, он образуется в качестве отходов в таких количествах, что представляет серьезную угрозу для окружающей среды. Мономерные звенья макромолекулы лигнина

называют фенилпропановыми единицами (ФПЕ), поскольку эти структурные единицы являются производными фенилпропана, таким образом производные фенола широко представлены в растительной массе. Еще одним природным соединением, которое может оказывать отрицательное воздействие на окружающую среду и здоровье человека, если находится вне природных резервуаров, является сырая нефть, ее компоненты и продукты ее переработки. (Двадненко М.В., Маджигатов Р.В.,Ракитянский Н.А. Воздействие нефти на окружающую среду//Международный журнал экспериментального образования.-2017.-№3-1.-С.89-90) Негативное влияние нефтепродуктов на почву, в первую очередь проявляется в изменении ее физических свойств, которые оказывают влияние на морфологические признаки почв, нарушается воздухообмен в почве, затрудняется поступление воды, необходимой для обеспечения жизнедеятельности организмов почвы.

Актуальность данной дипломной работы заключается в возможности практической реализации исследованной способности микроорганизмов к деструкции токсичных соединений. В данной работе рассматривается ряд прикладных решений проблемы загрязнения окружающей среды различного рода поллютантами, в частности фенолом, нефтью и ее производными.

Целью данной работы являлось выделение новых бактерий-деструкторов фенола, путем создания коллекции штаммов, их характеристика и оценка биотехнологического потенциала. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- среди 81 анализируемой культуры опытным путем отобрать культуры, способные к деструкции фенола;
- провести идентификацию отобранных культур;
- определить активность ключевых ферментов пути разложения фенола;
- определить оптимальные и наиболее неблагоприятные условия для культивирования отобранных бактерий;
- выявить способность данных культур к деструкции иных поллютантов;
- определить биотехнологический потенциал отобранных экспериментальным путем культур.

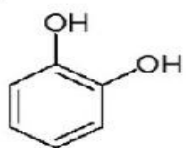
1. Физические и химические свойства фенола

Кратко рассмотрим физические и химические свойства фенола и его производных, так как исследования, приведенные в данной дипломной работе, были направлены на выявление штаммов – потенциально способных к деструкции именно этого класса соединений.

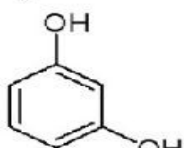
Молекула фенола (фенольного соединения) содержит бензольное ядро, состоящее из одной, двух или более гидроксильных групп. Наиболее распространенным и простейшим представителем фенольных соединений является фенол.

Классификация фенолов зависит от количества ОН-групп. Исходя из этого параметра, различают одноатомные фенолы (фенол, крезолы) и многоатомные (арендиолы и арентриолы). Наиболее распространенными среди многоатомных фенольных соединений являются двухатомные. Такие как, пирокатехин, резорцин и гидрохинон. К трехатомным фенолам или арентриолам относят – пирогаллол, флороглюцины и др.

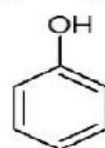
Двухатомные фенолы (арендиолы)



пирокатехин

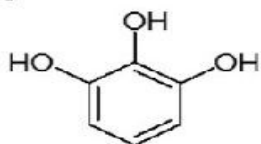


резорцин

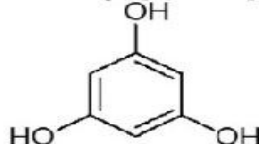


гидрохинон

Трёхатомные фенолы (арентриолы)



пирогаллол
(1,2,3-триоксибензол)



флороглюцин
(1,3,5-триоксибензол)

Особенностью структурного строения фенольных соединений является изомерия положения ОН-группы (гидроксигруппы). К настоящему времени известно более нескольких тысяч соединений этого класса, которые принято делить на две группы:

- летучие с паром фенолы (фенол, крезолы, ксиленолы, гваякол, тимол);
- нелетучие фенолы (резорцин, пирокатехин, гидрохинон, пирогаллол и другие многоатомные фенолы).

В органолептическом и токсикологическом отношении эти две группы не равнозначны. Наиболее токсичными являются летучие с паром фенолы, обладающие более интенсивным запахом. Самые резкие запахи дают простой фенол и крезолы. Образование фенольных соединений в естественных условиях происходит чаще всего в процессах биохимического распада и трансформации органических соединений, в клетках живых организмов. Выделяемый в этом процессе фенол, является токсичным веществом, способным ингибировать рост и размножение грибов и вирусов.

Так как фенол является слабой кислотой, имеющей рН равный 9,98, его высокая реакционная способность в реакциях окисления находит техническое применение при использовании фенольных соединений в качестве ингибиторов процессов авто окисления масел и жиров, следовательно, имеет большое значение в биосинтезе природных фенольных соединений. Немаловажным свойством фенольных соединений является их способность к образованию солей с металлами. (Наглядное пособие. Химические свойства спиртов и фенолов. - М.: Дрофа, 2007.С.290). Практически все фенольные соединения

твердые, а их цвет меняется от светло-желтого до красного, коричневого или пурпурного.

Сточные воды предприятий лесохимической, нефтеперерабатывающей, лакокрасочной, целлюлозно-бумажной, а также текстильной промышленности являются одним из источников загрязнения окружающей среды, содержащими высокие концентрации фенола и его производных.

Для примера, в сточных водах промышленных предприятий содержание фенолов может превосходить 5-10 г/л при весьма разнообразных сочетаниях, при том что предельно допустимая концентрация фенолов в питьевой воде и воде рыбохозяйственных водоемов составляет 1 мкг/л. (Шевцов М.Н. Водоснабжение промышленных предприятий: учеб. пособ. для вузов. – Хабаровск: Изд-во ТОГУ, 2010. – 127 с.).

Указанием на загрязнение водоемов может служить повышение естественного фона по фенолу. В природных водах содержание их может достигать десятков и даже сотен микрограммов в 1 литре. Вода в водоеме меняет окраску, приобретает специфический запах карболки, покрывается флуоресцирующей пленкой, мешающей естественному течению биологических процессов в водоеме. В поверхностных водах фенолы могут находиться в растворенном состоянии в виде фенолятов, фенолят-ионов и свободных фенолов (Инженерная защита поверхностных вод от промышленных стоков: Учеб. пособие/Д.А. Кривошеин, П.П. Кукин, В.Л. Лапин и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 344 с.).

Целесообразно отметить еще одну способность фенольных соединений, а именно способность вступать в реакции

конденсации и полимеризации, образуя сложные гумусоподобные и другие довольно устойчивые соединения. Промышленные воды, содержащие эти токсические соединения, поступают в водоемы и водотоки, резко ухудшая их общее санитарное состояние, что сказывается не только на живых организмах, но и на содержании в водоеме кислорода и углекислого газа. Для очистки сточных вод от бактериальной инфекции чаще всего используют хлор, который вступая в реакцию с фенолом образует устойчивые соединения хлорфенолов, малейшие следы которых (0,1 мкг/дм³) придают воде характерный привкус и запах (Очистка производственных сточных вод: Учеб. пособие для вузов/С.В. Яковлев, Я.А. Карелин, Ю.М. Ласков, Ю.В. Воронов; Под ред. С.В. Яковлева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Стройиздат, 1985. – 335 с.).

Серьезные последствия для организма человека может оказать работа с фенольными соединениями при несоблюдении правил безопасности. Чаще всего негативное воздействие на организм проявляется не сразу, а через недели, или даже месяцы работы с чистыми соединениями вне специализированных для этого помещениях. Взаимодействие фенольных соединений с кожными покровами может вызвать аллергию, экзему, а присутствие фенолов в воздухе, по мнению специалистов, ведет к заболеваниям верхних дыхательных путей и системы кровообращения.

Довольно распространенными и не менее токсичными являются нитрофенольные соединения — нитроцен (продукт каменноугольных фенолов), динитрофенол и др. Эти соединения чаще используют как инсектициды, фунгициды и гербициды. Нитрофенольные соединения вызывают диссоциацию окислительной фосфоризации, что, в свою

очередь, усиливает процессы клеточного окисления, увеличивает потребность тканей в кислороде и нарушает теплопродукцию и терморегуляцию.

В водоемах ПДК для фенола установлена 0,001 мг/л(Хенце М. Очистка сточных вод: Пер. с англ./ Хенце М., Армоэс П., Ля-Кур-Янсен Й., Арван Э.- М.: Мир,2006. - 480 с.).

Фенолы подвержены главным образом биохимическому окислению. При концентрации более 1 мг/л разрушение фенолов протекает достаточно быстро, убыль фенолов составляет 50-75% за трое суток, при концентрации несколько десятков микрограммов в 1 литре этот процесс замедляется, и убыль за то же время составляет 10-15% (Поруцкий Г.В. Биохимическая очистка сточных вод органических производств. М., «Химия», 1975. С. 256.) Наличие нефтяного загрязнения замедляет распад фенолов, так как биodeградация нефтяных углеводов образует собственные фенолы, увеличивая общую картину загрязнений. Процесс самоочищения водоемов от фенола протекает относительно медленно и его следы могут уноситься течением реки на большие расстояния, поэтому до сброса фенолсодержащие стоки подвергают глубокой очистке.

1.1. Синтез фенола и области его применения.

Основным потребителем фенола на короткое время стала медицина. Также фенол широко использовался для производства сильного взрывчатого вещества — пикриновой кислоты.

Водные растворы фенола - карболка (5%) применяют для дезинфекции помещений, белья. Так как фенольные соединения обладают антисептическими свойствами, их

активно применяли в медицине в годы Второй Мировой войны. Но из-за высокой токсичности в настоящее время использование сильно ограничено. Фенол и его производные широко используется в молекулярной биологии и генной инженерии для очистки ДНК. Кроме того, в смеси с хлороформом ранее использовался для выделения ДНК из клетки.

В данное время можно выделить несколько основных направлений использования фенола. Основным направлением является производство лекарственных средств. Самое распространенное жаропонижающее — аспирин не что иное, как ацетилсалициловая кислота, которую получают из фенола. Эфир салициловой кислоты и самого фенола тоже хорошо известен под названием салол. При лечении туберкулеза применяют парааминосалициловую кислоту (сокращенно ПАСК). А также, при конденсации фенола с фталевым ангидридом получается фенолфталеин, он же пурген.

Другое направление применения фенола - производство синтетических волокон: нейлона, капрона. Но важнейшая область его применения - производство феноло-формальдегидных смол. Фенол применяется для производства присадок к маслам, для селективной очистки масел, ортокрезола и для других целей, он входит в состав некоторых красителей, парфюмерных продуктов, пластификаторов для полимеров, средств защиты растений.

В Таблице №1 указаны основные направления использования фенола.



Таблица 1. Основные направления использования фенола

Методы синтеза фенола различаются природой используемого сырья, химизмом и экономичностью процесса.

Выделяют следующие методы синтетического производства фенола:

- сульфатный, заключается в щелочном плавлении бензолсульфокислоты;
- хлорный - щелочной или водопаровой гидролиз хлорбензола;

- окислительные, основанные на окислении до фенола бензола, толуола и циклогексана.

1.2. Способы очистки окружающей среды от фенола.

Регенерация фенолов из сточных вод по экономическим соображениям целесообразна, если концентрация их превышает 2 г/л, однако иногда регенерационные методы применяют и при более низких концентрациях. К наиболее распространенным методам регенерационной очистки сточных вод от фенолов относят экстракцию, выпаривание, сорбцию. Методом многоступенчатой экстракции, применяя такие экстрагенты, как бензол, бутилацетат, достигают изъятия фенолов на 90-95% при остаточных концентрациях 200-300 мг/л. Такие результаты характерны для пяти-шестиступенчатой экстракции при подаче в каждую ступень 10% экстрагента. Увеличивая число ступеней и удельный расход экстрагента, можно получить на выходе концентрацию фенола 15-20 мг/л, однако, как правило, промышленные установки на такую очистку не рассчитываются. С очищенной водой уходит от 100 до 300 мг/л экстрагента, который затем отгоняется (Воронов Ю.В., Яковлев С.В. Водоотведение и очистка сточных вод: учеб. для вузов (направление «Строительство»). 4-е изд., доп. и перераб. М.: АСВ: Изд-во МГСУ, 2006. – 704 с.).

Фенолы, растворившиеся в экстрагенте, извлекают с помощью каустика; регенерацию экстрагента осуществляют также путем отгонки. Экстракция - это наиболее распространенный метод очистки сточных вод на газогенераторных станциях и других аналогичных предприятиях.

На специализированных установках очищают ежегодно свыше 10 млн. м³ фенол содержащих сточных вод. Эффективность извлечения фенолов при этом достигает 90-93%, а остаточные концентрации 200-300 мг/л. Очистку загрязненного фенолами пара производят в скрубберах при орошении их раствором щелочи. Фенолят, образующийся в ходе этого процесса, поступает на переработку. Такие установки характерны для коксохимических заводов.

