

# ЛИТЕРАТУРА

1. *Кузнецов А.Е.* Научные основы экобиотехнологии. Учеб. пособие для студентов / А.Е. Кузнецов, Н.Б. Градова. – М.: Мир, 2006.
2. Прикладная экобиотехнология: учеб. пособие: в 2 т. / А.Е. Кузнецов [и др.]. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010.
3. *Волова Т.Г.* Экологическая биотехнология: учеб. пособие для университетов / Т.Г. Волова. – Новосибирск: Хронограф, 1997.
4. *Волова, Т.Г.* Биотехнология / Т.Г. Волова. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2002.
5. *Ляшенко О.А.* Биоиндикация и биотестирование в охране окружающей среды: учеб. пособие / О.А. Ляшенко. – Спб, 2012.
6. Экологическая биотехнология / под ред. К. Форстера, Д. Вейза. – Л.: Химия, 1990.
7. *Glazer A.N.* Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology / A.N. Glazer, H. Nikaido. – Cambridge University Press, 2007.

## ЛЕКЦИИ 3-4

# ЗАГРЯЗНЕНИЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ. БИОИНДИКАЦИЯ И БИОТЕСТИРОВАНИЕ.

1. Типы загрязнения окружающей среды
2. Ксенобиотики. Биодоступность ксенобиотиков.
3. Биodeградация ксенобиотиков.



# ЗАГРЯЗНЕНИЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

– процесс привнесения в окружающую среду или возникновения в ней новых, обычно не характерных для неё, химических, физических и биологических агентов, оказывающих негативное воздействие.

## Типы загрязнений:

- *физическое* (радиация, электромагнитное излучение);
- *химическое* (аэрозоли, тяжелые металлы);
- *механическое* (пыль в атмосфере, строительный мусор);
- *биологическое* (микроорганизмы, растения и животные).

## Источники загрязнений:

- *природные* (ветровая пыль, лесные пожары, вулканический материал);
- *антропогенные* (производство цветных металлов, стали, чугуна, железа; добыча полезных ископаемых; автомобильный транспорт; химическая промышленность; производство минеральных удобрений).

*Превалирует антропогенное загрязнение (>50-80 %)*

# ОСНОВНЫЕ ИСТОЧНИКИ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

- химические и фармацевтические предприятия;
- предприятия целлюлозно-бумажной и печатной индустрии – основные потребители хлорсодержащих соединений;
- горно-добывающие и горно-обогащительные предприятия, которые извлекают тяжелые металлы в биогеохимических циклах;
- ископаемые углеводородные топливные материалы (нефть и уголь), которые в процессе транспортировки к месту переработки и аварийных ситуаций могут загрязнять значительные территории (разливы нефти и нефтепродуктов), сжигание которых приводит к повышению содержания  $\text{CO}_2$  в атмосфере (парниковый эффект), а также накоплению больших количеств азотной и серной кислот (кислотные дожди и смог);
- интенсивное земледелие и землепользование – влечет внесение больших количеств химических удобрений, пестицидов, гербицидов.



# ХИМИЧЕСКОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ

– *изменение естественных химических свойств среды в результате выбросов промышленными предприятиями, транспортом, сельским хозяйством различных загрязнителей.*

Различаются по источникам поступления и характеру воздействия

## **Характеристики приоритетных загрязняющих химических веществ:**

- широта распространение в окружающих человека микросредах и уровни его воздействия, способные вызвать неблагоприятные изменения в состоянии здоровья человека;
- устойчивость к воздействию абиотических факторов окружающей среды, накопление в организме, включение в пищевые цепи или природные процессы циркуляции веществ;
- частота и тяжесть неблагоприятных эффектов на состояние здоровья человека, особенно необратимые и длительно протекающие изменения в организме, приводящие в мутациям;
- постоянный характер действия;
- изменение (трансформация) в окружающей среде или организме человека, приводит к образованию продуктов, имеющие большую токсичность, чем исходное соединение;
- большая часть населения подвержена действию загрязнителя.

# ПРИОРИТЕТЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ ЗАГРЯЗНИТЕЛИ

- *соединения тяжелых металлов;*
- *пестициды;*
- *полициклические ароматические углеводородов;*
- *хлорорганические соединения;*
- *нефтепродукты,*
- *фенолы;*
- *детергенты;*
- *нитраты*

Последствием одной из форм химического загрязнения - поступления в атмосферу *продуктов сгорания топлива* в энергетических установках предприятий, наземного и воздушного транспорта, выбросов химических и металлургических предприятий, является *ацидификация* (кислотные осадки).

# ФИЗИЧЕСКОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ

*воздействие, вызывающее отклонение от нормы физических параметров окружающей среды*

**Радиоактивное загрязнение** – поступление в окружающую среду радиоактивных веществ. Происходит в результате ядерных взрывов, попадания в окружающую среду отходов разработки радиоактивных руд, при авариях на атомных предприятиях.

**Электромагнитное загрязнение** – результат изменения электромагнитных свойств окружающей среды (электромагнитного фона), возникающего под воздействием линий электропередач высокого напряжения, работы некоторых промышленных установок, природных явлений — магнитных бурь и др. Может привести к местным или глобальным геофизическим аномалиям и изменениям в биологических процессах.

**Вибрационное загрязнение** связано с возникновением механических колебаний разных частот вследствие работы технических сооружений - компрессорных, насосных станций, вентиляторов, кондиционеров, турбин. Вибрации распространяются по металлическим конструкциям оборудования и через их основания достигают фундаментов общественных и жилых зданий. **В крупных городах** возрастает проблема влияния на жителей вибрации, источниками которой являются работающие лифты, линии метрополитена, автотрассы. **Особую опасность** представляют резонансные явления при совпадении частот колебаний органов человека и внешних вибрационных воздействий.

# ФИЗИЧЕСКОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ

**Шумовое загрязнение** - характеризуется превышением естественного уровня шумового фона. Характерно для городов, окрестностей аэродромов, промышленных объектов; негативно воздействует на человека, животных, растения.

**Тепловое загрязнение окружающей среды** – техногенное повышение температуры относительно природного фона, в основном за счёт сжигания ископаемого топлива. *Основные источники:* выбросы в атмосферу нагретых отработанных газов и воздуха, сброс в водоемы нагретых сточных вод.

# МЕХАНИЧЕСКОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ

*загрязнение среды материалами, оказывающими механическое воздействие без химических последствий. Может возникать при изъятии грунтов в процессе дноуглубительных работ, поступлении пыли в атмосферу, свалке строительного мусора на земельном участке.*

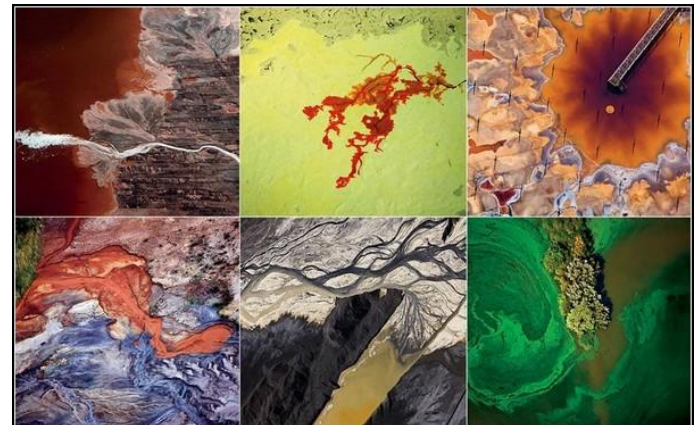


# БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ

*выражается преимущественно в бактериальном загрязнении – привнесении в окружающую среду патогенных микроорганизмов.*

Бактериальному загрязнению способствует поступление большого количества органических веществ с отходами пищевых, целлюлозно-бумажных производств, неочищенными канализационными сточными водами.

*К биологическому загрязнению также относят проникновение в экосистемы и технологические устройства чуждых растений, животных и микроорганизмов, которое может привести к взрывообразному росту численности вселившихся организмов и иметь непредсказуемые последствия*



# ХИМИЧЕСКОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ

**Ксенобиотики** (от греч. ξένος – чуждый и βίος – жизнь) – условная категория для обозначения чужеродных для живых организмов химических веществ, естественно не входящих в биотический круговорот.

**Повышение концентрации ксенобиотиков** в окружающей среде прямо или косвенно **связано с хозяйственной деятельностью человека.**

## **2 группы загрязняющих биосферу веществ :**

- **вещества промышленного происхождения**, чужеродные для биосферы по химическому строению и свойствам (полихлорбифенилы, нитротолуолы, полихлордиоксины, др.) – *«не знакомы» микроорганизмам и сложно поддаются биодegradации;*
- **природные химические соединения**, находящиеся в биодоступной форме, но токсичные для живых организмов (углеводороды ископаемого топлива, тяжелые металлы в составе природных минералов, др.) – *достаточно легко утилизируются и разрушаются биологическим путем.*



# БИОДЕГРАДАЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ

*преобразование сложных веществ  
с помощью биологической активности*

- **трансформация** – незначительное изменение структуры молекулы ксенобиотика;
- **фрагментация** – разложение сложной молекулы на более простые вещества;
- **минерализация** – полное разложение молекулы ксенобиотика до  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_4$ , др.

**Основные агенты биодegradации – микроорганизмы:**

- большое разнообразие ферментных систем;
- лабильность метаболизма;
- высокая адаптационная способность.

**Биологическое значение биодegradации:**

- возвращение основных биогенных элементов в глобальные циклы круговорота веществ;
- предотвращение накопления «мертвых» остатков на поверхности Земли.

# БИОДОСТУПНОСТЬ КСЕНОБИОТИКОВ

**Биодоступность** – способность ксенобиотика подвергаться биотрансформации

## **Зависит от:**

- генетических свойств микроорганизмов, осуществляющих трансформацию;
- условий окружающей среды, влияющих на скорость переноса ксенобиотика в клетки микроорганизма-деструктора;
- токсичности ксенобиотика для микроорганизм-деструктора;
- концентрации ксенобиотика в окружающей среде.

## **В зависимости от времени полураспада ( $t_{1/2}$ ) ксенобиотики делят на:**

- легко доступные ( $t_{1/2}$  1–7 суток);
- умеренно доступные ( $t_{1/2}$  7 суток – 4 недели);
- трудно доступные ( $t_{1/2}$  4 недели – 6 месяцев);
- устойчивые ( $t_{1/2}$  6 месяцев – 1 год).

# БИОДОСТУПНОСТЬ КСЕНОБИОТИКОВ

## Биодоступность ксенобиотиков зависит от химической структуры:

- чем сложнее структура, тем менее доступен ксенобиотик для биodeградации и меньше микроорганизмов способно его утилизировать;
- чем больше ароматических колец в молекуле ксенобиотика, тем менее он доступен для биodeградации;
- галогены, метильные группы и другие заместители повышают устойчивость к разложению ароматических и алифатических соединений.

## Скорость биodeградации ксенобиотиков снижается в ряду:

- н- и изоалканы > циклические алканы, сульфированная ароматика > ди-, трициклическая ароматика > тетраароматика, стераны, нафтены > пентаароматика, асфальтены, смолы;
- алканы > алкилциклогексаны, алкилбензолы > ациклические изопреноидные алканы > метилнафтолы > C<sub>14</sub>-C<sub>16</sub> бициклические алканы > стераны > диастераны.

# БИОДОСТУПНОСТЬ НЕКОТОРЫХ КЛАССОВ КСЕНОБИОТИКОВ

Загрязнение	аэробные условия	анаэробные условия
<b>Сырая нефть</b>	±*	-
<b>Нефтепродукты:</b>		
бензин, керосин	+	-
дизельное топливо, мазут	±	-
машинное масло	-	-
<b>Ароматические углеводороды</b>		
бензол, талуол	+	±
<b>Фенолы</b>	+	+
<b>Фталаты</b>	±	±
<b>Анилин</b>	±	-
<b>Нитробензол</b>	±	-
<b>ДДТ</b>	-	-
<b>Трихлорэтилен, тетрахлорэтилен</b>	-	±
<b>Винилхлорид</b>	±	-

*Примечание.* – + - высокая; ± - умеренная; - - низкая

# **ФАКТОРЫ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ И БИОДОСТУПНОСТЬ КСЕНОБИОТИКОВ**

Биодоступность и активность биодеградации ксенобиотиков ограничивают следующие факторы:

- 1. Неоптимальное значение либо отсутствие определенного фактора, необходимого для роста микроорганизмов-деструкторов**
  - низкая концентрация ксенобиотика для индукции ферментов метаболизма;
  - физическая недоступность токсиканта из-за его адсорбции, связывания, механического включения, низкой растворимости;
  - недоступность акцепторов электронов или косубстратов;
  - дефицит элементов питания;
  - неоптимальные температура, влажность, кислотность, др.
- 2. Инактивация внеклеточных ферментов, необходимых для биодеградации**
- 3. Токсическое действие окружающей среды**
  - токсичность ксенобиотиков;
  - токсичность органических ингибиторов, генерируемых другими биологическими системами;
  - токсичность соединений, синтезируемых другими микроорганизмами.

# КОНЦЕНТРАЦИЯ КСЕНОБИОТИКА

- чем выше концентрация ксенобиотика, тем дольше он находится в окружающей среде;
- если концентрация ксенобиотика превышает допустимый уровень токсичности для микроорганизмов, его биodeградация замедляется или прекращается;
- существует минимальный пороговый уровень концентрации ксенобиотика, необходимый для поддержания жизнедеятельности микроорганизма-деструктора;
- при низкой концентрации деградация ксенобиотика возможна только в режиме кометаболизма при использовании другого субстрата (*деградация бензпиренов и диоксинов в природных условиях; недеградируемость остаточных концентраций ксенобиотиков*).



## **ФИЗИЧЕСКАЯ НЕДОСТУПНОСТЬ КСЕНОБИОТИКА**

- биодоступность органических соединений обусловлена их сродством к водной, минеральной и газовой фазам окружающей среды;
- адсорбция загрязнения на поверхности и в твердой фазе, механическое включение в почву, низкая растворимость и связанные остатки, образующиеся в результате химических реакций, пространственно разделяют сорбированное соединение и микроорганизмы, уменьшают поверхность их контакта и биодоступность ксенобиотика.

## **ДЕФИЦИТ ЭЛЕМЕНТОВ ПИТАНИЯ**

Для роста микроорганизмам-деструкторам необходимы биогенные элементы – азот и фосфор, дополнительное внесение которых требуется в системах биологической очистки сточных вод, при биоремедиации песчаных и супесчаных почв, разложении ксенобиотиков, бедных биогенными элементами. В природных условиях потребность микроорганизмов в азоте и фосфоре составляет примерно C:N:P=300:10:1.