Как экстракция, так и выпаривание не обеспечивают остаточных концентраций фенолов, близких к ПДК, после них необходима существенная доочистка.

Наиболее эффективными считаются сорбционные методы очистки сточных вод от фенола. В качестве сорбентов применяют активированный уголь и некоторые промышленные стоки золу, шлаки, генераторную пыль и пр. Активированный уголь способен задерживать фенолы в количестве 20-30 г на 1 кг собственной массы, с его помощью можно получать воду, практически не содержащую фенолы. Однако срок службы активированного угля непродолжителен, а его регенерация и извлечение задержанных фенолов представляют известную сложность. Требуется промывка загрузки бензолом или другим растворителем фенолов с последующим извлечением фенола из растворителя известью или отгонкой. Можно

регенерировать загрузку пропариванием с извлечением фенола из пара щелочью. Все это делает метод сорбции фенолов на активированном угле дорогостоящим, поэтому на практике его применяют редко.

Довольно часто применяют метод сорбции фенолов на золе и шлаке, который возможен в целях доочистки, когда не ставят задачу извлечения фенолов для их повторного использования. Сорбционная способность золы по фенолам зависит от ее происхождения. Так, торфяная зола способна сорбировать 1 г фенола на 1 кг собственной массы, зола бурого угля всего 160 мг/кг (Пугачев Е.А. Процессы и аппараты обработки осадков сточных вод. – 2010. – 208 с.).

Иногда очистку сточных вод с помощью золы и шлаков можно осуществлять путем их сброса на золоотвалы, фильтрацией стоков через дамбы, отсыпаемые из золы или шлака, путем смешивания фенольных сточных вод со стоками гидрозолоудаления ТЭЦ или использования их для смыва и транспортирования золы и шлака от котельных установок.

Когда концентрация фенолов невысока, и регенерировать их невыгодно, для доочистки сточных вод от фенолов после их регенеративного извлечения прибегают к деструктивным методам как биологическое или химическое окисление.

Биологическую очистку промышленных сточных вод от фенолов выполняют на биофильтрах или в аэротенках. Обычные сооружения биологической очистки, рассчитанные на очистку хозяйственно бытовых сточных вод или их смесей с промышленными, способны перерабатывать фенолы при

концентрации не выше 50 мг/л (допустимая концентрация по СНиП 2.04.04-84 составляет 15 мг/л).

Биологическая очистка промышленных сточных вод допустима при содержании фенолов до 500-1000 мг/л и БПК₂₀ не более 800 мг/л для биофильтров и 1200 мг/л для аэротенков. В противном случае требуется предварительное разбавление сточных вод технической водой или бытовыми сточными водами. При этом окислительная способность биофильтров по фенолу составит 300-500 г/сутки на 1 м³ загрузки, а аэротенков 1000 г/сутки на 1 м³ объема. Чтобы уменьшить вредное влияние возможных залповых сбросов, рекомендуют использовать аэротенки смесители, а также предусматривать в технологических схемах сооружения, предупреждающие пропуск сточных вод с недопустимой концентрацией фенолов на установки биологической очистки (усреднители, аварийные накопители и пр.).

Эффективность биологической очистки от фенолов достигает 80-90% при остаточных концентрациях 10-50 мг/л.

Существует и химический метод очистки сточных вод от фенолов, который заключается в добавлении сильных окислителей: хлора, озона. При добавлении в воду с некоторым избытком хлора гипохлористый ион реагирует с молекулами фенола и образует малеиновую кислоту (Алексеев Е.В. Физико-химическая очистка сточных вод: Учебное пособие. – М.: Издательство Ассоциации строительных вузов, 2007. – 248 с.).

В случае недостатка хлора возможно образование хлорфенола, поэтому для надежности и полноты окисления прибегают к

перехлорированию сточных вод, добавляя такое количество хлора, чтобы остаточное содержание активного хлора находилось в пределах 1-10 мг/л. При обеспечении 30-минутного контакта фенольной воды с хлором этот метод дает практически полную очистку от фенолов (Алексеев Е.В. Физико-химическая очистка сточных вод: Учебное пособие. – М. : Издательство Ассоциации строительных вузов, 2007. – 248 с.).

Процесс озонирования производят в барботажных колоннах при продувке воды содержащим озон газом. Как и при хлорировании, окисляться будут не только фенолы, но и другие загрязнения, поэтому для достижения приемлемой очистки от фенолов требуется значительный расход озона (1,5-3 г/л) и электроэнергии для его получения. Озонирование приемлемо при доочистке от фенолов сточных вод с небольшой окисляемостью, прошедших предварительную фильтрацию.

2. Организмы и методы культивирования.

Исследованные штаммы были переданы автору дипломной работы из коллекции штаммов, способных к росту на бензоле.

Изучаемые микроорганизмы были выделены из загрязнённых и незагрязнённых почв России (г.Саратов, в близи нефтеперерабатывающего завода, а также г.Пушино Московской области) и Казахстана. Отбор проб производился с глубины 5-10 см. Все отобранные образы были перемешаны.

Образцы массой 5 г вносили в колбы Эрленмеера с предварительно приготовленной стерильной минеральной средой, содержащей 0,5 % мясо-пептонной среды в качестве ростового субстрата. Затем колбы были перенесены на качалки (180 об/мин) для посдующего культивирования при 28°C в течении 7 суток.

После клетки переносили на агаризованную богатую среду после разведения до до 10^{-6} - 10^{-8} . Отдельные колонии, не схожие по морфологическим признакам, пересевали на богатую среду в заранее приготовленные косяки.

Полученные вышеописанным способом культуры прежде всего были проверены на способность использования бензоата в качестве ростового субстрата.

Для этого использовалась среда (содержащая 100 мг/л бензоата), следующего состава, г/л:

Na_2HPO_4 - 0.7;

KH_2PO_4 - 0.5;

NH_4NO_3 - 0.75;

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.2;

MnSO_4 - 0.001;

FeSO_4 - 0.02,

NaHCO_3 - 0.25.

Культивирование проводилось по схеме, аналогичной предыдущей, а именно был соблюден 28 градусный температурный режим, время культивирования составляло – 7 суток. После культивирования клетки были пересеяны на агаризованную богатую среду Luria Bertani после соответствующего разведения. Полученные отдельные колонии, также различные по морфотипу были использованы в дальнейшей работе.

Следующим поллютантом, использованным в качестве единственного источника энергии был использован фенол.

Концентрация стерильного фенола составляла 10 г на 100 мл. Выделенные культуры были пересеяны на косяки с минеральной средой, содержащей фенол в концентрации 200 мг на 1000 мл. В следующем этапе исследовательской работы использовались только те культуры, которые имели способность использовать фенол в данной концентрации в качестве источника углерода и энергии.

Отобранные таким образом культуры переносили в жидкую питательную среду все того же состава, но с измененной долей вносимого фенола, а именно 100 мг /л. Минеральная среда и фенол были стерильны.

После внесения клеток в колбу с питательной средой отбиралась так называемая «нулевая проба» относительно

которой в дальнейшем проводилось измерение оптической плотности. Оптическая плотность промерялась с использованием спектрофотометра UV -1800 (" Shimadzu", Япония).

Если рост не обнаруживался, то данная культура исключалась из эксперимента. Кроме того, на спектрофотометре после центрифугирования в течении 2 минут на 12000 ед. снимался спектр в диапазоне от 200 до 340нм.

Отбор проб производился каждые 24 часа.

В случае, если культура демонстрировала рост и способность к деструкции фенола (что подтверждалось убылью фенола в колбе), 10-20 мл клеточной суспензии данной культуры переносилось в свежую питательную среду, а концентрация фенола увеличивалась до 300 мг/л.

Культуры, черневшие при низких концентрациях фенола, также пересеивались в жидкую питательную среду с увеличенной дозировкой фенола.

После анализа данных по убыли фенола, концентрация этого токсиканта в минеральной среде увеличивалась до 500 мг/л , а затем и до 1 г/л. РН среды , при необходимости корректировался , и поддерживался в диапазоне -7.0-7.2 путем внесения щелочи, а именно гидроокиси натрия.

Таким образом был проанализирован 81 штамм. Созданная путем накопительного культивирования коллекции штаммов – деструкторов ароматических соединений была разделена на три основные группы.

Первая группа состояла из 8 штаммов, выделенных из ризосферы растений. Данные штаммы были обозначены – Fch 1-8. Они разлагали фенол в концентрациях 100 мг/л и все были пересеяны на минеральную среду, содержащую 300мг /л фенола. Штаммы под номерами 4,5,6,7, и 8 были способны разлагать фенол в концентрации 300 мг/л и для этих штаммов концентрация фенола была увеличена до 500 мг/л . Наиболее активными в этой группе оказались штаммы Fch 5,7,8.

Таблица 2. Убыль фенола при культивировании бактерий, 300 мг/л

Порядковый номер штамма	«0» проба	24 часа	96 часов
Fch1	1,937	1,917	
Fch2	1,088	1,030	1,062
Fch3	1,370	1,110	1,270
Fch4	1,160	0,696	
Fch5	1,439	0,502	
Fch6	2,907	2,615	0,806
Fch7	3,052	2,832	0,703
Fch8	2,950	2,988	0,541

Из второй группы штаммов, выделенных из ризосферы растений, растущих на загрязненной почве, в той же последовательности и по такой же методике из 6 штаммов (Fg 1, 3-7) был отобран один штамм - Fg 1, способный разлагать фенол в концентрации 500 мг/л.

Третья группа микроорганизмов состояла из 17 штаммов, выделенных из загрязненной почвы г. Саратова, отобранной с территории нефтеперерабатывающего завода. Из этой группы 3 штаммы были способны к деструкции фенола в концентрации 500 мг / л – 8БН, 7В, 13ВН.

Кроме того, штамм 7В был способен к деструкции фенола в концентрации – 1 г/л.

Таблица № 3

Убыль фенола при культивировании бактерий, 100 мг/л*

Порядковый номер штамма	«0» проба	48 часов	96 часов
2Б	0,460	0,479	0,476
3Б	0,593	0,488	0,472
4Б	0,507	0,503	0,519
5Б	1,872	1,869	1,219
7Б	1,511	1,371	0,895
8	0,752	0,591	0,484
13	0,821	0,727	0,605
1	0,646	0,580	0,540
2	0,643	0,606	0,600
3	0,580	0,654	0,685
4	1,021	0,912	0,899
5	2,082	2,052	2,078
6	1,870	1,873	1,921
10	2,832	2,859	2,899
11	1,765	1,766	1,751
14	2,329	2,373	2,434
15	2,389	2,59	2,428

Из этой группы на увеличенную до 500 мг/л концентрацию фенола были пересеяны 3 штамма (8, 7Б, 13БН)

Таблица № 4.

Убыль фенола при культивировании бактерий, 500 мг/л *

Порядковый номер штамма	«0» проба	24 часа	96 часов
13БН	3,040	3,050	1,252
8	2,980	2,931	1,483
7Б	2,319		0,524

*Приведены максимумы поглощения фенола на 270 нм.

Группа № 4. Состояла из 10 коллекционных штаммов-деструкторов поллютантов: 37 м/1, 6 1/Т, 3136, 3138, 3135, Н.С., ТХД-13, 3А, Кг-16, 14 имп. Среди них было отобрано 4 штамма, разлагающих фенол в концентрации 500 мг/л (Таблица 5).

Таблица № 5.

Убыль фенола при культивировании бактерий, 500 мг/л *

Порядковый номер штамма	«0» проба	24 часа	96 часов
6 1/Г	2,922	2,721	0,548
14 имп	2,955	2,933	0,335
3136	2,450	0,807	0,216
Тхд-13	2,942		0,423

*Приведены максимумы поглощения фенола на 270 нм.

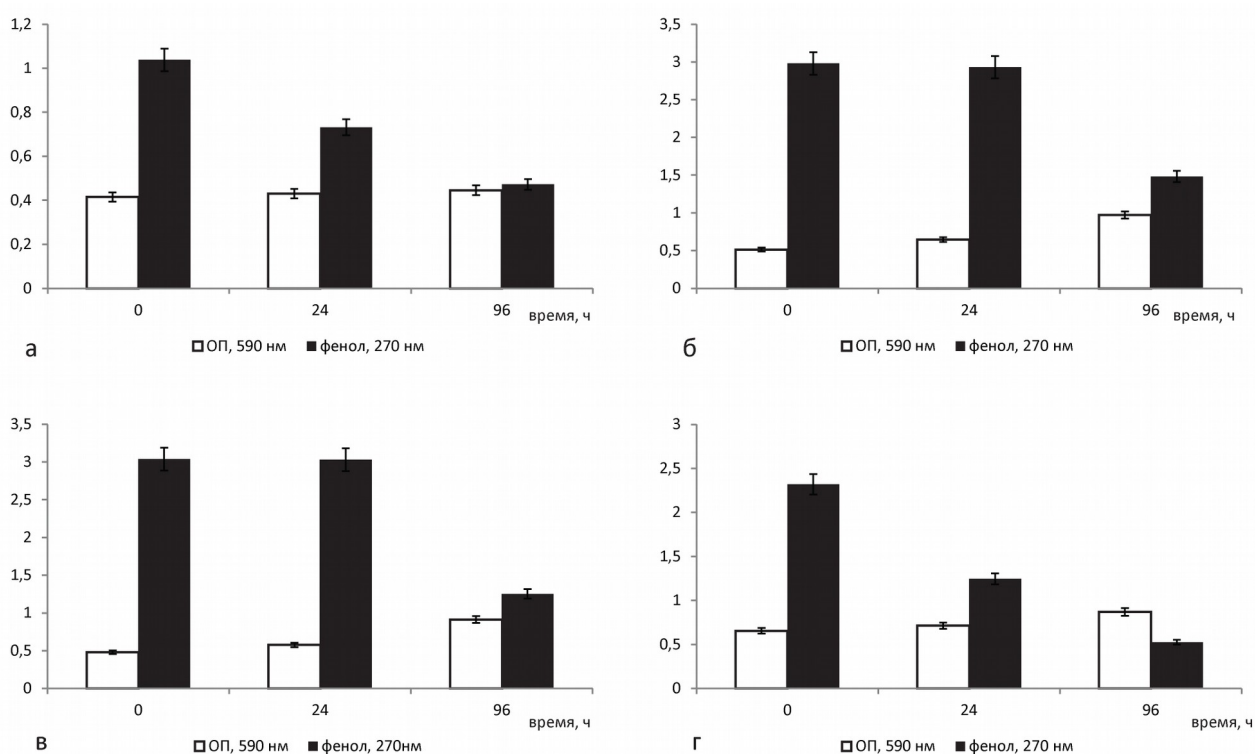


Рис.2 Изменение ОП клеток (1) и концентрации фенола (2) при выращивании штаммов *Stenotrophomonas* sp. Fch 8 (а), *Pseudomonas* sp. 13BN (б), *Isoptericola* sp. 8BN (в), *Rhodococcus* sp. 7B (г) на минеральной среде с фенолом (концентрация фенола 300 мг/л (а) и 500 мг/л (б-г)).

2.1. Микроскопия и идентификация.

Филогенетический анализ.

Все потенциальные штаммы- деструкторы были микроскопированы на каждом этапе проведения эксперимента. Микроскопические исследования штаммов проводились с использованием микроскопов Nikon Eclipse Ci microscope с камерой Progres SpeedXT , а также с использованием микроскопа Altami 3.4.

Проведенные микроскопические исследования позволили определить характерные морфологические особенности клеток культур.

Клетки штамма 7В представлены ветвящимися неподвижными палочками, характерными для родококков. Хотя при изменении условий культивирования, к примеру, культивирования на богатых средах, клетки данного штамма были представлены кокками.

Клетки штамма 13BN – средние палочки длиной 2-3 нм.

Штаммы Fch 5,7,8 – тонкие палочки длиной 1-2 нм, штамм 8 BN – в начальной стадии своего развития представленные длинными палочками длиной около 3-4 нм , которые в последствии способны дробиться образуя мелкие кокки. При культивировании штамма 8 BN на воде, содержащей в качестве единственного источника энергии микроскопическую целлюлозу, клетки штамма были представлены мелкими кокками с высокой оптической плотностью. Клетки штамма Fg 1- бациллы, образующие терминально расположенные споры, при этом формируя « булавообразную»форму клетки.

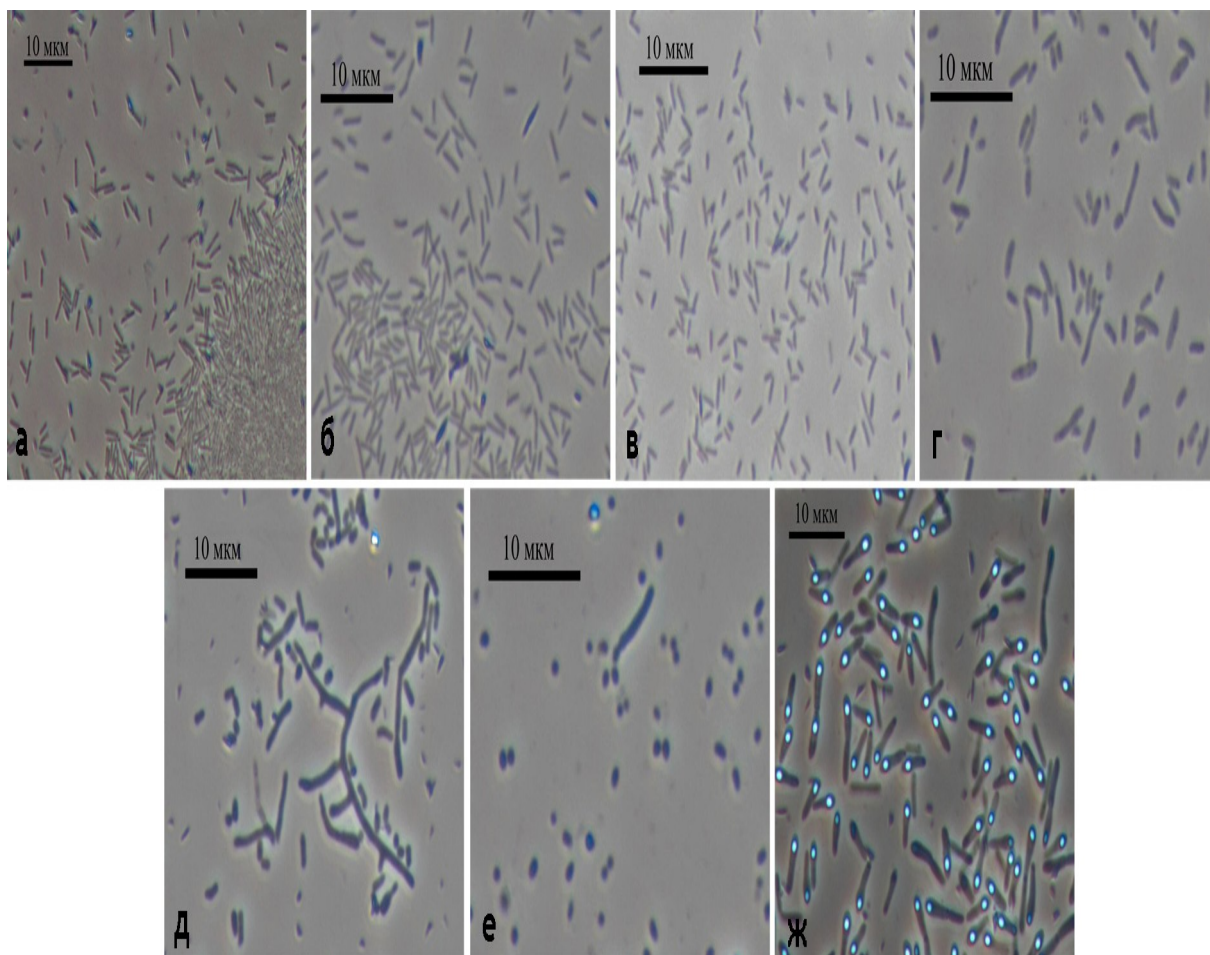


Рис.3. Фазово-контрастная микроскопия выделенных штаммов: а – *Stenotrophomonas* sp. Fch 5, б – *Stenotrophomonas* sp. Fch 7, в – *Stenotrophomonas* sp. Fch 8, г – *Pseudomonas* sp. 13BN, д – *Rhodococcus* sp. 7B, е – *Isoptericola* sp. 8BN, ж – *Lysinibacillus* sp. Fg 1

На основе анализа генов 16S рНК было определено, что отобранные культуры можно отнести к следующим филогенетическим группам: 7B – *Rhodococcus*, 13BN – *Pseudomonas*, Fch 5,7,8 – *Stenotrophomonas*, Fg1-*Lysinibacillus* sp., 8BN – *Isoptericola*.

Геномную ДНК выделяли с помощью набора Zymo Reseach Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Reseach, USA) в соответствии с рекомендацией производителя. Ген 16S рНК амплифицировали в ПЦР, используя универсальные для 16S

pPHK прокариот праймеры: 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1525r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3')

(Weisburg W.G, Barns S.M, Pelletier D.A, Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991. V. 173. No. 2. P. 697-703.). ПЦР осуществляли на приборах My-Cycler, Tetrad 2 ("Bio-Rad Laboratories", США).

Первичный филогенетический скрининг полученных последовательностей проводили с помощью программы BLAST и базы данных EzBioCloud.

Полученные нуклеотидные последовательности гена 16S pPHK выравнивали вручную с последовательностями референтных штаммов ближайших микроорганизмов с помощью программы CLUSTAL W. (Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucleic Acids Res.* 1994. V. 22. No. 22. P. 4673-4680.)

В результате проведенной работы показано, что штаммы-активные деструкторы фенола обнаруживаются как в почвах, длительное время подвергающихся антропогенной нагрузке, так и в «чистых» почвах, не несущих следы сельскохозяйственной и промышленной деятельности человека.

2.2.Активности основных ферментов пути деградации фенола

Деградация фенолов преимущественно проходит с образованием пирокатехина, который далее может подвергаться расщеплению в мета- или в орто-положении. Ключевыми ферментами

биodeградации фенолов являются пирокатехин-1,2- или 2,3-диоксигеназы (ПК 1,2-ДО и ПК 2,3-ДО соответственно). Основная масса изученных ПК 1,2-ДО выделена из грамотрицательных бактерий. Грамположительные бактерии представляют собой не меньший интерес в плане использования их для биоремедиации, поскольку обладают большей устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды и не менее широкой субстратной специфичностью, чем грамотрицательные бактерии. В литературе описано выделение и характеристика только нескольких пирокатехин-1,2-ди-оксигеназ из грамположительных бактерий, однако штаммы, использованные для характеристики пирокатехин - 1,2-ди -оксигеназы, выращивали не на феноле. Информация по ферментным системам разложения фенола у родококков также очень ограничена.

Отсутствие системных исследований бактериальных деструкторов является серьезным сдерживающим фактором развития безопасных и экономически выгодных технологий для решения частных задач рационального использования и охраны природных ресурсов. Следует подчеркнуть, что биотехнологии примерно в 50 раз дешевле традиционных методов, при этом конверсию загрязнителей можно провести без накопления вредных или токсичных веществ, что позволяет исключить вторичную контаминацию среды. Кроме этого, появляется возможность решения проблемы уничтожения значительных объемов накопленных отходов и невостребованных препаратов.

Незначительная часть бактерий способны разлагать бифенил/ПХБ только до (хлор)бензойных кислот, дальнейшее

разложение которых осуществляется другими группами бактерий (Unterman, 1996; Wiegel, Wu, 2000). Известно всего несколько природных штаммов грамотрицательных бактерий родов *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, осуществляющих полную деструкцию хлорированных бифенилов (Kim, Picardal, 2001; Adebuseye et al., 2007, 2008). С другой стороны, в качестве одного из распространенных интермедиатов расщепления ароматических соединений, в том числе хлор(метил)замещенных бифенилов, бензойных кислот и фенольных соединений, выступает (замещенный)пирокатехин, раскрытие ароматического кольца которого является ключевой реакцией, осуществляемой дециклизующими диоксигеназами — пирокатехин диоксигеназами (Schlömman, 1994). Информация о ферментах расщепления метилзамещенных пирокатехинов и биохимических путях ор/яо-расщепления фенола у грамположительных бактерий весьма ограничена (Solyanikova, Golovleva, 2004; Bruce, Cain, 1988; Cha et al., 1998).

Установлено, что бактерии родов *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Gluconobacter*, *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas* выполняют оригинальные реакции ассимиляции хлорфеноксикислот с образованием феноксиуксусной кислоты также с последующим раскрытием ароматического кольца.

С учетом вышеизложенного определялась активность следующих ферментов, участвующих в разложении фенола:

- пирокатехин-1,2-диоксигеназа;
- пирокатехин -2,3- диоксигеназа;

- протокатехоат -3,4- диоксигеназа;
- муконатциклоизомераза;
- гензиат -1,2-диоксигеназа.

Для определения активности ферментов, отобранных в ходе эксперимента, прежде всего было необходимо приготовление бесклеточных экстрактов.