# НЕДОСТУПНОСТЬ АКЦЕПТОРОВ ЭЛЕКТРОНОВ ИЛИ КОСУБСТРАТОВ

Деградация ксенобиотиков микроорганизмами сопряжена с потреблением окислителя (акцептора электронов) или восстановителя (донора электронов), и их дефицит в среде может ограничивать биодеструкцию. В качестве *окислителя* в аэробных условиях выступает кислород воздуха, в анаэробных условиях –  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{4+}$ , в качестве *восстановителя* используются восстановленные неорганические соединения ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , сульфиды металлов).

## ИНАКТИВАЦИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Снижение биодоступности ксенобиотика может быть связано с инактивацией внеклеточных микробных ферментов, участвующих в его разложении. Ферменты могут терять активность в результате адсорбции на почвенных частицах (особенно глине), органическом веществе, ингибироваться под действием своих субстратов или продуктов катализируемой реакции.

# ТЕМПЕРАТУРА

Один из наиболее важных факторов окружающей среды для эффективного протекания процессов биодеструкции:

- оптимальная температура для большинства микроорганизмов-деструкторов – 30-37°C;
- косвенное влияние температуры проявляется в изменении растворимости загрязнителя в воде, степени летучести и сорбции загрязнений;
- применение повышенных температур – один из способов увеличения биодоступности ксенобиотиков в биоочистке (используются термофильные микроорганизмы-деструкторы, разлагающие загрязнитель при 60-70°C).

# АКТИВНАЯ КИСЛОТНОСТЬ

- оптимальная кислотность среды для большинства бактерий-деструкторов находится в интервале значений рН 6,0-8,0;
- эффект рН в большей степени зависит от микроорганизма, чем от природы химического соединения;
- опосредованное влияние значения рН среды связано с ионизацией молекулы ксенобиотика.

# ВЛАЖНОСТЬ

Для биодеструкции ксенобиотиков в почвенных средах необходима влага. Содержание воды в почве влияет на скорость биodeградации в результате воздействия на метаболическую активность почвенных микроорганизмов, структуру почвы, биодоступность ксенобиотика.

Для *аэробных микробиологических процессов* оптимальная влажность почвы – 40-80% полной влагоемкости. При влажности почвы 75-100% (1 г воды на 1 г сухой почвы) возможно замедление скорости биodeградации из-за уменьшения скорости переноса кислорода воздуха в почву и создания анаэробных условий.

По мере снижения влажности почвы замедляется жизнедеятельность микроорганизмов, увеличивается площадь контакта почва-загрязнение и снижается биодоступность контаминанта.



# МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ К ТОКСИЧЕСКОМУ ДЕЙСТВИЮ КСЕНОБИОТИКОВ

**Трансформация** ксенобиотика микроорганизмами во многих случаях начинается лишь *после снижения его концентрации* вследствие рассеивания или абиотических процессов, либо *после адаптации микроорганизма* к его утилизации.

## **Механизмы адаптации:**

- снижение скорости поступления ксенобиотика в клетку (изменение проницаемости и состава клеточных мембран);
- использование активных систем транспорта для удаления ксенобиотика из клетки;
- связывание ксенобиотика с внутриклеточными соединениями с образованием нетоксичных производных;
- изменение или утрата чувствительного звена метаболизма («мишени»);
- потеря ферментов, катализирующих превращение исходного соединения или промежуточных продуктов подготовительного обмена, в токсические соединения;
- индукция ферментов, нечувствительных или малочувствительных к ксенобиотику.

# ОСНОВНЫЕ СТАДИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КСЕНОБИОТИКА С МИКРОБНОЙ КЛЕТКОЙ В ПРОЦЕССЕ БИОТРАНСФОРМАЦИИ



# СТАДИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КСЕНОБИОТИКА С МИКРОБНОЙ КЛЕТКОЙ

## 1. Транспорт ксенобиотика к клетке

- осуществляется путем растворения, конвекции, диффузии;
- определяется внешними факторами и свойствами ксенобиотика;
- биодоступность органических соединений повышается с увеличением растворимости;
- данная стадия может быть лимитирующей в трансформации загрязнений при ограничении их переноса физико-химическими факторами окружающей среды.

## 2. Транспорт ксенобиотика в клетку

- транспорт *нейтральных* и *гидрофобных ксенобиотиков* через мембрану осуществляется путем *диффузии* и не является лимитирующим;
- *проникающая способность гидрофобных веществ* через мембрану *возрастает* с увеличением углеродной цепи, количества метильных, фенильных, этильных групп, *снижается* при наличии в молекуле гидроксильных, карбоксильных и аминогрупп;
- транспорт через мембрану *высокомолекулярных* и *гидрофильных ксенобиотиков* осуществляется с помощью систем *активного транспорта* и оказывается лимитирующей стадией в их биодеградаци



# СТАДИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КСЕНОБИОТИКА С МИКРОБНОЙ КЛЕТКОЙ

**3. Первичная атака (периферийный метаболизм)** - последовательная трансформация органического ксенобиотика в одно из соединений, которое поступает в основные (центральные) пути катаболизма или анаболизма. Микроорганизмы под воздействием ферментов «периферийного» метаболизма переводят природные или синтетические вещества в «ключевые» соединения (фосфорилированные углеводы, пируват, глюконат, жирные кислоты, аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, пирокатехин), из которых синтезируются необходимые компоненты клетки и извлекается энергия.

**4. Центральный метаболизм** — частичная или полная минерализация интермедиатов (жирные кислоты, пируват, дикарбоновые кислоты), полученных в результате периферийного метаболизма ксенобиотика, в процессе катаболизма и анаболизма.

## **5. Транспорт продуктов из клетки**

- осуществляется путем *пассивного транспорта* или *диффузии*;
- возможен *активный транспорт*, если ксенобиотик не полностью минерализуется с образованием токсичных продуктов.

# ПЕРИФЕРИЙНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ

Включает начальные этапы метаболизма ксенобиотиков

## **Ферменты периферийного метаболизма:**

- имеют широкую субстратную специфичность;
- являются индуцибельными (индуцируются многочисленными соединениями, даже не являющимися их субстратами);
- их синтез и активность находятся под контролем сложных регуляторных механизмов.

## **Пути периферийного метаболизма:**

- отличаются большой гибкостью (трансформация широкого спектра соединений);
- характеризуются быстрым обменом генетическим материалом между популяциями микроорганизмов

## **Типы реакций периферийного метаболизма:**

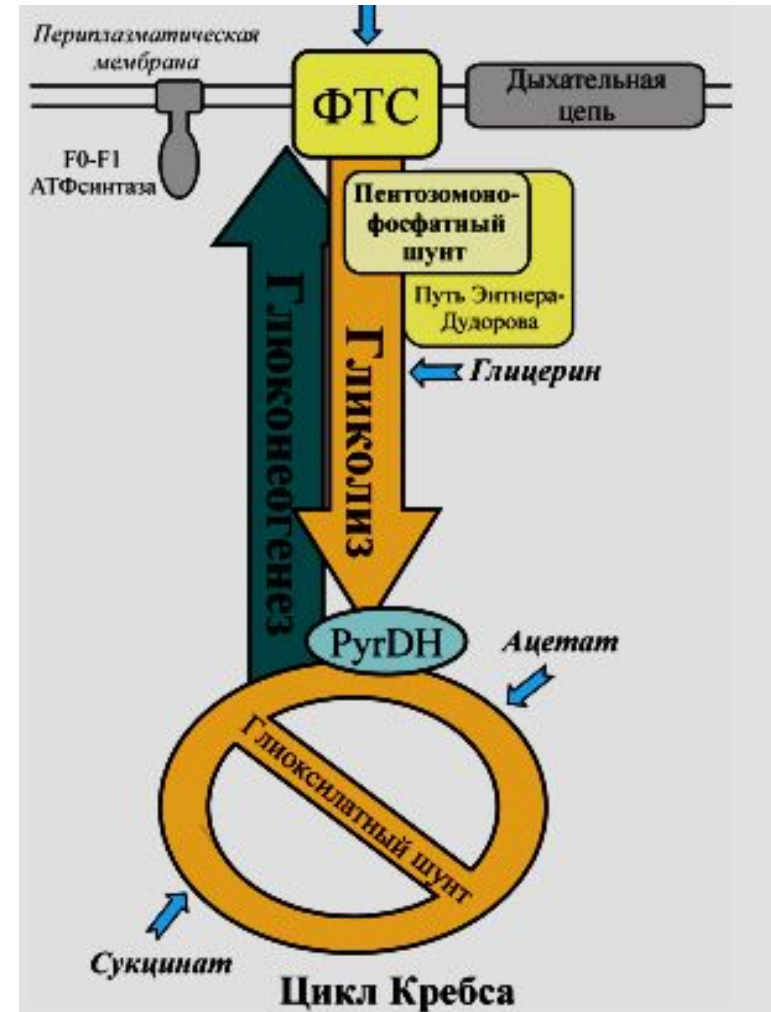
- окисление;
- восстановление;
- гидролиз;
- дезаминирование;
- декарбоксилирование;
- конъюгация;
- дегалогенирование

# ЦЕНТРАЛЬНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ

Включает консервативные метаболические пути, общие для большинства микроорганизмов:

- гликолиз;
- глюконеогенез;
- пентозофосфатный шунт;
- путь Энтнера-Дудорова;
- цикл Кребса;
- глиоксилатный шунт;
- дыхательная цепь.

**Комбинация консервативного центрального метаболизма с пластичным периферийным позволяет микроорганизмам постоянно адаптироваться к новым субстратам и условиям окружающей среды**



# МЕХАНИЗМЫ ДЕГРАДАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ.

## Начальные этапы

Ксенобиотики могут деградироваться при участии широко спектра реакций подготовительного метаболизма.

### Аэробные условия:

- **гидроксирование** (гидроксилазы, моно-, ди-, оксидазы смешанных функций) – поляризация и повышение растворимости ксенобиотика;
- **N-деалкилирование** (моно-, ди-, оксидазы смешанных функций) – разрушение алкилзамещенных ксенобиотиков;
- **декарбоксилирование;**
- **$\beta$ -окисление жирных кислот;**
- **гидролиз эфирных связей;**
- **образование эпоксидов и сульфоксидов;**
- **окислительное расщепление ароматического и гетероциклического колец;**
- **гидролиз** (эстеразы, фосфотаза, лиаза) – расщепление эфирных, фосфоэфирных и амидных связей.

### Анаэробные условия:

- **восстановление** (нитрогруппы в аминогруппу, насыщение двойных и тройных связей, восстановительное дегалогенирование, др.);
- **гидролиз** (эстеразы, фосфотаза, лиаза) – расщепление эфирных, фосфоэфирных и амидных связей.

# МЕХАНИЗМЫ ДЕГРАДАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ

Если *синтетические ксенобиотики* подобны по химическим свойствам природным соединениям, их трансформация проводится по тем же механизмам, что и природных аналогов. Трансформация таких ксенобиотиков эффективнее по сравнению с соединениями, химическая структура которых сильно отличается от природных аналогов.

Большинство ксенобиотиков трансформируется в режиме *кометаболизма*, когда:

- способность к трансформации сложной молекулы обуславливается наличием в среде доступного источника энергии для поддержания жизнедеятельности (ксенобиотик не может использоваться для этих целей);
- дополнительный органический субстрат может обеспечивать превращение ксенобиотика энергией и/или кофакторами, облегчить его утилизацию.

# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕСТРУКЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ

Наиболее активно участвуют в деградации ксенобиотиков бактерии и грибы, обитающие в почве и воде:

- **аэробные грамотрицательные бактерии:** представители родов *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, метанооксиляющие и нитрифицирующие бактерии;
- **аэробные грамположительные бактерии:** представители родов *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Arthrobacter*;
- **анаэробные микроорганизмы:** нитрат- и сульфатредуцирующие бактерии, метаногенные археи;
- **грибы:** *Phanerochaetae*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*

## **Аэробные условия:**

- возможна деградация ксенобиотика **монокультурами микроорганизмов-деструкторов**;
- деградация ксенобиотика **ассоциацией микроорганизмов** проходит быстрее, эффективнее и полнее, по сравнению с монокультурой.

## **Анаэробные условия:**

- деградация ксенобиотиков осуществляется активностью **гетерогенных микробных сообществ**, основанных на прочных трофических связях (синтрофия – полная взаимозависимость микроорганизмов друг от друга в пищевых потребностях);
- **формы ассоциаций:** биопленки, гранулы, хлопья (микроорганизмы, осуществляющие разные стадии биодеградации сложного соединения находятся близко друг к другу для облегчения переноса интермедиатов.

# БИОДЕГРАДАЦИЯ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

- Нефть** - сложная смесь, содержащая более 1000 индивидуальных веществ:
- **жидкие углеводороды** (> 500 соединений, 80-90% по массе);
  - **гетероатомные органические соединения** (4-5%, преимущественно сернистые, азотистые, кислородные);
  - **металлоорганические соединения** (в основном ванадиевые и никелевые);
  - **другие компоненты:** растворенные углеводородные газы ( $C_1-C_4$ , от десятых долей до 4%), вода (от следов до 10%), минеральные соли (преимущественно хлориды – 0,1-4000 мг/л и более), механические примеси (частицы глины, песка, известняка).

В углеводородной части нефти выделяют основные группы: **метановые** (алканы, циклоалканы), **нафтеновые** и **ароматические**. К более тяжелым фракциям нефти относятся **асфальтосмолистая** (асфальтены, смолы) и **золистая**. В зависимости от месторождения нефть имеет различный количественный состав данных химических групп углеводородов.

# БИОДЕГРАДАЦИЯ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

*В первые недели* после загрязнения почвы нефтью происходят в основном **физические процессы** миграции и рассеивания углеводородов в результате испарения и выщелачивания. *Потери нефти вследствие испарения в южных районах достигают 40-70%, в северной климатической зоне испаряется значительно меньше нефти, в почве она может сохраняться десятки лет.*

В результате испарения возрастает вязкость оставшейся части нефти, увеличивается количество углеводородов с длиной цепи более  $C_{20}$ , ароматических и циклических углеводородов, т.к. испаряются в основном низкомолекулярные углеводороды (*наиболее токсичные*) => **снижается токсическое действие нефти на микроорганизмы-деструкторы, что облегчает биodeградацию, однако повышается доля компонентов, устойчивых к биоразложению.**

*Через 1-4 недели* после попадания нефти в окружающую среду в благоприятных условиях для роста микроорганизмов начинается её **биodeградация.**



# БИОДЕГРАДАЦИЯ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

Практически все углеводороды, входящие в состав нефти, могут подвергаться микробной биодegradации (окислению).