Клетки разрушали экструзионной дезинтеграцией на прессе типа Хьюза (ИБФМ-пресс, Россия) с рабочим давлением 3200 кГ/см. После дезинтеграции клеточный дебрис удаляли центрифугированием (10000 *g*, 4°C, 30 мин) в присутствии следовых количеств ДНК-азы. Супернатант использовали в качестве бесклеточного экстракта для определения активностей ферментов. В реакционную смесь с конечным объемом 1,0 мл вносили 5–50 мкл экстракта. Определение активностей проводили при 25°C, начиная реакцию внесением бесклеточного экстракта, на спектрофотометре UV-1800 («Shimadzu», Япония).

Затем, с помощью спектрофотометра промерялась активность следующих ферментов:

- пирокатехаза;
- метапирокатехаза;
- муконатциклоизомераза.

Активность пирокатехин-2,3-оксигеназы определяли по скорости образования 2-гидроксимуконового полуальдегида в реакционной смеси, содержащей 0,25 мМ пирокатехина,

бесклеточный экстракт и 50 мМ Трис-НСl буфер (рН 7,5) ($\lambda = 375$ нм, $\varepsilon = 33400$ М-1 см⁻¹) [Негеман, 1966].

Активность пирокатехин-1,2-оксигеназы определяли по скорости образования цис-цис-мукона в реакционной смеси, содержащей 5 мМ Na ЭДТА, 0,25 мМ пирокатехина, бесклеточный экстракт, 50 мМ фосфатный буфер (рН 7,0) ($\lambda = 260$ нм, $\varepsilon = 16900$ М-1 см⁻¹) [Негеман, 1966].

Активность гентизат-1,2-диоксигеназы определяли по скорости образования малеил-пирувата в реакционной смеси, содержащей 0,1 мМ гентизата, бесклеточный экстракт и 100 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,4) ($\lambda = 330$ нм, $\varepsilon = 10800$ М-1 см⁻¹) (Crawford, R.L., Hutton, S.W., Chapman, P.J. Purification and properties of gentisate 1,2-dioxygenase from *Moraxella osloensis* // J. Bacteriol. 1975. V. 121. No. 3. P. 794–799.).

Активность протокатехоат-3,4-диоксигеназы определяли по уменьшению экстинкции протокатехоата в реакционной смеси, содержащей 0,25 мМ протокатехоата, бесклеточный экстракт в трис-ацетатном буфере (рН 7,5)

($\lambda = 290$ нм, $\varepsilon = 2870$ М-1 см⁻¹) (Fujisawa, H., Hayaishi, O. Protocatechuate 3,4-dioxygenase. I. Crystallization and characterization // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. No. 10. P. 2673–2681).

Удельную активность ферментов выражали в микромолях потребленного субстрата или образующегося продукта в минуту на 1 мг общего бактериального белка. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по модифицированному методу Бредфорда (Schlömman, M., Schmidt, E., Knackmuss, H.-J. Different types of dienelactone hydrolase in 4-fluorobenzoate-utilizing bacteria // J. Bacteriol. 1990. V. 172. P. 5112–5118).

Все исследованные штаммы проявляли активность пирокатехин -1,2-диоксигеназы (ПК-1,2-ДО) составившую 0.08-0.16 ед./мг, тогда как активность протокатехоат-3,4-диоксигеназы (ПКК-3,4-ДО) в бесклеточных экстрактах штаммов 13BN, 8BN, 7B в 15 раз превышала активность ПК-1,2-ДО. У клеток культуры Fch8 активность протокатехоат -3,4-диоксигеназы не была обнаружена. Активность муконатциклоизомеразы (МЦИ) была также обнаружена только в бесклеточных экстрактах штаммов 13BN, 8BN, 7B и составила в среднем 0.07 ед./мг белка. Активность ферментов пирокатехин-2,3- диоксигеназы (МПК) и гентизат-1,2-диоксигеназы (ГДО) не были обнаружены в бесклеточных экстрактах всех исследуемых штаммов. Также не были обнаружены активности орнитин-декарбоксилазы и триптофандеаминазы.

Таблица № 6. Определение активности (ед/мг белка) потенциальных ферментов деградации ароматических соединений

Штамм	ПК-1,2-ДО	ПК-2,3-ДО	ПКК-3,4-ДО	МЦИ	ГДО
<i>Stenotrophomonas</i> sp. Fch 8	0,086 ± 0,009	0,001 ± 0,001	0	0,006 ± 0,002	0

<i>Pseudomonas</i> sp. 13BN	0,089 ± 0,011	0,002 ± 0,001	1,355 ± 0,121	0,079 ± 0,016	0
<i>Isoptericola</i> sp. 8BN	0,159 ± 0,028	0,009 ± 0,002	1,098 ± 0,025	0,097 ± 0,049	0
<i>Rhodococcus</i> sp. 7B	0,122 ± 0,029	0	2,014 ± 0,185	0,046 ± 0,02	0

Высокая активность фермента ПКК-3,4-ДО может свидетельствовать о том, что процесс деградации фенола идет преимущественно через образование протокатехоата, не характерном для бактерий. Возможна также множественность путей деградации ароматических соединений у бактерий, которые не были адаптированы к росту на целевых субстратах в течение длительного периода.

У штаммов Fch 5,7,8, а также 8BN были обнаружены активности таких ферментов, как бета-галактозидаза и лизиндекарбоксилаза.

3. Биохимические свойства исследуемых штаммов

Биохимические особенности культур определялись с помощью тест систем типа API 32E и 50 CH.

Результаты проведенных исследований приведены в таблице биохимических свойств исследованных культур:

Фермент	7B	8BN	13BN	Fch 7	Fch8	Fch 1	Fch5
Бета-галактозидаза	-	+	-	+	+	-	+
Аргини гидролаза	-	-	+	-	-	-	-
Лизиндекарбоксилаза	-	-	-	-	+	-	+
Уреаза	+	-	-	-	-	-	+
утилизация цитрата	+	-	+	+	+	-	+
Разжижение желатина	-	-	-	-	+	-	+
Восстановление азота	-	-	-	+	+	+	+

Кроме того, было установлено, что выделенные культуры способны к утилизации широкого спектра субстратов.

Утилизация субстратов	7B	8BN	13BN	Fch 7	Fch 8	Fch 1	Fch 5
L-арабиноза	-	+	+	-	-	-	-
D-ксилоза	-	+	+	-	-	-	

							-
D- галактоза	-	+	+	-	-	-	-
D-глюкоза	-	+	-	-	-	-	-
D- фруктоза	+	+	-	-	-	-	-
D-манноза	-	+	+	-	+	-	-
Инозит	+	-	-	-	-	-	-
D-маннит	+	-	-	-	-	-	-
D- сорбит	+	-	-	-	-	-	-
Эскулин	+	+	-	+	+	-	+
N- ацетилглюкозоамин	-	+	-	-	-	-	-
Амигдалин	-	+	-	-	-	+	-
Арубутин	-	+	-	-	-	-	-

Салицин	-	+	-	-	-	-	-
D-целлобиоза	-	+	-	-	-	-	-
D-мальтоза	-	+	-	+	-	-	+
D-лактоза	-	+	-	-	-	-	-
D -мелибиоза	-	+	-	-	-	-	-
D - сахароза	-	+	-	-	-	-	-
D -треголаза	-	+	+	-	-	-	-
D - мелецитоа	-	+	-	-	-	-	-
D - раффиноза	-	+	-	-	-	-	-
Амидон (крахмал)	-	+	-	-	-	-	-
Гликоген	-	-	-	-	-	-	-

Гентиобиоза	-	+	-	-	-	-	-
D- тураноза	-	+	-	-	-	-	-
D -тагатоза	-	-	+	-	-	-	-
D - арабит	+	-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» - реакция отрицательная; «+» - реакция положительная.

Все штаммы показали отрицательную реакцию на активность ферментов орнитиндекарбоксилазы и триптофандеаминаза, продукцию H_2S и индола, реакцию Фогеса-Проскауэра, утилизацию следующих субстратов: глицерин, эритритол, D-арабиноза, D-рибоза, L-ксилоза, D-адонитол, метил- β D-ксилопиранозид, L-сорбоза, L-рамноза, Дульцитол, метил- α D-маннопиранозид, метил- α D-глюкопиранозид, инулин, ксилит, D-ликсоза, D-фукоза, L-фукоза, L-арабит, калия 2-кетоглюконат, калия 5-кетоглюконат.

Практически все исследуемые штаммы утилизировали несколько органических соединений. Исключение составил штамм 8VN, который был способен утилизировать многие из исследуемых субстратов, в том числе N-ацетилглюкозоамин – соединение, являющееся основным компонентом клеточной стенки бактерий. Таким же свойством обладал штамм Fg 1,

который рос на среде с N-ацетилглюкозамином. Этот факт указывает на потенциальную антимикробную активность данных штаммов.

Штаммы Fch 5,7,8 и штамм 8BN синтезировали бета-галактозидазу, два из них Fch 5 и 8, проявляли также лизин – декарбоксилазную активность, а штамм 13 BN – активность аргинингидролазы.

3.1. Потенциальная способность выделенных культур к деструкции ароматических соединений.

Большинство выделенных культур показало способность к утилизации таких субстратов, как бензоат, фенол, нафталин и n-алканы (количество атомов углерода C6-C16). Кроме того, меньшее количество штаммов могли утилизировать бензол и его производные – толуол и этилбензол, а также хлорсодержащие фенолы и бензоаты.

Штаммы Fch 8 и Fch 1 проявили способность к росту на пентахлорфеноле – соединении, которое Стокгольмской конвенцией включено в список стойких органических загрязнителей. А культуры, обозначенные как Fch 5 и Fg1, выделенные из ризосферы растений, растущих в чистой и загрязненной почве, показали способность к деструкции более чем 15 различных соединений, в том числе относящихся к стойким органическим соединениям.

Данные о способности выделенных культур к росту на различных субстратах представлены в Таблице № 7

Таблица №7. Рост выделенных штаммов на целевых субстратах

Штамм	Источник выделения	Субстрат для роста
<i>Stenotrophomonas</i> sp. Fch 5	Ризосфера растений с незагрязненных почв	Капролактam, фенол, бензоат, салицилат, гентизиновая кислота, октан, nonан, декан, гексадекан, додекан, ундекан, 2-хлорфенол, 2,4-дихлорфенол, 2,6-дихлорфенол, 2,4,6-трихлорфенол
<i>Stenotrophomonas</i> sp. Fch 7	Ризосфера растений с незагрязненных почв	Фенол, 2-хлорфенол
<i>Stenotrophomonas</i> sp. Fch 8	Ризосфера растений с незагрязненных почв	Фенол, пентахлорфенол, 2,5-дихлорфенол
<i>Lysinibacillus</i> sp. Fg 1	Ризосфера растений с загрязненных почв	Капролактam, фенол, бензоат, октан, nonан, декан, гексадекан, додекан, ундекан, 2-хлорфенол, 3-хлорфенол, пентахлорфенол, 2,5-дихлорфенол, 2,6-дихлорфенол, 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота, 2,4,6-трихлорфенол, протокатеховая кислота
<i>Pseudomonas</i> sp. 13BN	Загрязненная почва (г. Саратов, «Саратовский нефтеперерабатывающий завод»)	Фенол, декан, ундекан
<i>Isophtericola</i> sp.	Загрязненная почва	Фенол

8BN	(г. Саратов, «Саратовский нефтеперерабатыва ющий завод»)	
<i>Rhodococcus</i> sp. 7B	Незагрязненная почва	Капролактан, фенол, бензоат, октан, нонан, декан, гексадекан, додекан, ундекан

Из выделенных штаммов была сформирована коллекция штаммов-деструкторов фенола. Фенол был выбран для создания коллекции штаммов-деструкторов, так как является наиболее широко распространенным токсичным соединением. Выделенные бактериальные штаммы способны к деградации фенола в концентрации 500 мг/, а также 1 г/л. Данные культуры представляют большой биотехнологический интерес.

Научный и биотехнологический интерес представляет также способность представителей рода *Isoptericola* к разложению целлюлозы и лигнина.

Для выявления способности штамма 8 БН, который идентифицирован как *Isoptericola* sp., к разложению целлюлозы и лигнина, как вещества, характеризующего одревесневшие стенки растительных клеток, были проведены следующие опыты.