По степени снижения окисляемости микроорганизмами компоненты нефти и нефтепродуктов располагаются в следующей последовательности:

**алифатические > ароматические > смолы > асфальтены**

## Классификация компонентов нефти в зависимости от их биодоступности

Группа	Отношение к воздействию микроорганизмов	Степень биодegradации, % к исходн. содержанию	Компоненты нефти
I	Высоко чувствительные	80-100	н-алканы; изо-алканы
II	чувствительные	60-80	цикланы с 6, 1, 5 и двумя кольцами; S-ароматика; моноароматика
III	умеренно чувствительные	45-60	циклоалканы с 3 и 4 кольцами; триароматические УВ
IV	устойчивые	30-45	тетраароматические УВ; стераны; тритерпаны; нафтеноароматические УВ
V	высокоустойчивые	0-30	пентаароматические УВ; асфальтены; смолы

# БИОДЕГРАДАЦИЯ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

Первые сообщения о способности бактерий деградировать нефть – **1946** год.

К деградации нефти и нефтепродуктов способны многие бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы и некоторые водоросли.

*Углевороодокисляющие микроорганизмы широко распространены в природных (водных и почвенных) экосистемах.* Их способность к окислению углеводов связана с *наличием ферментов группы оксидаз*, поэтому такие микроорганизмы встречаются, главным образом, среди *аэробов*.

Углевороодокисляющие микроорганизмы являются частью гетеротрофного сообщества и *присутствуют как в загрязненных, так и в «чистых» биотопах.* Загрязнение биоценоза нефтью и нефтепродуктами вносит дополнительный источник углерода в экосистему, что стимулирует развитие данной группы бактерий. Поэтому *в хронически загрязненных экосистемах численность углевороодокисляющих бактерий всегда выше по сравнению с не загрязненными, хотя количественная связь между численностью углевороодокисляющих бактерий и количеством углеводов в среде отсутствует;*

При загрязнении биотопа нефтью или нефтепродуктами происходит постепенная смена доминантов микробного сообщества, состав доминирующих родов углевороодокисляющих бактерий в биоценозах зависит от природы нефтепродукта.

# ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ – ДЕСТРУКТОРОВ КСЕНОБИОТИКОВ

- в пробах почвы, взятых на территории Кувейта и Саудовской Аравии, в первые недели после загрязнения нефтью и нефтепродуктами доминируют микроорганизмы рода *Rhodococcus*, затем родов *Bacillus* и *Arthrobacter*, в конце третьей недели появляются грамотрицательные бактерии рода *Pseudomonas* и актиномицеты рода *Streptomyces*;
- после загрязнения Можайского водохранилища дизельным топливом на начальных этапах доминировали бактерии родов *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, затем их сменяли микроорганизмы рода *Rhodococcus*, через четыре недели – представители рода *Pseudomonas*, сохраняющие свое доминантное положение в течение двух месяцев;
- при внесении в природную воду нефти на первой неделе доминируют бактерии родов *Rhodococcus* и *Arthrobacter*, затем в сообществе преобладают бактерии рода *Pseudomonas*, через некоторое время – роды *Acinetobacter* и *Arthrobacter*;
- в хронически загрязненных нефтью и нефтепродуктами экосистемах безусловным доминантом являются бактерии рода *Rhodococcus*, а остальные роды занимают второстепенное положение.

# БИОДЕГРАДАЦИЯ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

Наиболее часто **бактерии-деструкторы нефти** обнаруживаются среди родов *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Bacillus*.

**Потенциальными деструкторами углеводов** нефти являются бактерии родов *Gordonia*, *Brevibacterium*, *Aeromicrobium*, *Dietzia*, *Burkholderia*.

Большинство микроорганизмов-деструкторов деградируют углеводороды нефти только **в аэробных условиях** (представители родов *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, др.).

В **анаэробных условиях** осуществлять окисление различных компонентов нефти могут *Pseudomonas* sp., *Thauera aromatica*, *Thauera chlorobenzoica*, *Desulfobacterium anilini*, *Azoarcus evansii*, *Magnetospirillum* sp., *Delftia acidovorans*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Syntrophus gentianae*, *Syntrophus buswellii*, *Blastochloris sulfoviridis*, *Dechloromonas* sp., *Geobacter grbiciae*, *Geobacter metallireducens*, *Desulfobacula toluolic*. В метаногенных условиях конечные стадии биодеструкции представлены археями родов *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, *Methanosarcina*, *Methanosaeta*.

# БИОДЕГРАДАЦИЯ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

У *мицелиальных грибов* родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Paecilomyces*, *Talaromyces*, *Graphium* и дрожжей родов *Candida*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Geotrichum*, *Trichosporon* обнаружена способность деградировать углеводороды нефти.

При утилизации углеводородов нефти *бактериями* оптимальны нейтральные значения pH (6,5-8,0); оптимальные условия для развития *дрожжей и мицелиальных грибов* – кислая среда; в широком диапазоне pH развиваются *смешанные популяции*.

Бактерии более эффективные деструкторы нефти и нефтепродуктов в *«обычных» условиях*, дрожжи и мицелиальные грибы – в *экстремальных условиях* (в кислой среде, при дефиците влаги, ограничении в питательных веществах).

# БИОДЕГРАДАЦИЯ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

Таксономический состав **водных углеводородокисляющих микроорганизмов** очень разнообразен: описано **28 родов бактерий** и **14 родов мицелиальных и дрожжевых грибов**. В составе углеводородокисляющей водной микробиоты чаще всего встречаются бактерии родов *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Nocardiosis*, *Brevibacterium*, *Actinomyces*, *Mycobacterium*, *Pseudonocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, дрожжи родов *Candida*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, мицелиальные грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Gunninghamella*, *Cladosporium*.

В **почвах** углеводородокисляющие микроорганизмы представлены, в основном, бактериями и грибами. Описано **22 рода бактерий**, **19 родов дрожжей** и **24 рода мицелиальных грибов**. Алканутилизирующие почвенные бактерии преимущественно относятся к родам *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Oleiphilus*, *Oleispira*, *Paracoccus*, *Planococcus*, *Xylella*, *Marinobacter*, *Brachybacterium*, др.

# БИОДЕГРАДАЦИЯ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

Большинство микроорганизмов *не утилизируют алканы, содержащие менее 9 атомов углерода*, их окислять способны некоторые штаммы родов *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*. Низкомолекулярные алканы обычно угнетают рост микроорганизмов, однако вследствие летучести их действие непродолжительно.

*Наиболее активно* деградируются микроорганизмами *углеводороды с прямой цепью* с длиной цепи  $C_{10}-C_{19}$ , способность к деструкции которых описана для бактерий родов *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, а также грибов родов *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*. В зависимости от условий они разлагаются на 10-90% в течение 1-2 месяцев при первоначальном суммарном содержании 0,5-2,0%.

*Алканы с длиной цепи  $C_{20}$  и более* при температуре окружающей среды представляют собой вязкие жидкости или твердые вещества, поэтому их транспорт к микробной клетке и *биотрансформация затруднены*.

В *анаэробных условиях длинноцепочечные алканы* могут использоваться сульфатредуцирующими бактериями, относящимися к классу *Proteobacteria*, и метаногенными сообществами анаэробных осадков.

# БИОДЕГРАДАЦИЯ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

*Изоалканы, циклоалканы и ароматические углеводороды* более устойчивы к окислению микроорганизмами по сравнению с н-алканами. Многие из них не употребляются в виде моносубстратов, а разлагаются в режиме кометаболизма (*соокисления*) с другими более доступными углеводородами.

Биодеградация тяжелых фракций нефти, содержащих *смолы и асфальтены*, затруднена устойчивостью к действию микробных ферментов и низкой диспергируемостью в жидкой среде. Из них относительно биодеградируемы только соединения с *3-4 кольцами*, время полураспада которых варьирует от 3 до 2000 недель. Для почвенной среды скорость минерализации тяжелых фракций нефти варьирует в пределах 0,02-0,6 г углеводов на 1 кг почвы в сутки.

**Заключительный и самый длительный этап** в биотрансформации нефти – *трансформация оставшихся высокомолекулярных соединений и образование связанных остатков*. Небольшая часть компонентов нефти, находящейся в почве, полимеризуется с образованием асфальтенов и полиароматических углеводородов (в экотопах с «застарелыми» загрязнениями их доля достигает 1-20%), которые в силу своей инертности мало опасны для окружающей среды.



# БИОДЕГРАДАЦИЯ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

*Максимальное содержание нефти* в среде, доступное для биоремедиации, не составляет не более **5-10%**.

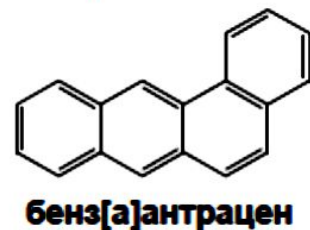
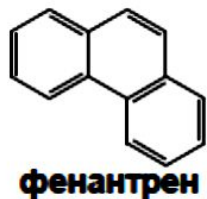
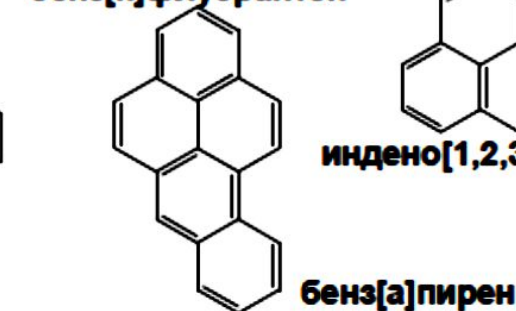
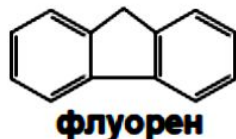
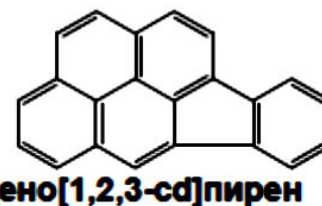
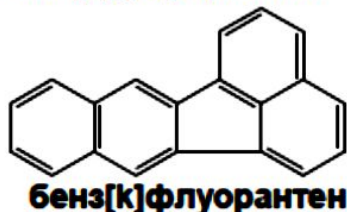
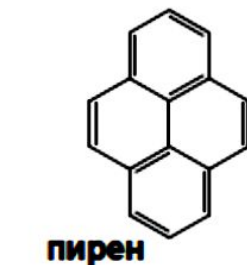
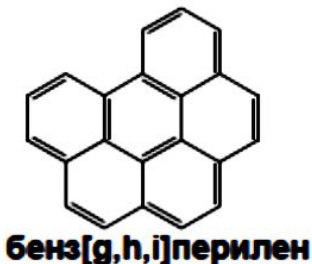
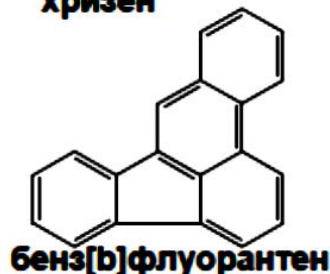
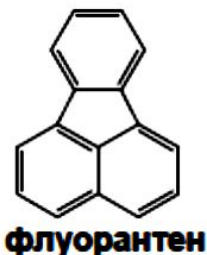
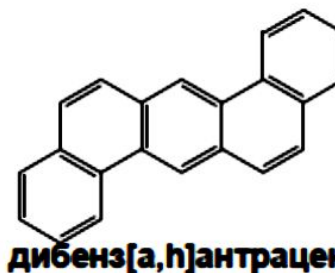
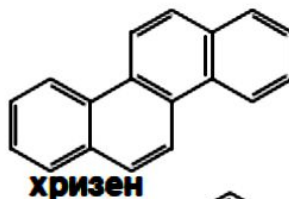
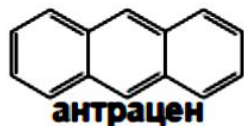
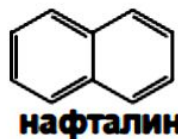
В благоприятных условиях основной *процесс биодеструкции* может протекать за **3-4 недели**, при этом численность углеводородоокисляющих микроорганизмов увеличивается в 100-1000 раз, изменяется численность других гетеротрофных микроорганизмов.

## **Факторы, влияющие на скорость биodeградации нефти:**

- *температура* – оптимальная – 30-40°C, углеводороды с длинной цепью не утилизируются при температуре ниже 25°C;
- *влажность* – оптимальное – 50-80%, меньше – ограничена доступность воды, больше – затруднен доступ кислорода;
- *аэрация* - кислород – конечный акцептор электронов;
- *кислотность* – оптимально нейтральное значение рН (6,5-8,0);
- *наличие минеральных компонентов* в среде (N, P, др.)
- *агрегатное состояние и степень дисперсности углеводорода* – транспорт углеводородов к клетке

# МИКРОБНАЯ БИОДЕГРАДАЦИЯ ПАУ

*Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ)* – вещества, молекулы которых состоят из конденсированных ароматических колец



ПАУ, включенные Агентством по охране окружающей среды США (US EPA) в список приоритетных загрязнителей окружающей среды

# МИКРОБНАЯ БИОДЕГРАДАЦИЯ ПАУ

## Факторы, влияющие на токсичность и биодоступность ПАУ:

- растворимость в воде;
- количество конденсированных ароматических колец в молекулу (*ПАУ с числом ароматических колец менее 4 более экотоксичны, чем с числом колец 5 и более, обладают канцерогенным и мутагенным действием, однако они легче поддаются биотрансформации*).

## Факторы, влияющие на скорость трансформации ПАУ

- тип и свойства почвы;
- концентрация ПАУ;
- возраст загрязнения;
- наличие дополнительных источников углерода (растительные остатки, компост, корневые выделения).

Биодеградация ПАУ в природных экосистемах осуществляется *сообществами микроорганизмов*, при этом метаболическая система деградации ПАУ распределена между отдельными членами сообщества, что обеспечивает значительно более быструю и эффективную трансформацию, чем в случае чистых культур.

# МИКРОБНАЯ БИОДЕГРАДАЦИЯ ПАУ

**Аэробная деградация** ПАУ осуществляется бактериями родов *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus* и грибами рода *Aspergillus*, которые широко распространены в почвенных и водных экосистемах.

В **анаэробных условиях** деградация ароматических соединений происходит более сложно, в многоэтапном процессе, при участии различных ферментов. Лишь немногие микроорганизмы, способные к анаэробной деструкции ароматических веществ, выделены в виде чистых культур – это *Pseudomonas* sp., *Thauera aromatica*, *Thauera chlorobenzoica*, *Desulfobacterium anilini*, *Azoarcus evansii*, *Magnetospirillum* sp., *Delftia acidovorans*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Syntrophus gentianae*, *Syntrophus buswellii*. Конечные стадии разложения осуществляют археи родов *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, *Methanosarcina*, *Methanoseta*.

В настоящее время выделены и описаны микроорганизмы (преимущественно бактерии рода *Pseudomonas*), способные разлагать не только нафталин и фенантрен, но и **ПАУ с большим количеством ароматических колец**: флуорен, хризен, пирен.

# СТАДИИ БИОДЕГРАДАЦИИ ПАУ БАКТЕРИЯМИ

1. *перенос ПАУ в бактериальную клетку* (диффузия; механизмы активного транспорта не известны);

2. *гидроксилирование ПАУ* (первая необратимая стадия);

Ферменты – *гидроксилирующие диоксигеназы (ГД)*, имеющие широкую субстратную специфичность

- одна и та же ГД катализирует окисление нескольких ПАУ;
- активность одной ГД в отношении разных ПАУ различна;
- разные ГД отличаются по субстратной специфичности;
- высокая (окисление фенантрена *Pseudomonas* sp. с 90% выходом 3S, 4R-дигидрокси-3,4-дигидрофенантрена) и низкая (окисление фенантрена *Mycobacterium* sp. с образованием 3,4-, 9,10- и 1,2-дигидродиолов в соотношении 2:1:1) селективность образования продукта

3. *разрыв ароматического кольца ПАУ.*

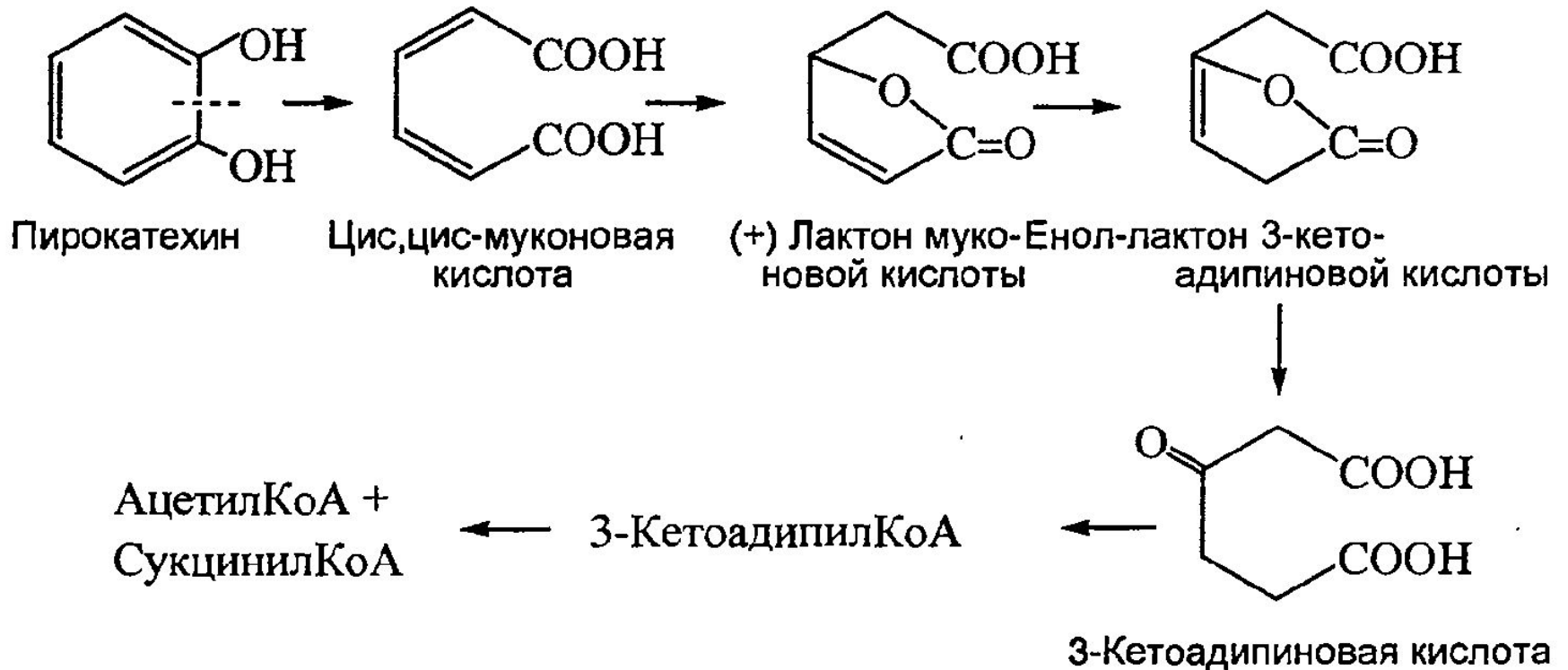
Ферменты – *дециклизирующие диоксигеназы (ДГ)*

*Типы расщепления:*

- *орто-расщепление (интрадиольный)* – образуются дикарбоновые ароматические кислоты;
- *мета-расщепление (экстрадиольный)* – образуются монокарбоновые ароматические кислоты.

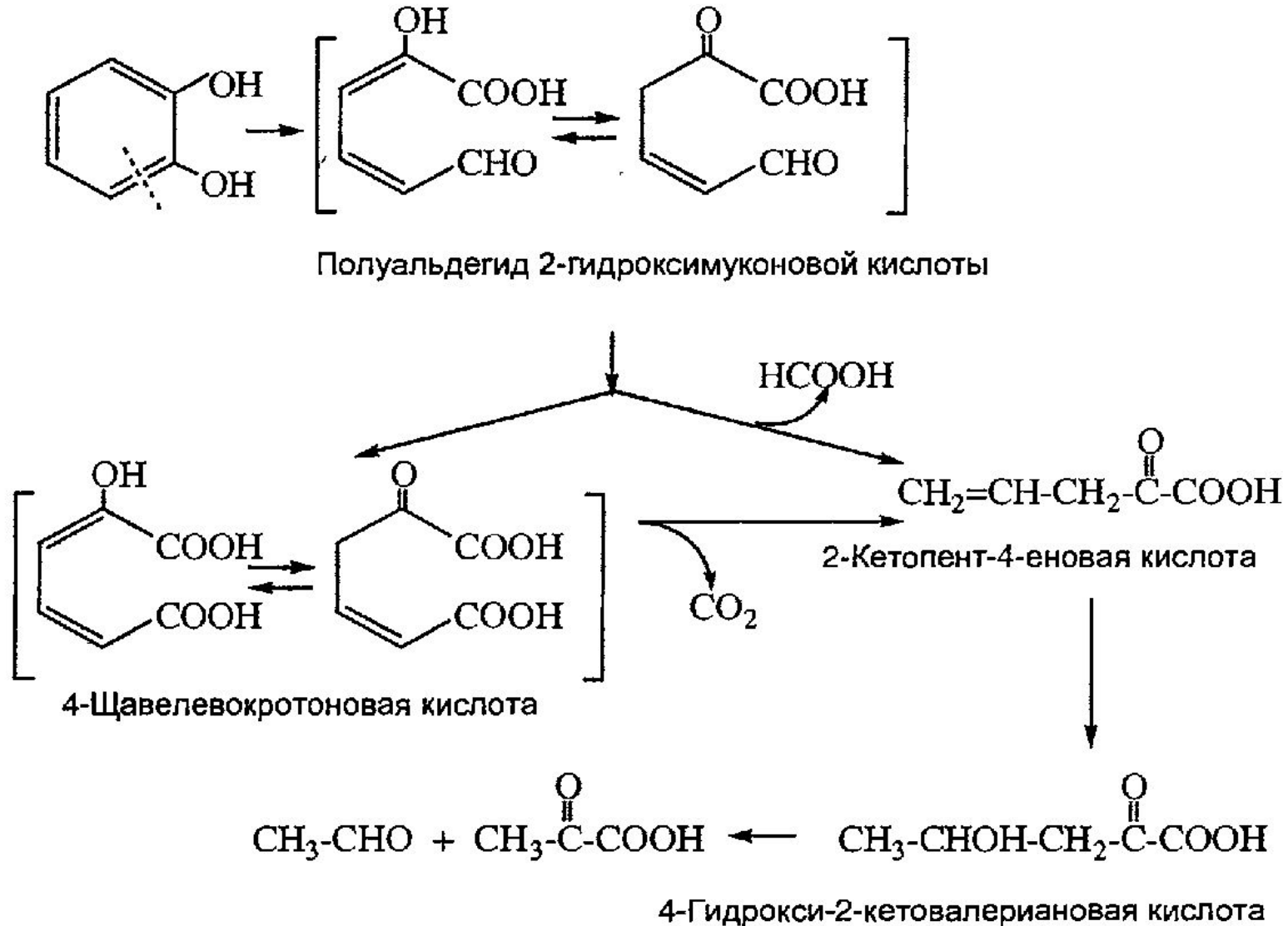
# Пути биодegradации ПАУ у бактерий рода *Pseudomonas*

## Орто-путь расщепления (интрадиольный)



# Пути биодegradации ПАУ у бактерий рода *Pseudomonas*

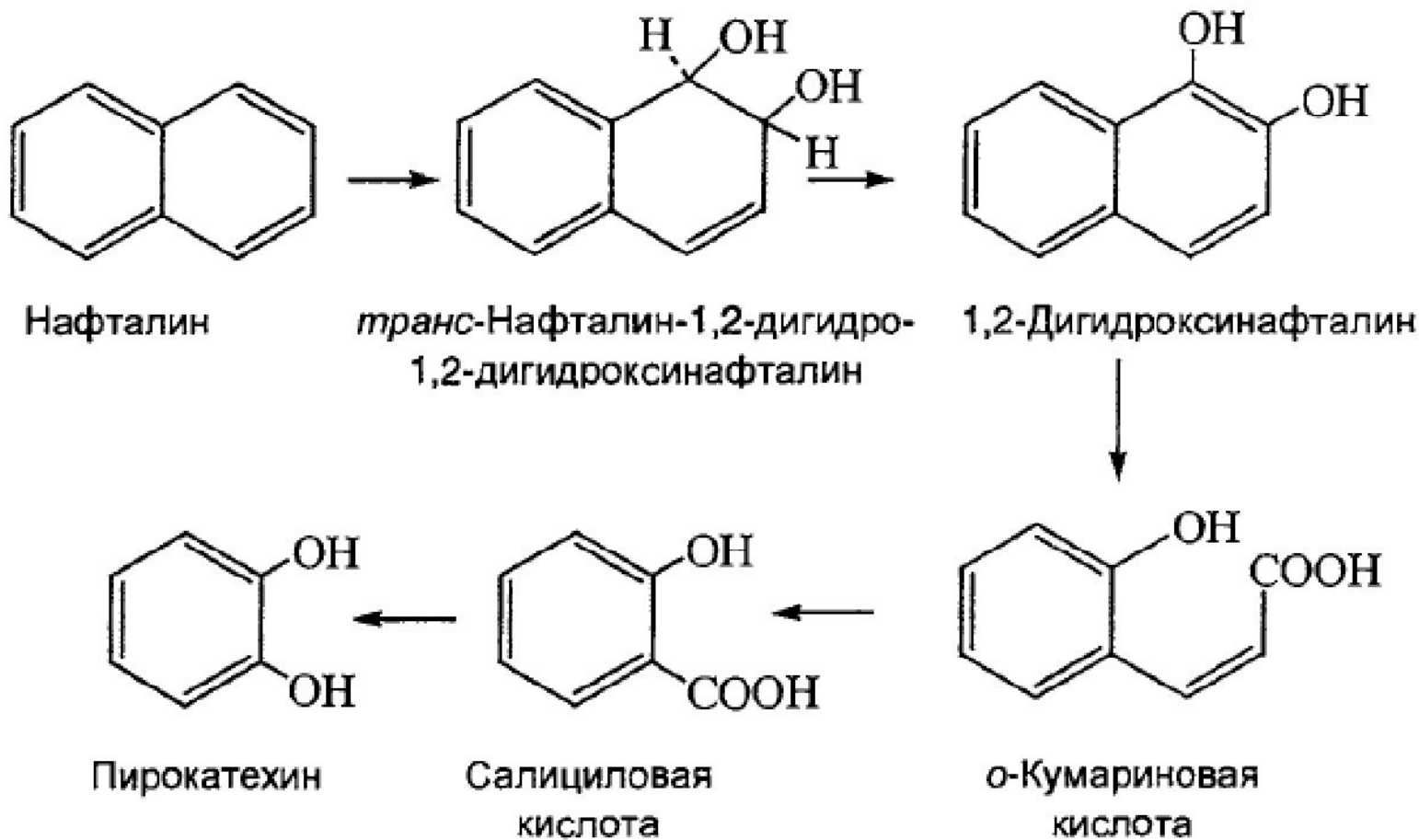
## Мета-путь расщепления (экстрадиольный)



# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕГРАДАЦИЯ НАФТАЛИНА

Наиболее часто происходит через образование *1,2-дигидроксинафталина* и *салициловой кислоты*

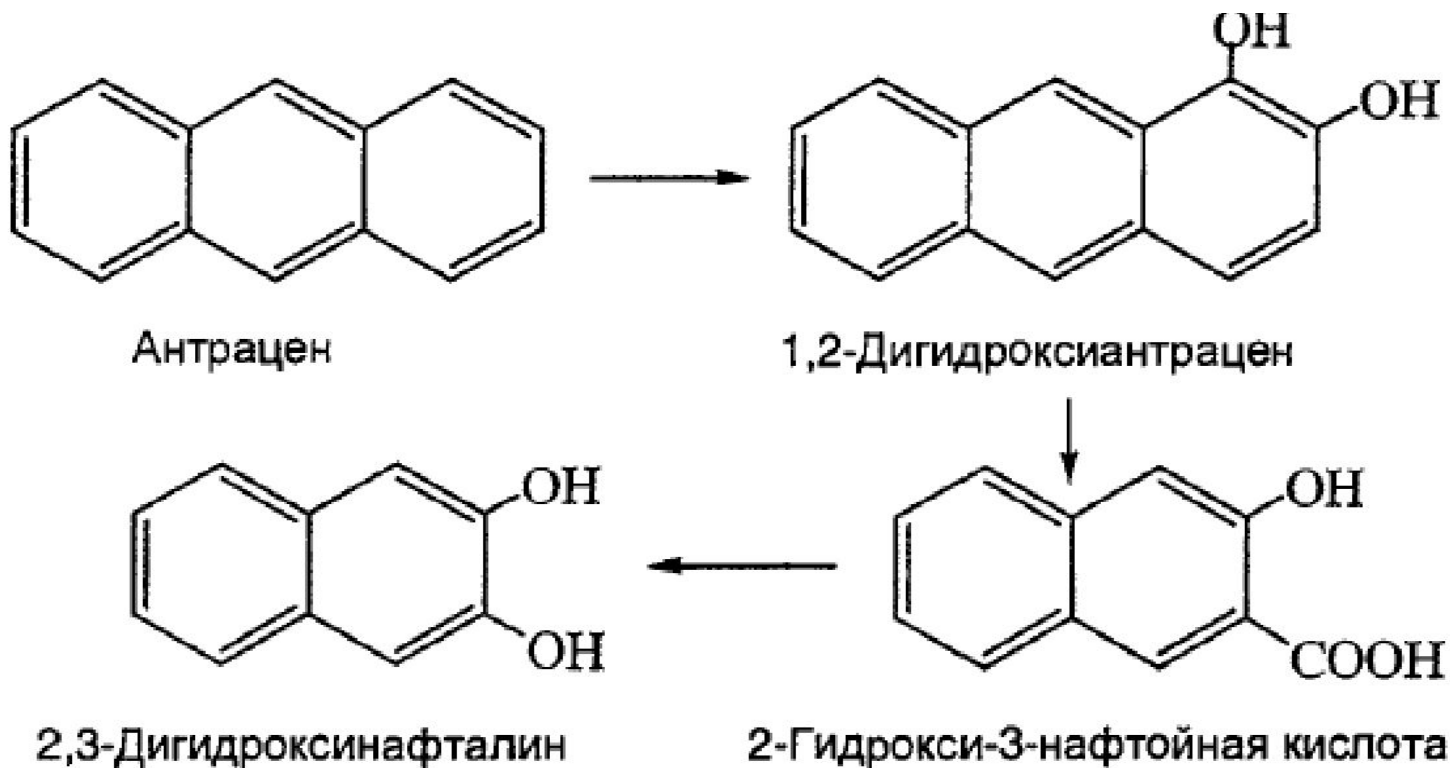
Некоторые бактерии окисляют нафталин до *1,2-нафтохинона*, токсичного для микробной клетки





# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕГРАДАЦИЯ АНТРАЦЕНА

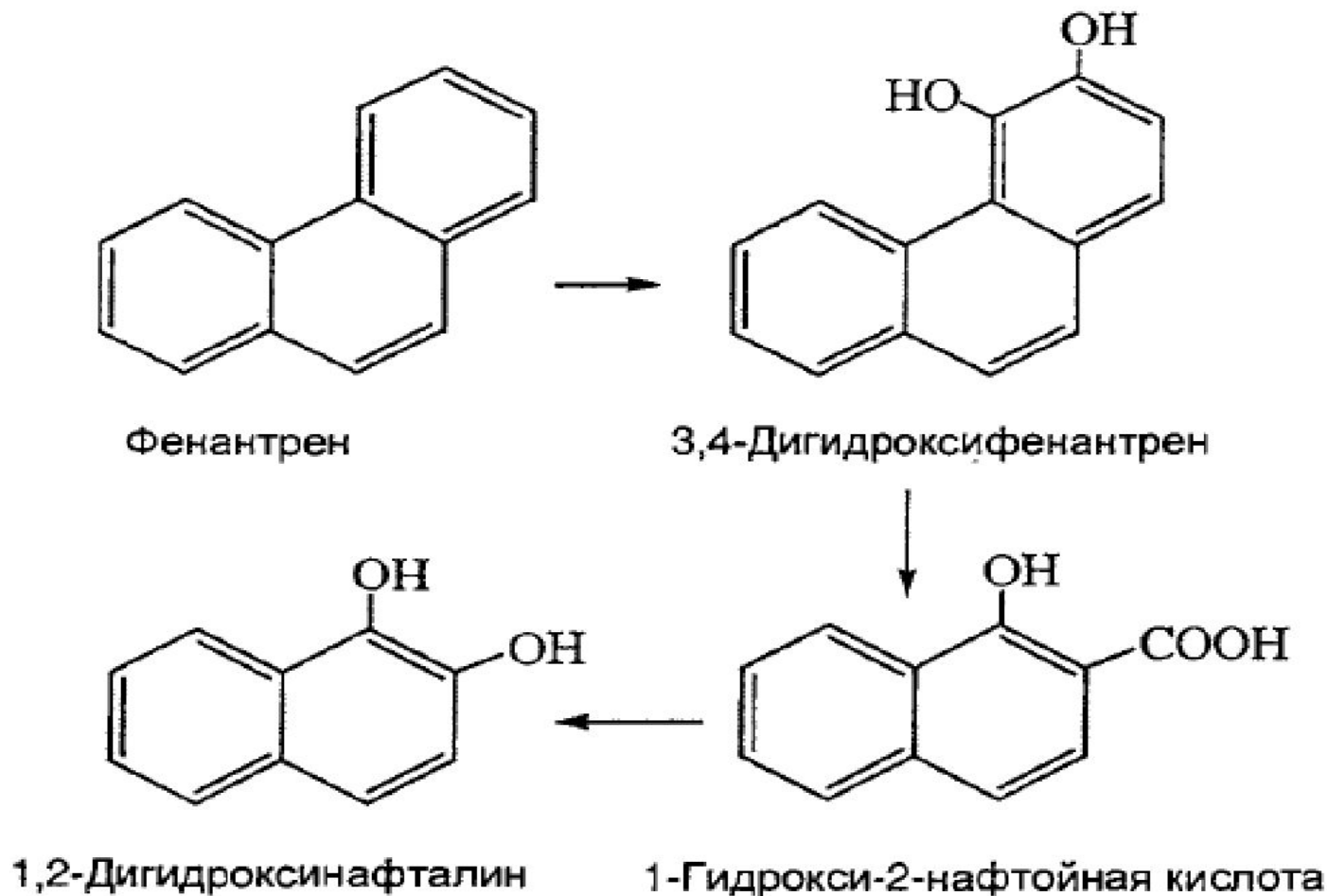
окисляется через *2-гидрокси-3-нафтойную кислоту*



# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕГРАДАЦИЯ ФЕНАНТРЕНА

Фенантрен деградируется через *1-гидрокси-2-нафтойную кислоту* с последующим превращением в *салицилат* и *катехол*.

Некоторые микроорганизмы при деградации фенантрена накапливают *2-гидрокси-1-нафтойную кислоту*



# БИОДЕГРАДАЦИЯ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ (ПАВ)

*Поверхностно-активные вещества (ПАВ)* – химические соединения, которые, концентрируясь на поверхности раздела термодинамических фаз, вызывают снижение поверхностного натяжения.

Большинство ПАВ имеет *амфифильное строение*: в молекуле присутствует *полярная (гидрофильная) часть* (функциональные группы -ОН, -СООН, -SOOОН, -О- или их соли -ОНа, -COONa, -SOOONa) и *неполярная (гидрофобная) часть* (углеводородная).

В 2008 г. годовой объем производства ПАВ в мире составил 13 млн тонн, в 2012 г. объём рынка ПАВ составлял 26,8 млрд долларов США, к 2020 г. Ожидается рост до 36 млрд.



# ПРИМЕНЕНИЕ ПАВ

- **Моющие средства** – наиболее распространены в синтетических моющих средствах *алкилбензосульфонат*, *алканосульфонат* (SAS), *алкилсульфат* (FAS), *летучий алкилсульфат* (FAES).
- **Косметика** – шампуни ( $\geq 10\%$ ), зубная паста, лосьон, тоник (в небольшом количестве).
- **Текстильная промышленность** – снятие статического электричества на волокнах синтетической ткани.
- **Кожевенная промышленность** – защита кожаных изделий от лёгких повреждений и слипания.
- **Лакокрасочная промышленность** – снижение поверхностного натяжения и облегчение проникновения красочного материала в маленькие углубления на обрабатываемой поверхности.
- **Бумажная промышленность** – разделение чернил и варёной целлюлозы при переработке использованной бумаги.
- **Металлургия** – смазка прокатных станов (снижение трения).
- **Защита растений** – образование эмульсий и повышение эффективности транспортировки питательных компонентов к растениям.
- **Пищевая промышленность** – эмульгаторы (лецитин) для улучшения вкусовых качеств мороженого, шоколада, взбитых сливок, соусов, др.
- **Нефтедобыча** – для гидрофобизации призабойной зоны пласта (ПЗП) с целью увеличения нефтеотдачи.
- **Медицина** – в хирургии в качестве антисептиков.

# КЛАССИФИКАЦИЯ ПАВ

*По типу гидрофильных групп* (основная):

• **ионные (ионогенные)** – диссоциируют в воде на ионы, одни из которых обладают адсорбционной (поверхностной) активностью, другие – неактивны.  
- *анионные* – диссоциируют, образуя отрицательно заряженные органические анионы:  $\text{RCOONa} \leftrightarrow \text{RCOO}^- + \text{Na}^+$ . По составу чаще всего органические кислоты и их соли (наиболее распространены натриевые и калиевые соли жирных кислот).

- *катионные* – при диссоциации образуют положительно заряженные поверхностно-активные катионы:  $\text{RNH}_2\text{Cl} \leftrightarrow \text{RNH}_2^+$ . По строению — основания, обычно амины различной степени замещения, и их соли.

- *амфотерные (или амфолитные)* – в зависимости от условий среды могут проявлять анионную либо катионную активность. Степень превращения ПАВа в катионную или анионную форму зависит от pH среды. К амфотерным ПАВ относят соединения, содержащие одновременно:

- ✓ карбоксильную и аминогруппу  $\text{RN}^+\text{HR}_1\text{COO}^-$  ;
- ✓ сульфозэфирную и аминогруппу  $\text{RN}^+\text{HR}_1\text{OSO}^{-3}$  ;
- ✓ сульфонатную и аминогруппу  $\text{RN}^+\text{HR}_1\text{SO}^{-3}$ .

• **неионные (неионогенные)** – высокомолекулярные соединения, которые в водном растворе не образуют ионов. Их растворимость обусловлена наличием в молекуле неионогенных групп – эфирных или гидроксильных.

# БИОДЕГРАДАЦИЯ ПАВ

**Опасность ПАВ** – ингибирование биохимического разложения других ксенобиотиков → в сточных водах содержание ПАВ ограничивают или стоки с высоким содержанием ПАВ обрабатывают отдельно.

**Биодеградация** – основной способ удаления ПАВ из окружающей среды.

## **Классификация ПАВ по степени биодеградации:**

- **легкоокисляемые** (биологически мягкие) – *алкилсульфат, хлорсульфанола* – относительно легко окисляются микроорганизмами. В аэротенках очистных сооружений они разлагаются на 80%, в почве летом – от нескольких суток до 1 месяца, зимой – 3-4 месяца.
- **трудноокисляемые** (биологически жесткие) – *сульфанола НП1, НП3; алкилбензолсульфонаты на основе тетрамеров пропилен*.
- **с промежуточной степенью биодеградации**

## **В процессе биодеградации ПАВ различают:**

- **первичную биодеградацию** – трансформацию молекулы с «отщеплением» гидрофильных групп, обусловленную этим потерю поверхностно-активных свойств ПАВ, что проявляется в исчезновении пенообразования;
- **полную биодеградацию** – дальнейшую трансформацию молекул ПАВ микробным сообществом до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ .

# БИОДЕГРАДАЦИЯ ПАВ

**В природных условиях скорость распада ПАВ определяется:**

- уровнем загрязнения и видом загрязняющего вещества;
- кислотностью и температурой окружающей среды;
- типом и влажностью почвы, содержанием почвенного органического вещества, механическим составом, сорбционными свойствами (*в тяжелых почвах с высоким содержанием глинистых минералов и органического вещества ПАВ разлагаются значительно медленнее, чем в легких песчаных и супесчаных почвах*)
- особенностями микробиоценоза биотопа

**Процессы деструкции многих ПАВ** в природе происходят очень *медленно*, так как у микроорганизмов отсутствует адаптация к этим веществам. Единственной группой организмов, вносящей реальный вклад в разрушение ПАВ в окружающей среде, являются *бактерии*.

# БИОДЕГРАДАЦИЯ ПАВ

**Первые работы по изучению деградации ПАВ** чистыми культурами бактерий – 50-е годы XX века:

- **Ризен (S. Risen) в 1956 году** показал, что штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Salmonella enteritidis* при выращивании на синтетической среде могут использовать анионные ПАВ в качестве единственного источника углерода, а на скорость их биodeградации влияет минеральный состав питательной среды.

- **Пейн (W. J. Payne) в 1963 году** из почвы, взятой в районе очистного сооружения, методом накопительного культивирования выделил 2 штамма *Pseudomonas* sp. и 2 штамма *Nocardia* sp., способных к деградации анионных ПАВ.

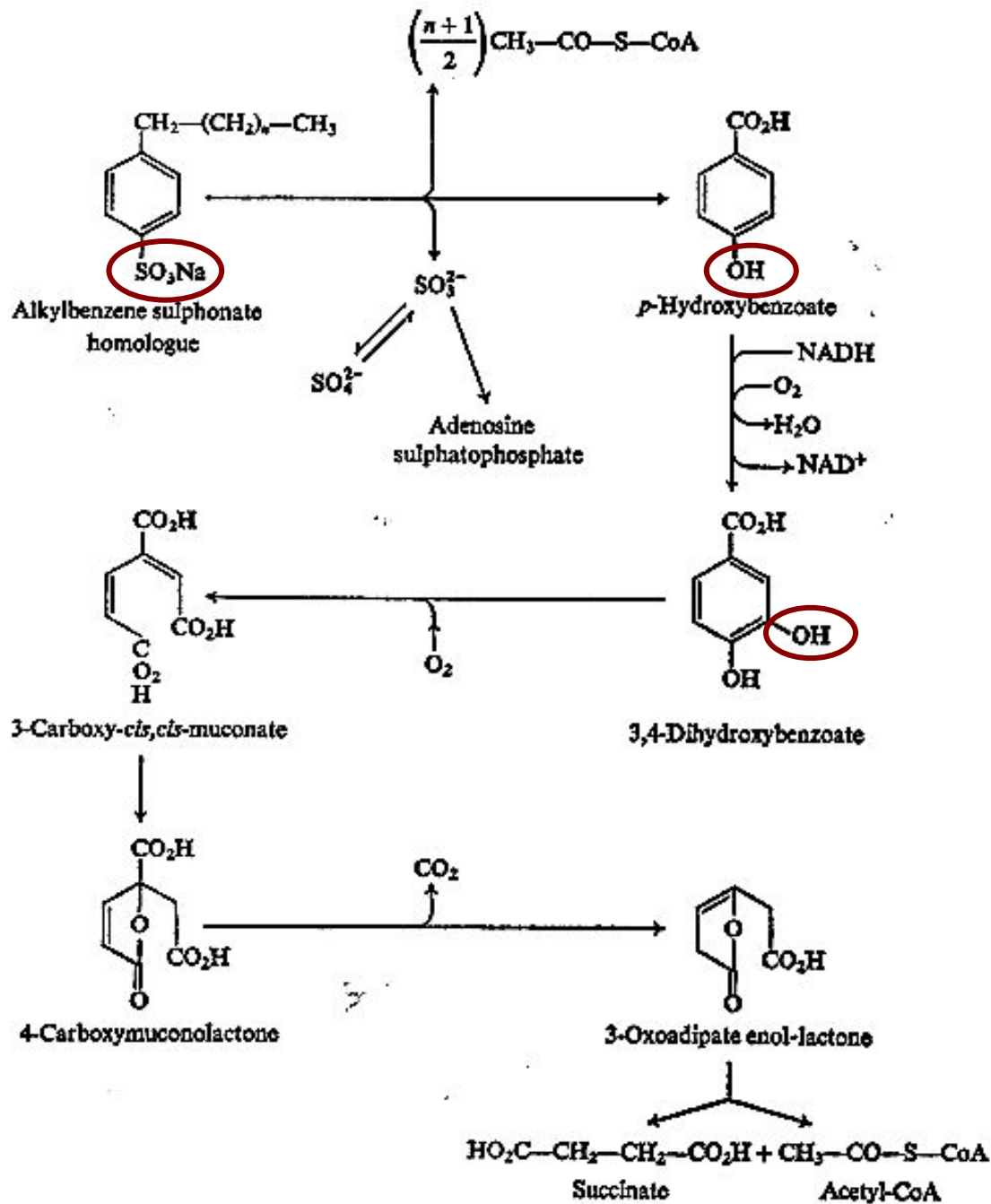
Ведущая роль в биodeградации **ионогенных ПАВ в аэробных условиях** принадлежит бактериям родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, которые могут использовать их в качестве единственного источника углерода, а также родов *Nocardia*, *Achromobacter*, *Mycobacterium*, *Xanthomonas*.