Методика проведения эксперимента:

Предварительно измельченная (до 7-8 см в длину) солома была тщательно промыта и помещена в колбы с водопроводной водой, которые в последствии были перемещены в автоклав для

стерилизации при температуре 120 °С на 45 минут. После охлаждения до комнатной температуры в каждую колбу было добавлено по 10 мл соответствующей культуральной жидкости, а именно культуральная жидкость штамма 8 БН и культуральные жидкости штаммов 13С и 14 С (*Bacillus subtilis*), которые использовались при производстве биопрепаратов в качестве штаммов- деструкторов стерни. В одну колбу клетки не вносили (контрольная колба). Сразу после посева, из каждой колбы были отобраны пробы, которые впоследствии были высеяны на плотной питательной среде (ГРМ-агар). Колбы были помещены в термостаты при температуре 32 °С, 42°С и 50 °С. Также были отобраны пробы через 24 и 48 часов инкубации, которые были высеяны на плотной питательной (ГРМ-агар) . Дальнейший подсчет колоний показал, что уже через 24 часа инкубации концентрация клеток штамма 8 БН увеличилась в 3 раза, а наиболее благоприятными температурными условиями для роста данного штамма является температура культивирования равная 42 °С.

Для проверки способности данного штамма к разложению целлюлозы 10мл культуральной жидкости штамма 8 БН были перенесены в колбу с заранее стерильной жидкой средой, состоящей из воды и микрокристаллической целлюлозы, помещенной в чайный пакетик (освобожденный от содержимого). Через 21 день пакетик, содержащий микрокристаллическую целлюлозу, стал чернеть, а через 3,5 месяца практически полностью разложился, тогда как пакетик в контрольной колбе не претерпел никаких изменений, что

свидетельствует о способности штамма 8БН к разложению целлюлозы.

3.2. Условия культивирования и деградативный потенциал штамма 7В

Основываясь на полученных результатах, подтверждающих способность штамма 7В к росту на н-алканах, а также на сравнении деградативной способности данного штамма в отношении нефти и ее компонентов с другими родококками, была проведена дополнительная серия опытов. В отношении штамма 7В, идентифицированного как *Rhodococcus* sp., были проведены дополнительные исследования, направленные на определения оптимальных и наиболее неблагоприятных условий для роста культуры.

Экспериментальным путем были определены минимальные и максимальные температуры, при которых клетки исследуемого штамма сохраняли способность к росту и размножению. Для того, чтобы определить нижнюю и верхнюю границу температурного диапазон, клетки культуры пересевались на чашки Петри с заранее подготовленной стерильной средой (ГРМ-агар) , а также были перенесены в жидкую питательную среду следующего состава, включающую в себя фенол, как единственный источник энергии и углерода.

Для этого использовалась среда (содержащая 100 мг/л фенола), следующего состава, г/л:

Na_2HPO_4 - 0.7;

KH_2PO_4 - 0.5;

NH_4NO_3 - 0.75;

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.2;

MnSO_4 - 0.001;

FeSO_4 - 0.02,

NaHCO_3 - 0.25.

Колбы и чашки были перенесены в три термостата, со следующими температурными режимами: 28,32,37 °C. Через 24 часа на чашках были видны круглые светлые колонии, соответствующие колониям исследуемого штамма. Рост культуры в жидкой питательной среде был определен с помощью Фотометра КФК-5 согласно приложенной к данному аппарату инструкции. После того, как рост культуры был зафиксирован, 10-20 мл культуральной жидкости было перенесено в свежую минеральную среду вышеупомянутого состава, с добавлением фенола в концентрации 100 мг/л, в качестве единственного источника энергии и углерода. При помощи петли был также произведен посев данной культуры на чашки. Колбы и чашки были перенесены в термостаты, с увеличением температурного режима до 42°C, 50°C и 55°C . Кроме того, в каждой серии опытов были поставлены контроли жидкой минеральной среды, а также чашки Петри со стерильной питательной средой (ГРМ- агар). Через 24 часа после посева клеток культуры, на чашках с питательной средой были отчетливо различимы округлые светлые колонии штамма 7В. Рост культуры в жидкой минеральной среде был также зафиксирован с помощью фотометра КФК -5 , а также микроскопированием. Культуральная жидкость и клетки

штамма, выросшие на твердой питательной среде, были окрашены по Грамму.

По аналогичной схеме был проведен опыт, определяющий способность культуры расти при 8 °С.

Кроме того, из каждой колбы с соответствующим температурным режимом, были проведены высевы. На основании полученных при подсчете колоний данных, можно сделать вывод, что наиболее благоприятной для роста клеток штамма 7В является температурный режим: 32 °С.

На основании проведенных экспериментов была определена возможность данного штамма расти в диапазоне следующих температур: от 8°С до 55°С.

Данные по посевам:

1) Образец № 1 7В при 28°С

$$10^5=80$$

$$10^5= 72$$

$$10^5= 112$$

$$10^5= 84$$

Итого: 8,7 млн./мл

2) Образец № 2 7В при 32°С

$$10^5=390$$

$$10^5= 380$$

$$10^5= 420$$

$$10^5= 270$$

Итого:36,5 млн./мл

3) Образец № 3 7В при 42 °С

$$10^5=20$$

$$10^5= 42$$

$$10^5 = 30$$

$$10^5 = 37$$

Итого: 3,225 млн./мл

Следующий опыт был направлен на определение возможности исследуемой культуры расти в условия повышенной солёности питательной жидкости. Для этого был подготовлен концентрат богатой питательной среды следующего состава:

Среда

Были использованы следующие концентрации хлорида натрия: 2%; 5 %; 7,5% и 10 % на л питательной среды. Кроме того, одна колба была поставлена в качестве контрольной (без внесения хлорида натрия).

Методика проведения опыта:

Были приготовлены навески хлорида натрия массой 4,10, 15 и 20 г соответственно указанным выше процентным концентрациям соли в питательной среде.

В мерный цилиндр были поочередно перенесены подготовленные навески, общий объем питательной жидкости был доведен до 200 мл.

Каждый вариант жидкой питательной среды был помещен в колбу и от стерилизован. Таким образом, было подготовлено 5 колб Эрленмейра С объемом питательной среды в 200 мл с соответствующим процентным содержанием хлорида натрия,

одна колба без внесения соли была в качестве контроля. 10-20 мл культуральной жидкости штамма 7 В были перенесены в каждую колбу. Из каждой колбы были отобраны образцы для измерения нулевой пробы. Колбы были перенесены в шейкер – инкубатор с температурным режимом 32 °С . Пробы отбирались через сутки; трое суток; 7 суток; 10 суток; 12 суток. Рост культуры определялся с помощью фотометра КФК -5. Каждая отобранная проба окрашивалась по Грамму для исключения дополнительного инфицирования. Данные, полученные при проведении данного опыта, приведены в таблице.

Таблица №8 Рост штамма 7 В при повышенной солености (тем-ра: 32 °С)

Сутки	Контроль	2%	5%	7,5%	10 %
Исходная ОП	2,17	1,79	1,80	1,91	1,82
1	2,4	2,3	1,69	1,67	1,93
3	2,87	6,52	3,88	3,94	2,39
7	3,87	4,71	3,81	2,55	2,89
10	6,33	5,62	4,81	3,76	3,06

График к Таблице № 8

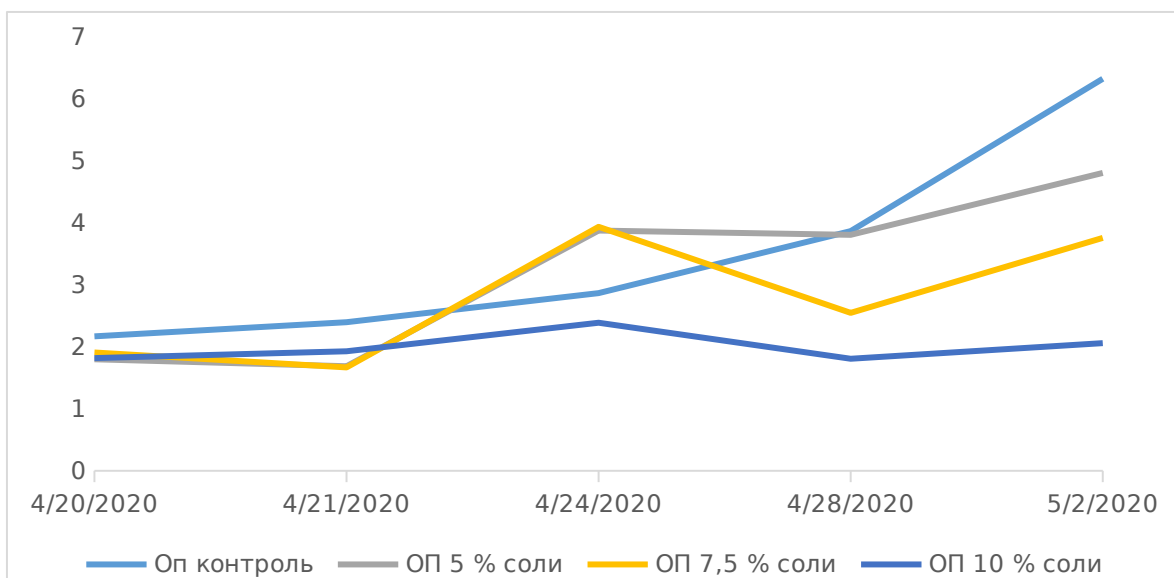


Таблица № 9 Рост штамма 7 В при повышенной солености (Тем-ра: 32 °С)

Сутки	Контроль	5%	7,5%	10 %
Исходная ОП	1,75	2,03	1,2	1,65
1	3,38	1,33	0,86	1,2
3	4,23	4,25	2,22	1,24
7	3,82	4,81	3,46	2,06
10	2,18	5,11	3,18	2,49
12	2,05	4,67	1,73	1,18

График к Таблице № 9

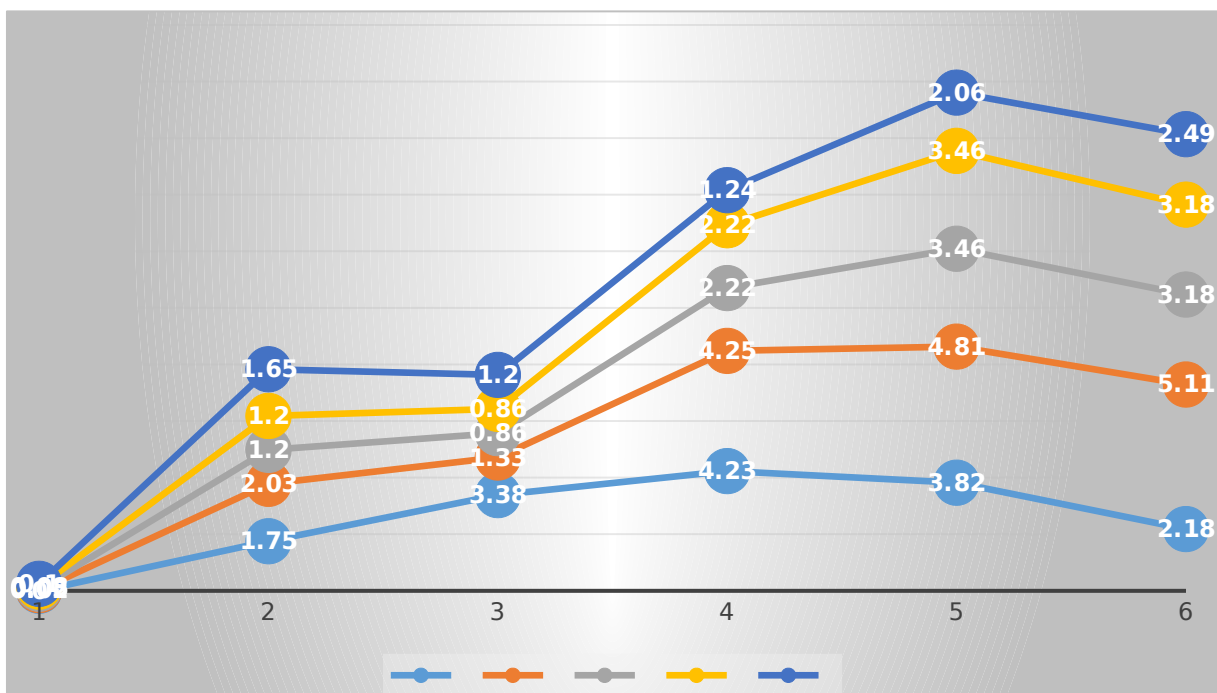


Таблица № 10 Рост штамма 7 В при повышенной солености (Тем-ра: 50 °С)

Сутки	Контроль	2%	5%	7,5%	10 %
Исходная ОП	2,68	1,31	0,95	1,7	2,91
3	3,22	1,14	1,5	2,65	3,04
8	2,78	2,36	2,15	1,92	3,54
12	3,6	2,38	1,87	1,84	3,28
15	3,27	1,34	1,67	2,28	2,67