**В анаэробных условиях трансформация ионогенных ПАВ** может осуществляться денитрифицирующими бактериями родов *Pseudomonas*, *Flavobacterium* с использованием нитратов и нитритов в качестве конечных акцепторов электронов.



# Этапы биodeградации ПАВ

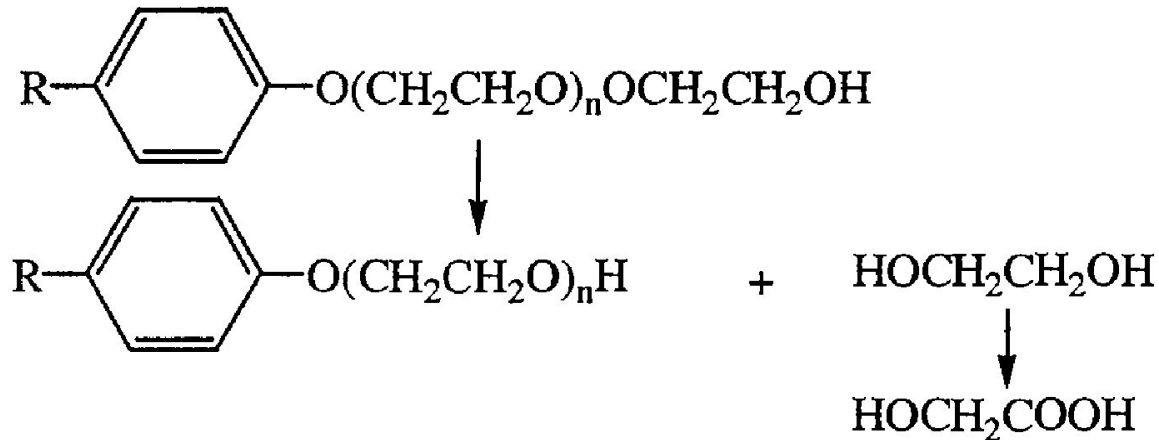
1. Окисление *ионогенных ПАВ* начинается с конечной метильной группы алкильной цепи (для анионных – с группы, наиболее удаленной от сульфатной или сульфонатной).
2. Расщепление линейных боковых цепей в результате  $\beta$ -окисления
  - *ПАВ с четным числом атомов углерода в алкильной цепи и линейными неразветвленными цепями окисляются быстрее, чем с нечетным числом атомов углерода и разветвленными цепями;*
  - *с увеличением углеродной цепи до  $C_{14}$  окисление ускоряется;*
  - *длина цепи  $C_5$  считается точкой раздела между легкоокисляемыми и устойчивыми соединениями;*
  - *биодоступность ПАВ резко падает при наличии в алкильной цепи четвертичного атома углерода или в случае присоединения бензольного кольца к алкильной цепи с помощью четвертичного атома углерода;*
  - *алкилбензолсульфонаты устойчивы к  $\beta$ -окислению, их биохимическое окисление происходит в процессе  $\omega$ -окисления метильных групп до карбоновых кислот  $\rightarrow$  окисляются одна из конечных метильных групп или одна из метиленовых групп внутри алкильной цепи .*
3. Кольцевые структуры разрушаются после полной деградации боковой цепи (расщепление бензольного кольца идет через образование  $\beta$ -кетoadипиновой кислоты, которая подвергается  $\beta$ -окислению)



**Схема метаболических  
 путей окисления  
 алкилбензолсульфонатов  
 бактериями рода *Vacillus***

# Этапы биodeградации ПАВ

1. Дeгpадация *неионогенных ПАВ* начинается с окисления терминальной метильной группы алкильной цепи до карбоксильного остатка
2. β-окисление полученной полиэтиленгликолевой цепи и её гидролиз (если длина цепи не превышает 10-12 оксиэтиленовых групп)
  - линейные первичные оксиэтилaты разрушаются быстро и полностью;
  - наличие разветвленных цепей, присутствие гомологов и изомеров замедляет процесс биохимического окисления.



**Схема бактериального окисления оксиэтилaтов алкилфенолов**

# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ БИОДЕГРАДАЦИЯ ПЕСТИЦИДОВ

**Пестициды** (сельскохозяйственные ядохимикаты) — химические средства, используемые для борьбы с вредителями и болезнями растений.

**По химическому составу:**

- Неорганические;

- Органические:

  - хлорорганические;

  - фосфорорганические;

  - металлоорганические;

  - алкалоиды.

**По целевому назначению:**

- **Бактерициды** - направлены на уничтожение фитопатогенных бактерий;

- **Гербициды** — используются в борьбе с сорняками растений;

- **Десиканты** - вызывают высыхание растений перед уборкой;

- **Дефолианты** — вызывают опадение листьев растений;

- **Инсектициды** — пестициды для уничтожения насекомых-вредителей;

- **Зооциды** - используются в борьбе с вредными животными;

- **Регуляторы роста растений** - влияют на рост и развитие растений;

- **Протравители зерен и семян** — предпосевная обработка;

- **Фунгициды** - направлены на борьбу с грибковыми заболеваниями.

# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ БИОДЕГРАДАЦИЯ ПЕСТИЦИДОВ

По *способу проникновения, характеру и механизму действия* :

- **Контактные** – непосредственно при соприкосновении;
- **Кишечные** – попав в организм вместе с пищей;
- **Системные** – проникают в сосудистую систему, распространяются по ней и вызывают гибель вредителей и возбудителей болезней;
- **Фумигативного действия** – проникают и отравляют организм через дыхательную систему.

По *классу опасности и степени воздействия на окружающую среду*:

**I категория** - чрезвычайно опасные (пестициды группы альдрин).

Наибольшую проблему обезвреживания пестицидов, создают вещества, выделенные в группу **стойких органических загрязнителей** (СОЗ), которые обладают высокой токсичностью, устойчивы к разрушению в естественных условиях, плохо растворимы в воде, проявляют мобильность в пищевых цепях, способны накапливаться в живых организмах.

Среди запрещенных к применению пестицидов **группа СОЗ** представлена хлорорганическими и ртутьсодержащими веществами, производными фурана и другими химическими соединениями (*альдрин, дильдрин, эндрин, мирекс, хлордан, гептахлор, гексахлорбензол, ДДТ, токсафен*).

# ПЕСТИЦИДЫ ГРУППЫ СОЗ

**Альдрин** (октален) — 1,2,3,4,10,10-гексахлор-1,4-эндо-5,8-экзодиметилен-1,4,4а, 5,8,8а-гексагидронафталин.

**Дильдрин** (окталокс) — 1,2,3,4,10,10-гексахлор-1,4,5,8-диэндометилен-6,7-эпокси-1,4,4а,5,8,8а-гексагидронафталин.

**Эндрин** (эндрекс) — 1,2,3,4,10,10-гексахлор-6,7-эпокси-1,4,4а,5,6,7,8,8а-октагидро-экзо-1,4-экзо-5,6-диметаннафталин.

**Хлордан** (велзикол, октахлор, хлориндан) — 1,2,4,5,6,7,8,8-Октахлор-1,4-эндометилен-3а,4,7,7а-тетрагидроиндан.

**Гептахлор** (велзикол 104, гептазол, гептанал) — 3а,4,7,7а-Тетрогидро-4,7-метано-1,4,5,6,7,8,8-гептахлоринден.

**Гексахлорбензол** — 1,2,3,4,5,6-гексахлорбензол.

**ДДТ** — 1,1-ди (4-хлорфенил)-2,2,2-трихлорэтан.

**Токсафен** (полихлоркамфен, хлорфен, октафен) – применяется как кишечно-контактный инсектицид на посевах свеклы, картофеля, гороха, др.

*В наибольшем количестве* в окружающую среду попадают **гербициды и инсектициды**: феноксиалкилкарбоновые кислоты, хлорированные алифатические кислоты, метил-, фенил-, тиокарбаматы, симм-триазины, толуидины, дипиридины, эфиры и тиоэфиры фосфорной и тиофосфорной кислот

# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ БИОДЕГРАДАЦИЯ ПЕСТИЦИДОВ

По химическим свойствам и биодоступности **пестициды** – органические ксенобиотики, особенностью которых является *наличие различных групп* в структуре молекулы, *необычных для биологических соединений*.

Доминирующая роль во включении пестицидов в природный метаболизм принадлежит *гетеротрофным микроорганизмам*.

В природных экосистемах некоторые пестициды (**простые пестициды и структурно схожие с природными соединениями**) относительно *быстро разлагаются до конечных продуктов*, что в ряде случаев не желательно, т.к. нивелирует полезный эффект от их применения.

**Громоздкие и необычные для живой природы структуры (ДДТ):**

- *разлагаются в результате нескольких ферментативных реакций;*
- *их деградация монокультурой микроорганизмов сопровождается накоплением продуктов частичной трансформации, которые разлагаются медленно или вообще не разлагаются.*

Полная минерализация **устойчивых пестицидов** может происходить в результате *кометаболизма* с более биодоступными соединениями и *воздействия смешанных культур*.

# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ БИОДЕГРАДАЦИЯ ПЕСТИЦИДОВ

## Начальные стадии биodeградации

- **гидролиз** (*амиды и эфиры*) – сравнительно быстро разлагаются в природных условиях;
- **дезалкилирование** / **дегалогенирование** (*хлорсодержащие ароматические и алифатические соединения*) – более устойчивы к трансформации.

## Возможные последующие реакции биodeградации пестицидов:

- гидроксילирование;
- $\beta$ -окисление алифатической цепи;
- расщепление ароматического кольца;
- окислительное дезаминирование;
- O- и N-дезалкилирование;
- эпоксидация;
- окисление тиоэфиров;
- десульфуризация;
- восстановление нитрогруппы, эдр.



# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ БИОДЕГРАДАЦИЯ ПЕСТИЦИДОВ

## Возможные результаты биodeградации пестицидов:

- **детоксикация и инактивация пестицида** - полная потеря токсических свойств;
- **активация (токсификация) пестицида** – превращение в более токсичное соединение;

*2,4 Д → 2,4 дихлорфенол → дихлорпирокатехин  
пропанид → ДХА → дихлорпирокатехин*

- превращение пестицида в соединение с **другим спектром ингибирующих свойств**;

*дегалогенирование*

*тиобенкарб → s-бензил-NN-диэтилтиокарбамат*

подавляет рост риса, применяется в комплексе с метоксифеноном – ингибитором дехлорирующего фермента микроорганизмов

- **образование соединения, обладающего стимулирующим эффектом**;
- **образование токсичных соединений** за счет конъюгации пестицидов с различными микробными метаболитами;
- **образование связанных остатков**, трудно доступных для биodeградации, в результате связывания пестицидов и промежуточных продуктов их трансформации с функциональными группами природных полимеров

# МИКРОБНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ПЕСТИЦИДОВ

## Факторы, определяющие устойчивость пестицидов к биотрансформации *отсутствие условий для эффективной микробной трансформации*

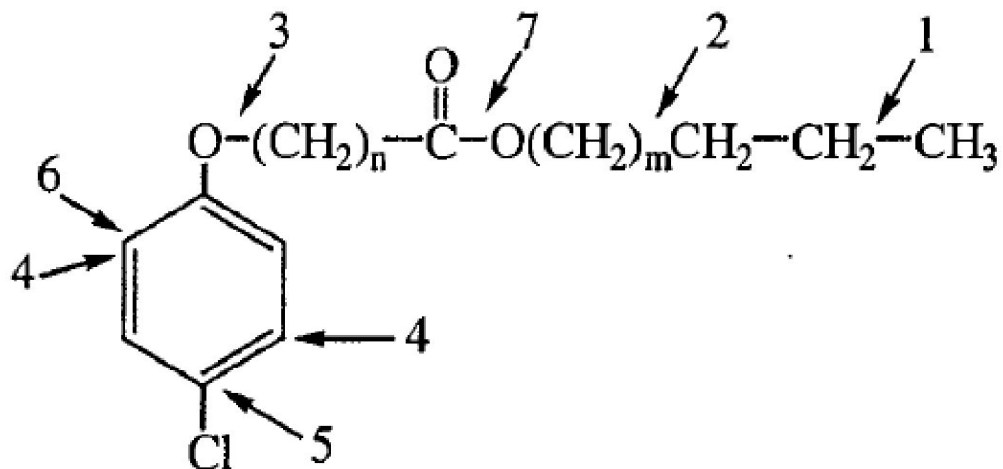
- низкая скорость транспорта пестицидов к микробной клетке;
- отсутствие органических субстратов для биodeградации пестицида в режиме кометаболизма;
- снижение биодоступности пестицидов в результате сорбции почвенными частицами и коллоидами;
- сорбция почвенными частицами внеклеточных ферментов, осуществляющих биотрансформацию;
- неоптимальные физико-химические факторы среды (*температура, pH, влажность, аэрация*).

В **аэробных условиях** биотрансформация большинства пестицидов идет активнее, чем в анаэробных. В **анаэробных условиях**, или при чередовании анаэробных и аэробных условий, лучше разлагаются пестициды с большим количеством электрон-акцепторных групп (линдан, ДДТ, гептахлор, альдрин).

Для ускорения деградации пестицидов в почву вносят солому или зеленую растительную массу (создание оптимальных окислительно-восстановительных условий), аммонийные удобрения, мочевины, серу (доноры электронов для анаэробных процессов окисления).