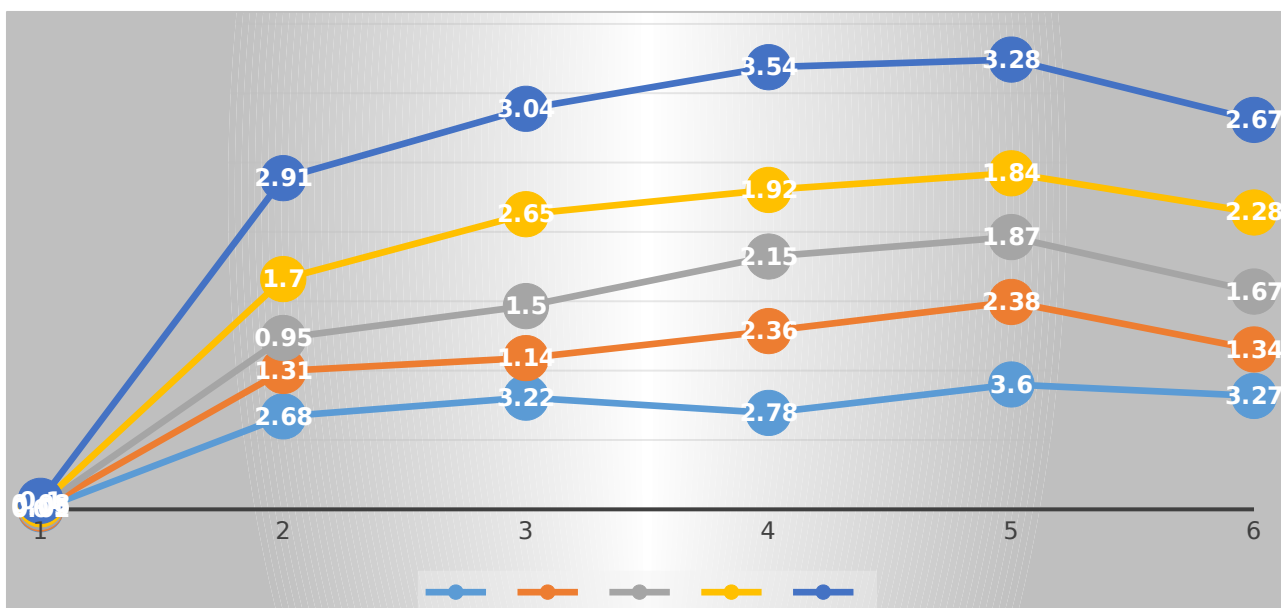


График к Таблице №10

Таким образом, исходя из полученных опытным путем данных, можно утверждать, что штамм 7В проявляет способность к росту при высокой солёности среды не только при 32 °С, но при 50 °С. Данный факт позволяет сделать следующие выводы: Штамм 7В является галлофилом, а по температурному оптимуму относится к мезофилам - микроорганизмам, для которых оптимум роста наблюдается при 25-35 °С, минимум — при 5-10 °С, максимум — при 50-60 °С.

Кроме того, данный штамм был включен в несколько экспериментов, целью, которых являлось определение способности данного штамма к деструкции нефтепродуктов. Для определения процентного содержания, а также степени деструкции нефтепродуктов использовался аппарат КН-2М. Экстракция производилась четыреххлористым углеродом согласно прилагаемой к измерительному прибору инструкции.

Отчеты по экспериментам

Условия проведения эксперимента

В 9 колбах был приготовлен модельный раствор нефти. В каждую колбу было добавлено 10 мл соответствующего анализируемого варианта обработки.

Все колбы были установлены на качалку при комнатной температуре на 10 дней.

Анализ нефтепродуктов проводился по стандартному алгоритму на аппарате КН - 2М.

Полученные результаты:

Контроль:

НП: 133,34 мг/дм³

НП: 134,58 мг/дм³

Образец, обработанный штаммом R-3-2 (светлая колония) :

НП: 73,79 мг/дм³

Деструкция нефтепродуктов = 43 %

Образец, обработанный штаммом R -3-2(розовая колония):

НП: 71,57 мг/дм³

Деструкция нефтепродуктов = 46 %

Образец, обработанный O-539F

НП: 76,82 мг/дм³

Деструкция нефтепродуктов = 42,4 %

Образец, обработанный штаммом 7 В:

НП: 61,87 мг/дм³

Деструкция нефтепродуктов = 53,6 %

Исходя из вышеуказанных данных, полученных опытным путем, можно заключить, что опытный штамм проявляет высокую активность в отношении деструкции нефтепродуктов.

Эксперимент №2

Сравнительный анализ: Препарат-нефтедеструктор, штамм 7В
и препарат Oil Spill Control

Начало опыта: 03.02.2020 г.

Анализ: 14.02.2020 г.

Условия проведения эксперимента

В колбах был приготовлен модельный раствор нефти. В каждую колбу было добавлено 10 мл соответствующего анализируемого варианта обработки.

Все колбы были установлены на качалку при комнатной температуре на

10 дней.

Анализ нефтепродуктов проводился по стандартному алгоритму на аппарате КН - 2М.

Полученные результаты представлены в таблице № 1 и №2

Таблица №1

Контроль (без обработки) - 85,77 мг/дм³

Вариант обработки	Показан ия прибора мг/дм ³	Процент деструкци и
Препарат - нефтедеструк тор, состоящий из 5 штаммов	26,22	69 %
7В	36,22	57,8%
Oil Control (ПАВ+ КЖ)	8,03	91 %

Заключение: наибольшую активность в отношении деструкции нефтепродуктов проявил препарат Oil Control - 91 %.

Данный препарат содержит ПАВ, что и обеспечивает такой высокий процент деструкции, так как титр (живые клетки микроорганизмов) составляет всего около 300 млн., тогда как в препарате « Нефтедеструктор» - более 20 млрд. Кроме того, щелочная среда данного препарата (РН =11,7) не пригодна для большинства известных бактерий - нефтедеструкторов.

Визуально, данный препарат проявляет все качества препарата, содержащего высокий процент ПАВ.

Путем высева из препарата Oil Control выделено два вида бактерий, Грам+ , спорообразующих , скорее всего относящихся к роду Bacillus.

В следующий опыт был также включен штамм 8БН. А целью опыта являлось определение возможности исследуемых штаммов к деструкции нефтепродуктов в консорциуме с другими микроорганизмами.

Таблица №2

Начало опыта: 29.01.2020 г

Анализ: 07.02.2020 г.

Контроль (без обработки) - 177,43 мг/дм³

Вариант обработки	Показания прибора (мг/дм ³)	Процент деструкции
Штамм1+Штамм2	105,75	40%
8 БН	136,59	23,02 %
7Б+Штамм 1	78,25	56 %
7Б+Штамм 2	73,24	58,7 %

Заключение: опытным путем показано, что включение штамма 7Б к штаммам, составляющим основу препарата-нефтедеструктора усиливает деструкцию нефтепродуктов, и обеспечивает более эффективное процентное снижение их общего содержания (с 40% до 58,7 %), а штамм 8 БН также проявляет способность к деструкции нефтепродуктов , хотя и не особенно высокую.

Опыт № 3

Начало опыта: 21.02.2020 г

Дата измерения: 28.02.2020 г

06.03.2020г.

Кратность обработки: 2

Образец № 1 «Саратов»: Образец черного цвета с резким запахом нефтепродуктов.

Образец №2 «Саратов»: Образец черного цвета, по консистенции ближе к гудрону с резким запахом нефтепродуктов.

Содержание нефтепродуктов:

Содержание нефтепродуктов определялось:

- на аппарате КН-2М;

Показание прибора КН -2М:

Образец №1: (разбавление 1/100)

НП: 214,15мг/дм³

НП: 189,80 мг/дм³

НП Ср.41%

**Измерения проведенные после обработки штаммом 7В
через 7/ 15 дней :**

НП: 177,18мг/дм³

НП: 111,93 мг/дм³

Деструкция нефтепродуктов = 44,5 %

Образец №2 : Контрольное содержание :

НП: 168,11мг/дм³ СР НП: 29 %

НП:121,24мг/дм³

Измерения проведенные после обработки штаммом 7В через 7/ 15 дней :

НП: 80,41 мг/дм³

Деструкция нефтепродуктов (через 7 дней) = 44,4%

НП: 52,35 мг/дм³

Деструкция нефтепродуктов (через 15 дней)= 63,8 %

Опыт № 4

Образцы получены из Кувейта

Образец № 1: Образец, состоящий из песка и прессованных кусков, прослоенных темной слюдовой массой.

Специфического запаха почти не имеет. Кроме того, в образце обнаруживаются белые и серые кристаллы.

Образец №2: Образец черного цвета, прессованный, с неярко выраженным запахом нефтепродуктов, трудно отделим от общей массы.

Образец №3: Образец темно-коричневого цвета, с примесью воды со средне выраженным запахом нефтепродуктов, обладает неоднородной структурой, в составе присутствует песок.

Образец №4: Образец от темно серого до светло –зеленого цвета, с ярко выраженным запахом нефтепродуктов. Твердый по консистенции, в емкости образует отвердевший слой.

Образец №5: Образец черного цвета, с ярко выраженным запахом нефтепродуктов, заслюдован, предположительно состоит из тяжелых фракций нефти.

Начало : 24.04.2020г.

Измерения : 04.05.2020 г. (через 10 дней)

Температурный режим - 45 °С

Варианты обработок:

- 1. Культуральная жидкость штамма 7 В**
- 2. Смесь культуральной жидкости штамма 7 В + препарат-нефтедеструктор**
- 3. Культуральная жидкость смеси штаммов, выделенных из препарата Oil Spill Control**

Содержание нефтепродуктов:

Содержание нефтепродуктов определялось:

- на аппарате КН-2М;

Показание прибора КН -2М:

	«Нефтедеструктор» + 7 В	7В	КЖ Oil Spill Control
	34,28 мг/дм ³	33,68 мг/дм ³	58,28 мг/дм ³
С (%)	63,7	64,3	38

Образец №1: (разбавление 1/100)

Контроль НП: 95,18 мг/дм³

Контроль 2 -94,405 мг/дм³

Предыдущие эксперименты при 32 градусах – наилучший результат – 61 %

Исходя из вышеприведённых в таблице данных, в отношении первого образца наибольший процент деструкции достигнут при использовании препарата с добавлением КЖ 7 Б.

Образец №2:

Контроль НП: 165,64мг/дм³ Контроль 2 -156,5 мг/дм³

	«Нефтедеструктор» + 7 В	7В	КЖ Oil Spill Control
	98,45 мг/дм ³	113, 73 мг/ дм ³	137, 52 мг/ дм ³
С (%)	37	27	12,1 2

Образец №3:

Контроль НП: 95,24 мг/дм³

	«Нефтедеструктор» + 7В	7В	КЖ Oil Spill Control
	16,93мг/дм ³	11,68 мг/дм ³	64,28 мг/дм ³
С (%)	82,2	87,7	32,5

Наибольший процент деструкции достигнут после обработки образца штаммом 7 В, а также смесью препарата-нефтедеструктора и культуральной жидкости штамма 7 В.

Образец №4:

В отношении образца 4, как и в предыдущих экспериментах, деструкции не наблюдается. Кроме того, значительно разнятся показания прибора, в следствии неравномерной концентрации нефтепродуктов в образце.

Образец №5:

НП: 277,50 мг/дм³

Контроль НП: 266,5 мг/дм³

	«Нефтедеструктор» + 7 В	7В	КЖ Oil Spill Control
	113,47мг/дм ³	168, 34 мг/ дм ³	259, 7 мг/ дм ³
С (%)	57,4	38	3

Опыт №5

Опыт поставлен на модельном растворе нефти, полученной с НПЗ

«Капотня». В 6 колб, объемом 500 мл было помещено 198 мл воды и 2 мл нефти и 10 мл культуральной жидкости штамма 7 В. В две колбы клетки штамма не вносились (контрольные колбы). Одна контрольная колба и две обработанные колбы были помещены в термостат при температурном режиме 32 °С , оставшаяся контрольная колба и две обработанные были установлены в термостат при 50°С.

Начало эксперимента: 14.04.2020 г.

Дата проведения измерений: 28.04.2020 г. И 14.05.2020 г.

Содержание нефтепродуктов определялось:

- на аппарате КН-2М;

Показание прибора КН -2М:

Контроль НП: 81,46 мг/дм³ Контроль 2 – 82,34 мг/дм³

	7В (ч/з1 4 дней) при 50°С.	7В (ч/з 30 дней) при 50°С.	7В (ч/з 8 дней) при 32°С.	7В (ч/з 14 дней) при 32°С.
	61,93 мг/ дм ³	50,88 мг/ дм ³ 40,98 мг/ дм ³	47,53 мг/ дм ³	40,08 мг/ дм ³
Процент деструкции и нефти (%)	24	44	41	51

Полученные в ходе экспериментов данные, в очередной раз подтверждают способность штамма 7В к деструкции нефтепродуктов. Данные эксперименты наглядно демонстрируют высокую

результативность данного штамма в отношении нефти и нефтешламов в разных температурных условиях, что, безусловно, представляет большой биотехнологический интерес.

Кроме того, опытным путем была подтверждена способность данного штамма к росту на дизельном топливе и моторном масле.

В связи с тем, что штамм 7В имеет способность к росту при повышенных температурах, был проведен эксперимент на определение возможной токсичности данного штамма. Методика основана на определении смертности дафний при воздействии токсических веществ, присутствующих в исследуемой пробе, по сравнению с контрольной культурой в среде, не содержащей токсических веществ. Количество живых и мертвых дафний определяется методом прямого счета.

Острое токсическое действие исследуемого образца на дафний устанавливается по их смертности (летальности) за определенный период экспозиции (в ходе данного эксперимента – 72 часа). Критерием острой токсичности служит гибель 50% и более дафний за 48 часов в исследуемой пробе при условии, что в контрольном эксперименте все рачки сохраняют жизнеспособность (МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ КОЛИЧЕСТВА *Daphnia magna* Straus ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ПИТЬЕВЫХ, ПРЕСНЫХ ПРИРОДНЫХ И СТОЧНЫХ ВОД, ВОДНЫХ ВЫТЯЖЕК ИЗ ГРУНТОВ, ПОЧВ, ОСАДКОВ СТОЧНЫХ ВОД, ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА И ПОТРЕБЛЕНИЯ МЕТОДОМ ПРЯМОГО СЧЕТА ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.12-06 Т 16.1:2:2.3:3.9-06).

По итогам проведенного эксперимента, заключено, что клетки штамма 7В не являются продуцентами токсических веществ, так как выживаемость участвующих в эксперименте дафний оказалась 100 %.

3.3. Биотехнологический потенциал штаммов - деструкторов ароматических соединений.

Наиболее безопасным и экономически выгодным способом очистки окружающей среды от фенола и его производных является бактериологическая очистка штаммами-деструкторами этих и иных токсических соединений.

Работами многих исследователей установлена последовательность разрушения фенола микроорганизмами и выделены образующиеся при этом промежуточные продукты. Биохимическое окисление фенола идет стадийно через пирокатехин, цис-цис-муконовую кислоту, лактон, б - кетоадипиновую кислоту, янтарную кислоту, уксусную кислоту. Конечными продуктами биохимического окисления фенола являются CO_2 и H_2O (Поруцкий Г.В. Биохимическая очистка сточных вод.- М.,1975 г. С.187)

Эффективность биохимической очистки зависит от ряда факторов, основными из которых являются: температура, реакция среды (рН), кислородный режим, наличие биогенных элементов и токсичных веществ, уровень питания микроорганизмов.

Экспериментальным путем было определено, что для всех исследуемых в данной работе бактерий- деструкторов фенола,

наиболее благоприятными для роста и размножения являются следующие условия среды:

- температурный диапазон 28-32 °С ;

- рН 6,0-7,5.

В данной работе было установлено, что все выделенные штаммы способны к росту и развитию в оптимальном для деструкции ароматических соединений температурном режиме и при оптимальном уровне РН.

С применением биохимических тест систем для представителей родов *Stenotrophomonas* и *Isophtericola* качественно было показано наличие активности бета-галактозидазы и лизиндекарбоксилазы. Упомянутые ферменты получают в промышленности в том числе с помощью микроорганизмов , поэтому исследуемые штаммы могут быть применены как источник этих ферментов.

Штамм Fg 1 способен к утилизации N-ацетилглюкозамина - основного компонента клеточной стенки . Так как штамм Fg 1 является спорообразующей бактерией и способен к выживанию в неблагоприятных условиях, сохраняясь в виде спор, он может быть транспортирован в сухом виде, поэтому является перспективным при создании биопрепаратов.

Штаммы Fch 8 и штамм Fg 1, способные утилизировать пентахлорфенол – это соединение, относящееся к СОЗ, являются потенциально значимыми для создания биопрепаратов для очистки территорий, подвергшийся воздействию СОЗ.

Штамм 7В проявил высокую способность к деструкции нефтепродуктов, фенола и его производных при высоких температурах и повышенной солёности, что является основанием для использования этого штамма в качестве основы для перспективного биопрепарата – деструктора органических соединений.

Солома злаковых является побочным продуктом сельского хозяйства, который образуется после удаления зерен и полосты (Т. S. Khan, U. Mubeen, Current Research Journal of Biological Sciences, №4, p. 673-675 (2012)). Основными технологическими характеристиками соломы являются насыпная плотность, угол естественного откоса и максимальная степень поглощения жидкости. Солома злаковых культур обладает сравнительно низкой по отношению к другим вторичным ресурсам сельского хозяйства насыпной плотностью (Холькин Ю. И. Технология гидролизных производств / Ю. И. Холькин. – М.: Лесная промышленность, 1989. – 490 с.)

Основными компонентами клеточной стенки ксилемы злаковых являются целлюлоза, связующие гликаны и лигнин.

Химический состав соломы может меняться в зависимости от почвенно- климатических условий и сорта соломы. Об этом свидетельствуют данные о химическом составе соломы злаковых культур, представленные в литературе (Сушкова В. И. Безотходная конверсия растительного сырья в биологически активные вещества / В. И. Сушкова, Г. И. Воробьёва. – Киров: ДеЛи принт, 2007. – 204с. 7. Billa E. Structural Variability of Lignins and Associated Phenolic Acids in Wheat Straw / E. Billa, B. Monties //Cellulose Chemistry and Technology. – 1995. – №29. – p. 305-314.).

Штамм 8BN кроме указанных субстратов, проявил высокую целлюлазную активность, что определяет данный штамм как штамм- деструктор пожнивных остатков. Данное направление в сельском хозяйстве является очень перспективным, так как остатки соломы после уборки пшеницы создают неблагоприятные условия для нового засева зерновых, а увеличение скорости разложения пожнивных остатков позволит ускорить формирования гумуса в сельскохозяйственных землях, что в свою очередь снизит процент внесения органических удобрений.

Для выявления способности штамма 8 БН к разложению целлюлозы и лигнина, как вещества, характеризующего одревесневшие стенки растительных клеток, были проведены дополнительные опыты. Солома злаковых культур содержит значительное количество лигнина (11,5-30,0%), сопоставимое с лиственной древесиной (19-24%). Сравнительное изучение строения лигнинов соломы пшеницы, ржи, овса и ячменя позволило установить, что они относятся к композиционно неоднородным биополимерам и отличаются от лигнинов лиственной древесины (Л. С. Кочева, М. Ф. Борисенков, А. П. Карманов, В. П. Мишуров, Л. В. Спирихин, Ю. Б. Монаков, Журнал прикладной химии, № 8, Т. 78, С. 1367-1374 (2005)).

Проведенные опыты подтверждают способность штамма 8 БН к разложению целлюлозы и лигнина. Также методом высева был определен температурный режим, при котором клетки исследуемого штамма сохраняли способность к росту и размножению. Установлено, что таким температурным диапазоном является температура от 28 до 50 °С.

В целом, можно отметить, что каждый из выделенных и в последствии изученных штаммов несет не только теоретический, но и прикладной характер, не исключая возможности создания серии биопрепаратов на их основе.

Заключение

Масштабы загрязнения почв токсичными соединениями возрастают год от года. Это могут быть как природные соединения (нефтепродукты, ароматические углеводороды, *n*-алканы), так и антропогенные вещества (ϵ -капролактамы, хлорсодержащие пестициды, полихлорированные бифенилы и т.д.), поступающие в окружающую среду в результате хозяйственной деятельности человека. Органические загрязнители обладают высокой токсичностью, устойчивы к разрушению в естественных условиях, плохо растворимы в воде и способны накапливаться в почвах и живых организмах .

Важнейшая роль в очистке окружающей среды, в том числе, биоремедиации загрязненных почв принадлежит микроорганизмам различных таксономических групп, которые способны полностью разлагать токсичные поллютанты или трансформировать их до безопасных и легко утилизируемых субстратов. В связи с этим всестороннее изучение микроорганизмов-деструкторов является перспективным направлением исследований. В данной работе была характеристика новых штаммов почвенных бактерий, способных утилизировать токсичные органические соединения в качестве единственных источников углерода и энергии и оценка перспектив их использования для биоремедиации загрязненных поллютантами почв.

По российским данным фенол относится ко 2-му классу опасности отходов производства и потребления (степень вредного воздействия опасных отходов на окружающую природную среду считается высокоопасной). Проблема очистки воздушного бассейна, производственных стоков от фенола является одной из наиболее важных и одновременно трудно решаемых. Несмотря на наличие многочисленных разработок по очистке окружающей среды от загрязнения фенолом данную проблему нельзя считать решенной. Следует отметить, что при переработке нефти с достаточно высокой концентрацией образуются токсичные вещества, в том числе летучие фенолы. В настоящее время активно используются микроорганизмы-деструкторы фенола, хочется надеяться, что проблема загрязнения окружающей среды фенолом и его производными перестанет быть такой актуальной.

В данной работе освещены возможности применения микроорганизмов для деструкции и утилизации ряда различных токсикантов, включая такие, которые отнесены к СОЗ, а также способность исследуемых штаммов расти более чем на 15 субстратах. Кроме того, было для представителя рода *Isoptericola* была впервые описана одновременная активность ПК-1,2-ДО и ПКК-3,4- ДО. Показаны активности целого ряда ферментов. Высокая активность фермента ПКК-3,4-ДО может свидетельствовать о том, что процесс деградации фенола идет преимущественно через образование протокатехоата, не характерном для бактерий.

Обобщая все полученные в ходе исследовательской работы, можно сделать следующие выводы, свидетельствующие о

реализации задач поставленных перед автором данной выпускной квалификационной работы. А именно:

- из 81 анализируемой культуры отобрано 11 штаммов, способных к деструкции фенола в концентрации 500 мг/л и 1 г/л;

- проведена идентификация культур. Определено, что исследуемые культуры относятся к разным филогенетическим группам:

Грамотрицательные-*Stenotrophomonas* sp.- Fch 5, Fch 7, Fch 8

Pseudomonas - 13BN

Грамположительные - *Rhodococcus* sp.- 7B , *Lysinibacillus* sp.- Fg 1

Isoptericola sp. - 8BN

- определена активность ключевых ферментов пути разложения фенола. Все исследованные штаммы проявляли активность пирокатехин -1,2-диоксигеназы (ПК-1,2-ДО) составившую 0.08-0.16 ед./мг, тогда как активность протокатехоат-3,4-диоксигеназы (ПКК-3,4-ДО) в бесклеточных экстрактах штаммов 13BN, 8BN, 7B в 15 раз превышала активность ПК-1,2-ДО. У клеток культуры Fch8 активность протокатехоат -3,4-диоксигеназы не была обнаружена. Активность муконатциклоизомераза (МЦИ) была также обнаружена только в бесклеточных экстрактах штаммов 13BN, 8BN, 7B и составила в среднем 0.07 ед./мг белка;

- определены оптимальные и наиболее неблагоприятные условия для культивирования отобранных бактерий;

- выявлена способность данных культур к деструкции иных поллютантов ;

Большинство выделенных культур показало способность к утилизации таких субстратов, как бензоат, фенол, нафталин и н-алканы (количество атомов углерода C6-C16). Кроме того, меньшее количество штаммов могли утилизировать бензол и его производные – толуол и этилбензол, а также хлорсодержащие фенолы и бензоаты.

Штаммы Fch 8 и Fch 1 проявили способность к росту на пентахлорфеноле – соединении, которое Стокгольмской конвенцией включено в список стойких органических загрязнителей. А культуры, обозначенные как Fch 5 и Fg1, выделенные из ризосферы растений, растущих в чистой и загрязненной почве, показали способность к деструкции более чем 15 различных соединений, в том числе относящихся к стойким органическим соединениям.

Штамм 7В проявил высокую способность к росту на феноле, нефти, дизельном топливе и моторном масле, а также к деструкции этих соединений.

- определен биотехнологический потенциал отобранных культур.