# ДЕГРАДАЦИЯ ФЕНОКСИАЛКИЛКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

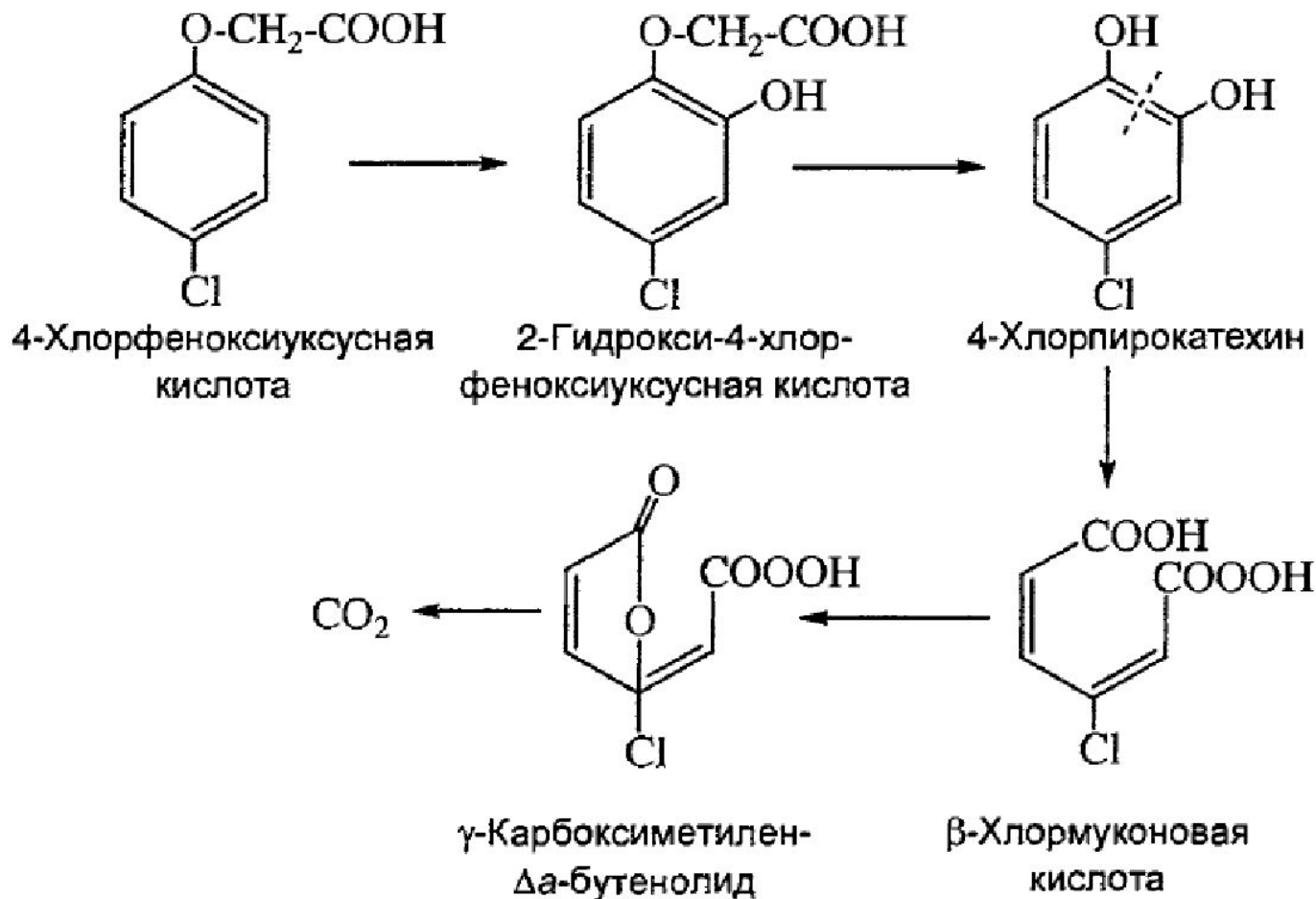
*используются как регуляторы роста и избирательные гербициды*



**Возможные точки  
первичной атаки  
2,4,5-  
трихлорфеноксиуксусной  
кислоты**

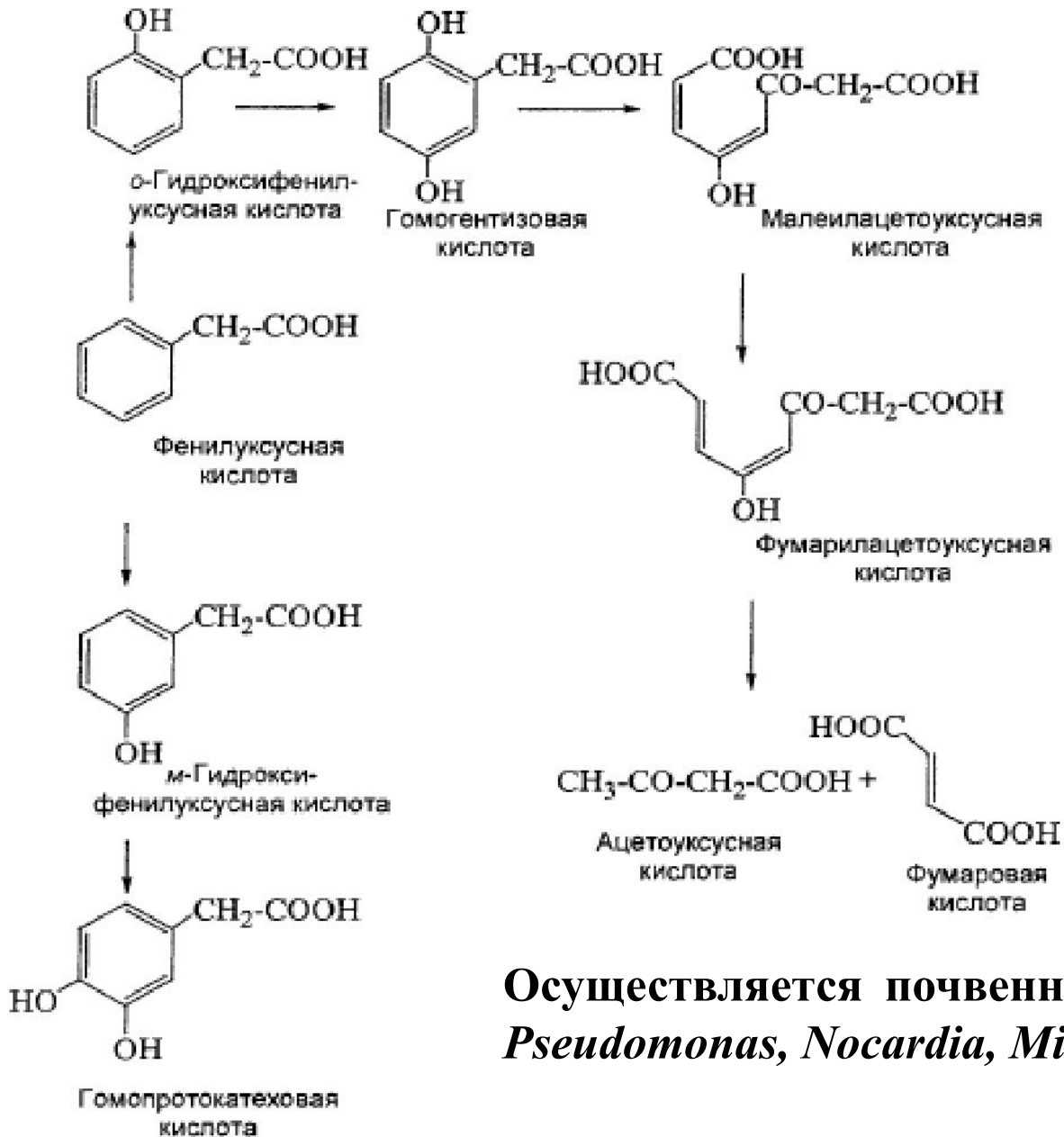
- 1 – гидроксирование терминального метила алифатической цепи;
- 2 –  $\beta$ -окисление;
- 3 – окислительное расщепление эфирной связи;
- 4 – гидроксирование ароматического кольца;
- 5 – окислительное дехлорирование;
- 6 – расщепление ароматического кольца;
- 7 – гидролитическое расщепление эстеразой.

# Биотрансформация 4-хлорфеноксиуксусной кислоты



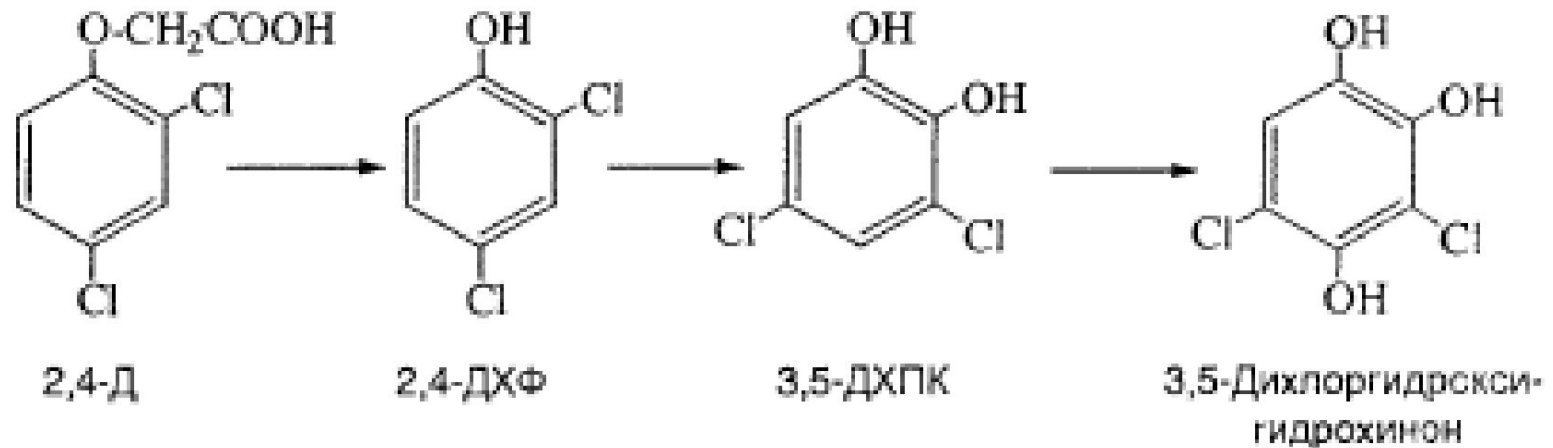
- осуществляется бактериями;
- ключевые интермедиаты – 2-гидрокси-4 хлорфеноксиуксусная кислота, 4-хлорпирокатехин;
- конечные продукты – уксусная кислота (восстановление); гликолевая кислота (гидролиз); глиоксильная кислота (окисление)

# Биодеградация феноксиуксусных кислот



Осуществляется почвенными бактериями родов *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Micrococcus*

# Аэробное расщепление 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д)

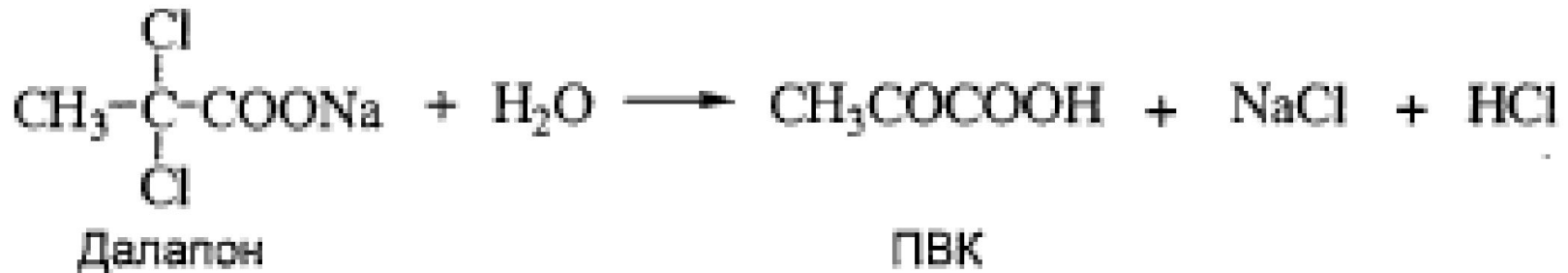


- В **аэробных условиях** начинается с **элиминирования ацетатной группы** с последующим **гидроксилированием** хлорированного ароматического кольца, осуществляется бактериями родов *Flavobacterium* sp., *Achromobacter* sp., *Clostridium* sp., *Nocardia simplex*;
- В **анаэробных условиях** трансформацию осуществляют бактерии рода *Clostridium*;
- Методами генной инженерии получены штаммы, способные эффективно разлагать 2,4-Д и 2,4,5-Т, использовать их в качестве единственного источника углерода и энергии, достигая скорости роста  $0,12 - 0,14 \text{ ч}^{-1}$  и более.

# БИОДЕГРАДАЦИЯ ХЛОРИРОВАННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

*ТХУ, 2,2-дихлорпропионовая кислота, далапон,  
используются как гербициды*

## Микробная трансформация далапона

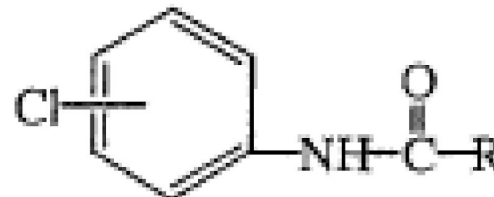
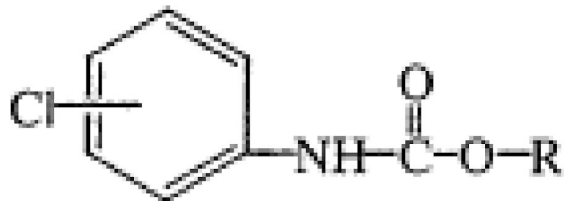


Первая реакция – гидролитическое дехлорирование.

В странах с умеренным климата в результате самоочищения ТХУ и далапон удаляются из почвы за 30-90 суток

# БИОДЕГРАДАЦИЯ КАРБАМАТОВ

*пропанид, диурон, хлорпрофам, севин*



## Химическая структура хлорированных фенилкарбаматов и фениламинов

- свободная карбаминовая кислота нестойка, однако карбаматы *редко минерализуются полностью*;
- *наиболее устойчивы* к биодegradации хлорированные фенилкарбаматы и фениламины;
- в результате гидролиза карбаматы распадаются до *анилиновых оснований* (возможна токсификация);
- гидролитической активностью в отношении карбаматов обладают бактерии родов *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, дрожжи и плесневые грибы родов *Penicillium*, *Pullularia*.