Список использованной литературы:

1. Аннагиев М.Х. Адсорбенты на основе природных цеолитов в процессах адсорбции различных газов и паров. Монография. Баку. Элм, 1997.
2. Андрианов, К. А. Кремнийорганические соединения / К.А. Андрианов. - М.: Государственное научно-техническое издательство химической литературы, 1992. - 520 с.
3. Annagiev M.Kh., Alieva S.G., Kuliev T.N. Purification of the waste lignit hydrocarbons using cation exchanged forms of clinoptilolite// *Stnd. surf. scien. catal.*, 2001; 135: 5170-5186.
4. *Ahmad, S., M. Syed, N. Arif, M. Shukor, N. Shamaan.* Isolation, identification and characterization of elevated phenol degrading *Acinetobacter* sp. strain // *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 2011. V. 5. P. 1035-1045.
5. *Ahmad V., Iqbal A.N., Haseeb M., Khan M.S.* Antimicrobial potential of bacteriocin producing *Lysinibacillus* jx416856 against foodborne bacterial and fungal pathogens, isolated from fruits and vegetable waste // *Anaerobe.* 2014. V. 27. P. 87-95. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.04.001
6. *Bakalidou A., Kämpfer P., Berchtold M., Kuhnigk T., Wenzel M., König H.* *Cellulosimicrobium variabile* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the hindgut of the termite *Mastotermes darwiniensis* // *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002. V. 52. Pt 4. P.1185-1192.
7. Bonfá M.R., Grossman M.J., Piubeli F., Mellado E., Durrant L.R. Phenol degradation by halophilic bacteria isolated from hypersaline environments // *Biodegradation.* 2013. V. 24. No. 5. P. 699-709. doi: 10.1007/s10532-012-9617-y.

8. Башлай З.И. Оборудование цехов улавливания и переработки продуктов коксования / З.И. Башлай, Е.Л. Волков, Я.Л. Горелик. - М.: Металлургия, 1992. - 255с.
9. Барабой, В. А. Растительные фенолы и здоровье человека / В.А. Барабой. - М.: Наука, 1984. - 160 с.
10. Billa E. Structural Variability of Lignins and Associated Phenolic Acids in Wheat Straw / E. Billa, B. Monties //Cellulose Chemistry and Technology. - 1995. - №29. - р. 305-314
11. Бутлеров, А. Введение к полному изучению органической химии / А. Бутлеров. - М.: ЁЁ Медиа, 1979. - 457 с.
12. Вайбело С. Идентификация органических соединений / С. Вайбело. - М.: Издательство иностранной литературы, 2010. - 342
13. Д.А. Малинович. Халькогенорганические производные азотсодержащих гетероциклов: моногр. / Д.А. Малинович, В.А. Потапов, С.В.Амосова. - М.: LAP Lambert Academic Publishing, 2014. - 108 с.
14. Двадненко М.В., Маджигатов Р.В., Ракитянский Н.А. ВОЗДЕЙСТВИЕ НЕФТИ НА ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ // Международный журнал экспериментального образования. - 2017. - № 3-1. - С. 89-90;
URL: <http://www.expeducation.ru/ru/article/view?id=11244>
15. Crawford, R.L., Hutton, S.W., Chapman, P.J. Purification and properties of gentisate 1,2-dioxygenase from *Moraxella osloensis* // J. Bacteriol. 1975. V. 121. No. 3. P. 794-799.

16. Chandana Lakshmi M.V.V., Sridevi V. A review on biodegradation of phenol from industrial effluents // Jr. of Industrial Pollution Control. 2009. V. 25. No. 1. P. 13-27.
17. Chang Soo Lee, Yong-Taek Jung, Sooyeon Park, Tae-Kwang Oh, and Jung-Hoon Yoon *Lysinibacillus xylanilyticus* sp. nov., a xylandegrading bacterium isolated from forest humus // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 281-286
18. Erko Stackebrandt, Peter Schumann and Xiao-Long Cui Reclassification of *Cellulosimicrobium variabile* Bakalidou et al. 2002 as *Isoptericola variabilis* gen. nov., comb. nov. // International J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 685-688.
19. Geng A., Soh A. E.W., Lim C.J., Loke L.C.T. Isolation and characterization of a phenol-degrading bacterium from an industrial activated sludge // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 71. P. 728-735. DOI 10.1007/s00253-005-0199-z
20. Grund E., Knorr C., Eichenlaub R. Catabolism of benzoate and monohydroxylated benzoates by *Amycolatopsis* and *Streptomyces* spp. // Appl. Environ. Microbiol. 1990. V. 56. P. 1459-1464.
21. Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина. 1959-1984 / Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry: 1959-1984. - М.: Академия наук СССР, 1984. С.530.
22. Карелин Я.А., Попова И.А., Евсеева Л.А. Очистка сточных вод нефтеперерабатывающих заводов. М., Стройиздат. 1982.
23. Kaur N., Rajendran M.K., Kaur G., Shanmugam M. *Isoptericola rhizophila* sp. nov., a novel actinobacterium

- isolated from rhizosphere soil // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2014 V. 106(2). P. 301–307.
24. Л. С. Кочева, М. Ф. Борисенков, А. П. Карманов, В. П. Мишуров, Л. В. Спирихин, Ю. Б. Монаков, *Журнал прикладной химии*, № 8, Т. 78, С. 1367–1374 (2005).
25. *Kim Y.H., Cho K., Yun S.-H., Kim J.Y., Kwon, K.-H., Yoo J.S., Kim S.I.* Analysis of aromatic catabolic pathways in *Pseudomonas putida* KT 2440 using a combined proteomic approach: 2-DE/MS and cleavable isotope-coded affinity tag analysis // *Proteomics*. 2006. V. 6.P. 1301–1318.
26. Kotresha D., Vidyasagar G. M. Degradation of phenol by novel strain *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 4997 isolated from petrochemical industrial effluent // *International Journal of Microbial Resource Technology*. ISSN 2278 – 3822. 2014. Vol. 2. No. 3. P. 1-15.
27. T. S. Khan, U. Mubeen, *Current Research Journal of Biological Sciences*, №4, p. 673–675 (2012).
28. Лазорин С.Н. Обезвреживание отходов коксохимического производства / С.Н. Лазорин, Г.Л. Папков, В.И. Литвиненко. - М.: Металлургия, 1977. - 165с.
29. *Lee D.W., Lee H., Kwon B.O., Khim J.S., Yim U.H., Kim B.S., Kim J.J.* Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment // *Environ Pollut*. 2018 V. 241:254-264
30. *Международный журнал экспериментального образования*. - 2017. - № 3 (часть 1) - С. 89-90.
31. *Mulla Azmatunnisa Begum, Kamidi Rahul, Chintalapati Sasikala, Chintalapati Venkata Ramana Lysinibacillus xyleni*

- sp. nov., isolated from a bottle of xylene // Arch. Microbiol. 2016. V. 198. P. 325–332 doi: 10.1007/s00203-016-1194-8
32. *Mazzoli R., Pessione E., Giuffrida M.G., Fattori P., Barello C., Giunta C., Lindley N.D.* Degradation of aromatic compounds by *Acinetobacter radioresistens* S13: growth characteristics on single substrates and mixtures // Arch. Microbiol. 2007. V. 188. P. 55–68. DOI 10.1007/s00203-007-0223-z
33. МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ КОЛИЧЕСТВА *Daphnia magna* Straus ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ПИТЬЕВЫХ, ПРЕСНЫХ ПРИРОДНЫХ И СТОЧНЫХ ВОД, ВОДНЫХ ВЫТЯЖЕК ИЗ ГРУНТОВ, ПОЧВ, ОСАДКОВ СТОЧНЫХ ВОД, ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА И ПОТРЕБЛЕНИЯ МЕТОДОМ ПРЯМОГО СЧЕТА ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.12-06 Т 16.1:2:2.3:3.9-06
34. Наглядное пособие. Химические свойства спиртов и фенолов. - М.: Дрофа, 2007. - 282 с.
35. *Nešvera J., Rucká L., Pátek M.* Catabolism of phenol and its derivatives in bacteria: genes, their regulation, and use in the biodegradation of toxic pollutants // Advances in Applied Microbiology. 2015. V. 93. P. 107-160.
<http://dx.doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.06.002>
36. Нугуманова, Г. Алкилирование фенола олефинами как метод синтеза стабилизаторов для полимеров / Г. Нугуманова. - М.: Бибком, 2013. С.430.
37. Общая экология: Учеб. / Под ред. А. С. Степановских. - М.: ЮНИТИ, 2000. 510с.
38. Орлов Д.С. Экология и охрана биосферы при химическом загрязнении: Учеб. пособие / Орлов Д.С,

- Садовникова Л.К., Лозановская И.Н. - М.: Высшая школа, 2002. - 334с.
39. Park S.H., Kim J.W., Yun S.H., Leem S.H., Kahng H.Y., Kim S.I. Characterization of β -ketoacid pathway from multi-drug resistance bacterium, *Acinetobacter baumannii* DU202 by proteomic approach // J. Microbiol. 2006. V. 44. P. 632-640.
40. Polivtseva, V.N., Anokhina, T.O., Iminova, L.R. *et al.* Evaluation of the Biotechnological Potential of New Bacterial Strains Capable of Phenol Degradation. *Appl Biochem Microbiol* 56, 298-305 (2020). Evaluation of the Biotechnological Potential of New Bacterial Strains Capable of Phenol Degradation
41. Patrauchan M.A., Florizone C., Dosanjh M., Mohn W.W., Davies J., Eltis L.D. Catabolism of benzoate and phthalate in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: redundancies and convergence // J. Bacteriol., 2005. V. 187. P. 4050-4063.
42. Поруцкий Г.В. Биохимическая очистка сточных вод. - М., 1975 г. С.187
43. Проскуряков В.А. Очистка сточных вод в химической промышленности / В.А. Проскуряков. Л.И. Шмидт. - М. - Л.: Химия, 1977. - 464 с.
44. Пыриков А.Н. Защита окружающей среды на коксохимических предприятиях / А.Н. Пыриков, С.К. Васнин, Б.Н. Баранбаев. - М.: Интермет - инжиниринг, 2000. - 176 с.
45. Родионов А.И., Техника защиты окружающей среды / А.И. Родионов, Н.С. Торочешников. - М.: Химия, 1989. - 325с.

46. Szókö J., Rucká L., Šimčíková M., Halada P., Nešvera J., Pátek M. Induction and carbon catabolite repression of phenol degradation genes in *Rhodococcus erythropolis* and *Rhodococcus jostii* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 98. P. 8267–8279. DOI 10.1007/s00253-014-5881-5886.
47. Schlömann, M., Schmidt, E., Knackmuss, H.-J. Different types of diene lactone hydrolase in 4-fluorobenzoate-utilizing bacteria // *J. Bacteriol.* 1990. V. 172. P. 5112–5118.
48. Singh N., Kumari A., Balomajumder C. Modeling studies on mono and binary component biosorption of phenol and cyanide from aqueous solution onto activated carbon derived from saw dust // *Saudi J. Biol. Sci.* 2018. V. 25. No. 7. P. 1454–1467. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.01.007.
49. Сушкова В. И. Безотходная конверсия растительного сырья в биологически активные вещества / В. И. Сушкова, Г. И. Воробьева. – Киров: ДеЛи принт, 2007. – 204с.
50. Теория молекулярных орбиталей в органической химии / М. Дьюар. - М.: Мир, 1982. - 592 с.
51. Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucleic Acids Res.* 1994. V. 22. No. 22. P. 4673-4680.
52. Fujisawa, H., Hayaishi, O. Protocatechuate 3,4-dioxygenase. I. Crystallization and characterization // *J. Biol. Chem.* 1968. V. 243. No. 10. P. 2673–2681.
53. Hegeman, G.D. Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. I. Synthesis of

- enzymes by the wild type // J. Bacteriol. 1966. V. 91. P. 1140-1154.
54. Zhai Z., Wang H. Yan S., Yao J. Biodegradation of phenol at high concentration by a novel bacterium: *Gulosibacter* sp. YZ4 // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2012. V. 87. P. 105-111.
55. Zhu X., Tian J., Chen L. Phenol degradation by isolated bacterial strains: kinetics study and application in coking wastewater treatment // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2012. V. 87. P. 123-129. DOI 10.1002/jctb.2691
56. Weisburg W.G, Barns S.M, Pelletier D.A, Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991. V. 173. No. 2. P. 697-703.
57. Wang Q., Zhang S., Li Y., Klassen W. Potential approaches to improving biodegradation of hydrocarbons for bioremediation of crude oil pollution // Journal of Environmental Protection. 2011. N 2. P. 47-55.
58. Характеристики углеводородов. Анализ численных данных и их рекомендованные значения. Справочное издание / Ю.А. Лебедев и др. - М.: Ленанд, 2012. - 560 с.
59. Холькин Ю. И. Технология гидролизных производств / Ю. И. Холькин. - М.: Лесная промышленность, 1989. - 490 с.
60. Источник: <http://naukarus.com/razlozhenie-fenola-shtammom-rhodococcus-opacus-1g>