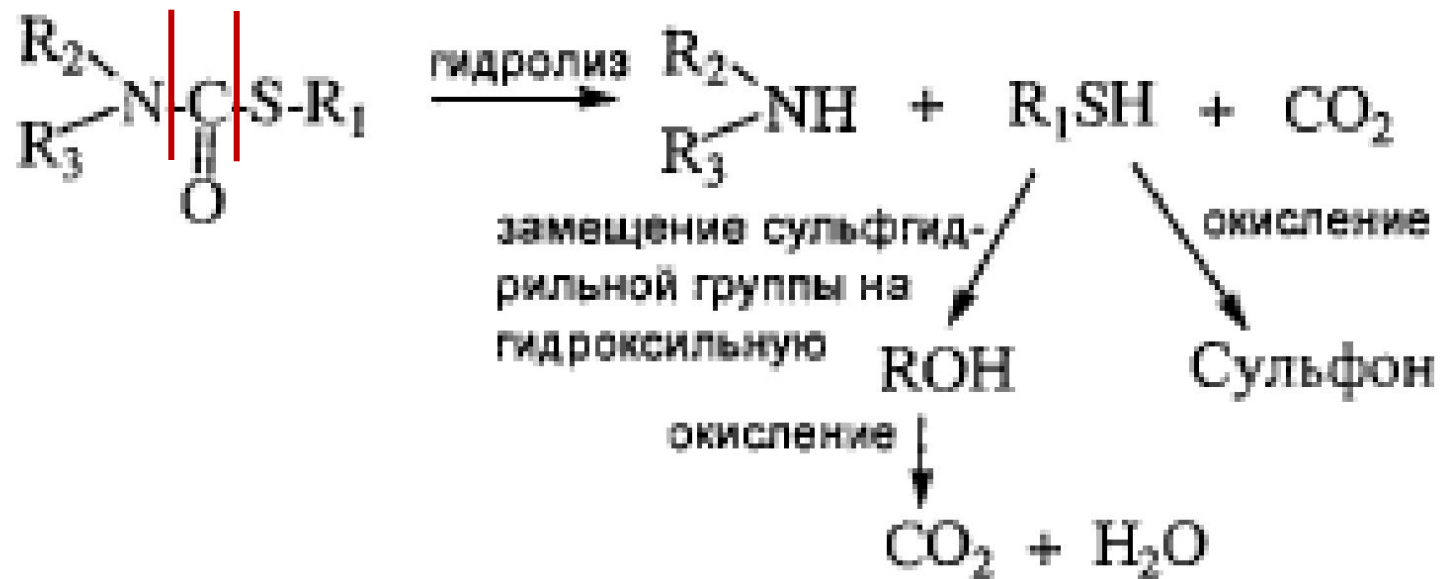


# БИОДЕГРАДАЦИЯ ТИОКАРБАМАТОВ

## *эптам, меркаптан – гербициды*

- в почве сравнительно легко метаболизируются микроорганизмами;
- используются микроорганизмами в качестве источников азота;
- ферментная атака может происходить в алкильных группах, по амидной и тиоэфирной связи.

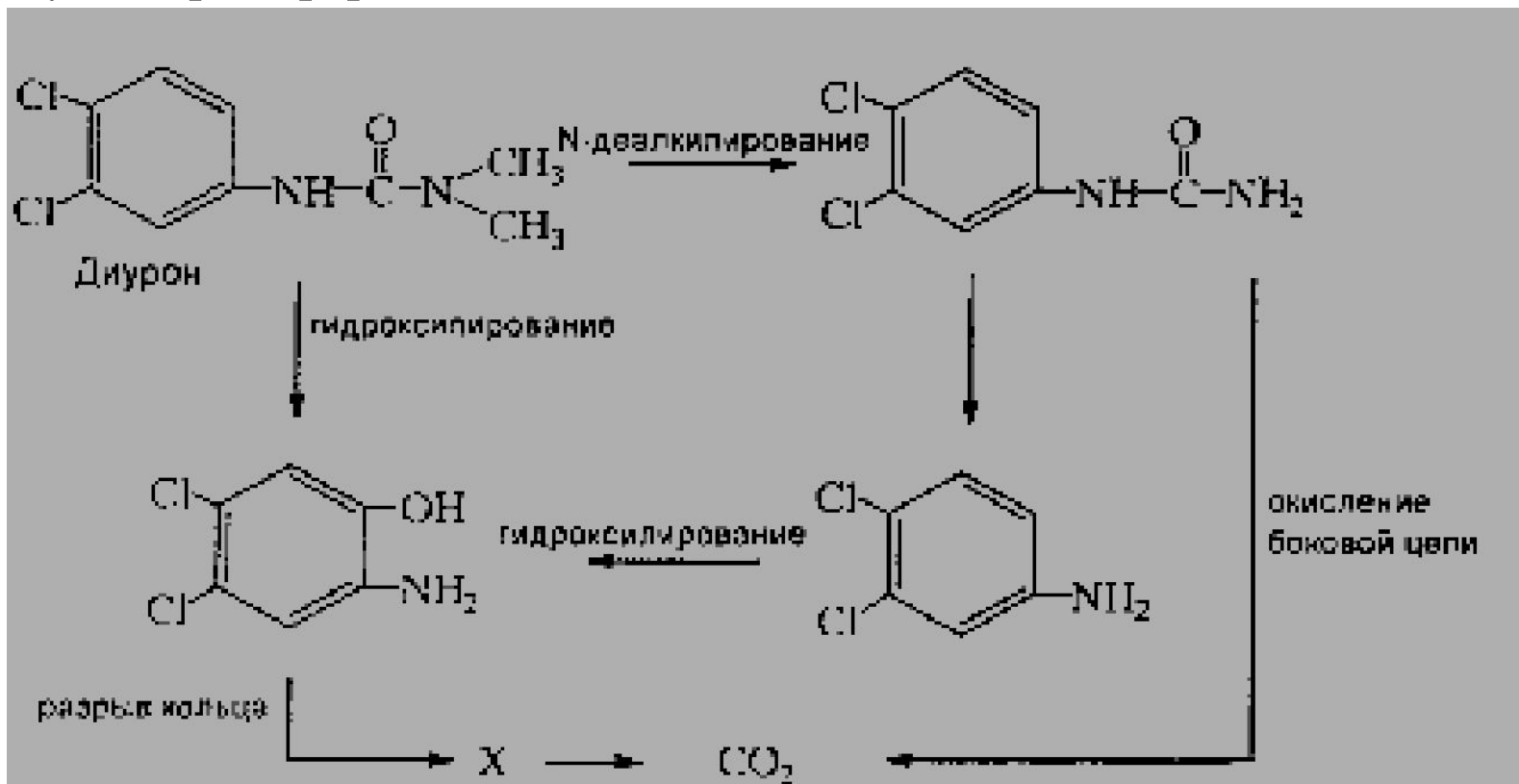
## Микробиологическая трансформация меркаптана



# БИОДЕГРАДАЦИЯ ПРОИЗВОДНЫХ МОЧЕВИНЫ

*фенурон, диурон, монурон, линурон – широко применяемые гербициды*

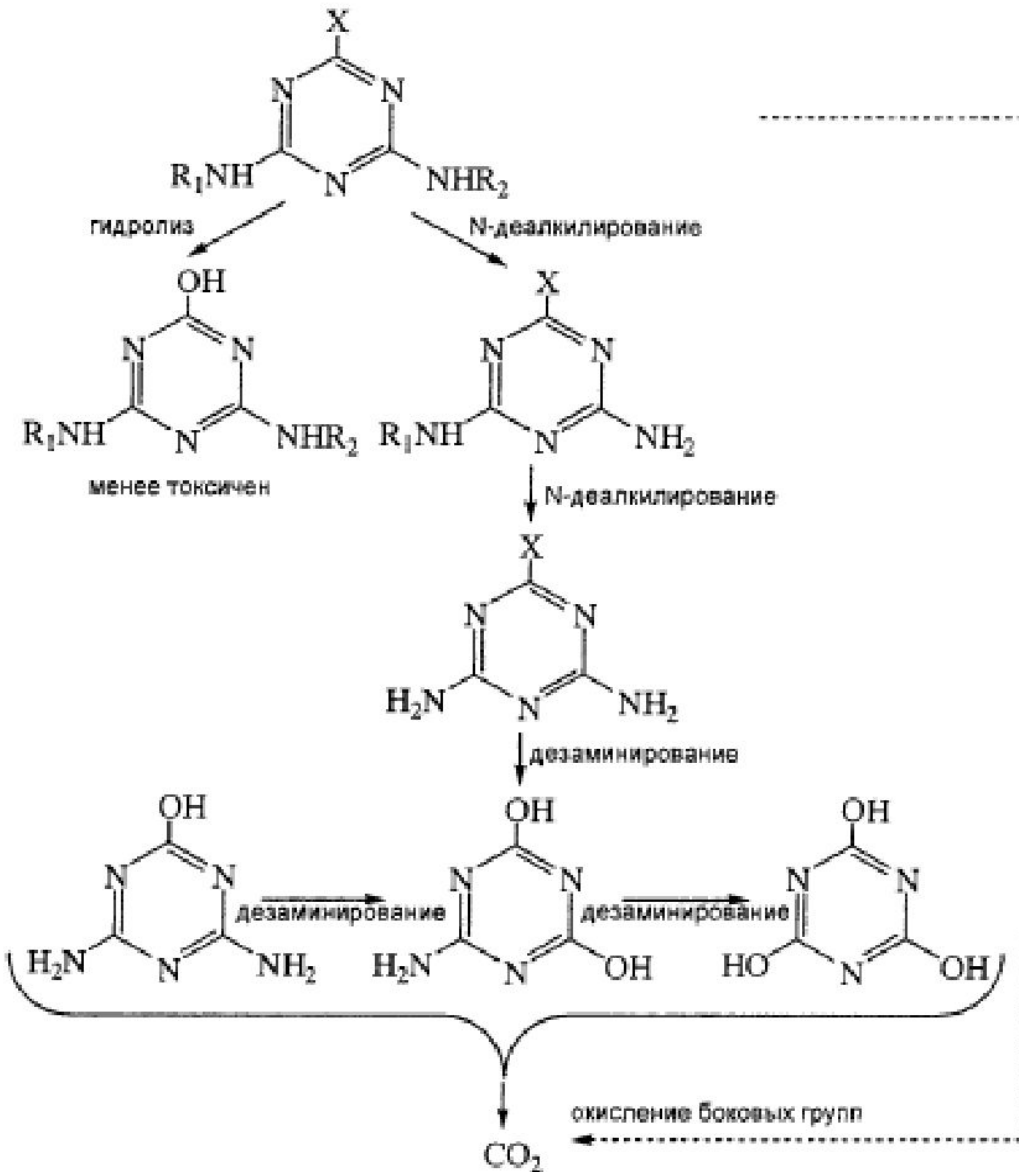
- разлагаются бактериями родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Sarcina*, *Bacillus*, грибами родов *Penicillium*, *Aspergillus*;
- реакции деметилирования, декарбоксилирования, дезаминирования и гидроксирования в кольце;
- продукты трансформации не токсичны или вообще не активны.



**Микробиологическая деградация гербицида диурона**

# БИОДЕГРАДАЦИЯ ТРИАЗИНОВ

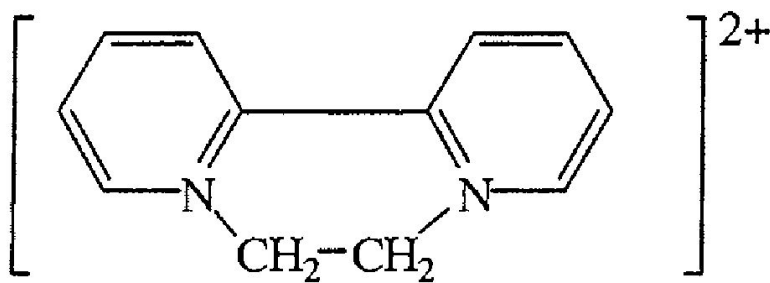
*симазин, атразин, аметрин, прометрин – гербициды*



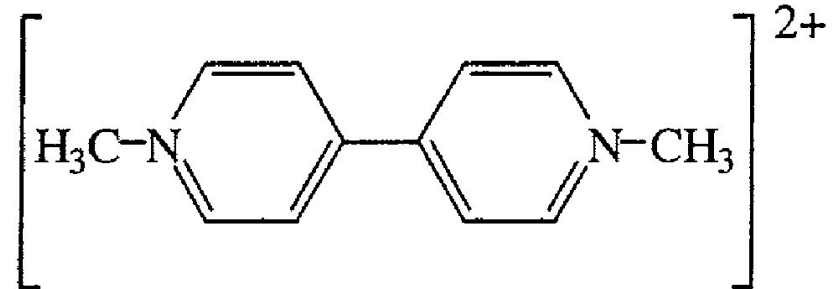
- основа молекулы — циануровая кислота;
- используются микроорганизмами в качестве источников углерода и азота;
- основные реакции трансформации — гидролиз,  $N$ -алкилирование, расщепление кольца, окисление боковых цепей;
- продукты гидролиза не обладают свойствами гербицидов.

# БИОДЕГРАДАЦИЯ ДИПИРИДИЛОВ

*дикват, паракват – гербициды, применяются для борьбы с сорняками полей, водными растениями*



Дикват

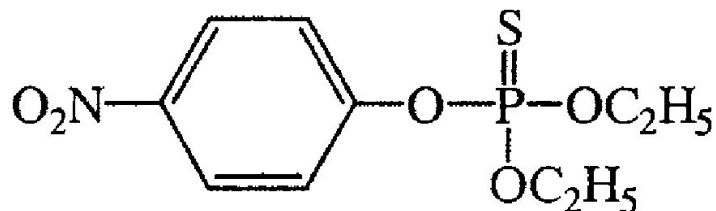


Паракват

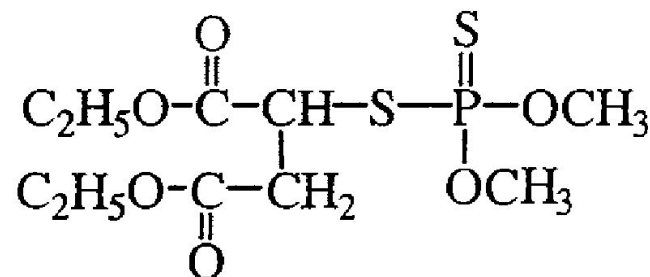
- Разлагается аэробными бактериями *Corynebacterium fascians* и анаэробными бактериями *Clostridium pasteurianum*.
- Дрожжи *Lipomyces starkeyi* используют паракват в качестве единственного источника азота при его концентрации 20 г/л.

# БИОДЕГРАДАЦИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

эфиры и тиоэфиры фосфорной кислоты – паратион (тиофос), дихлофос, малатион (карбафос), китазин, диазинон – инсектициды



Паратион



Малатион

- считаются нестойкими, но достаточно устойчивы к деградации во внешней среде;
- в начале деградации происходит гидролиз эфирной и тиоэфирной связи;
- гидролиз ФОС протекает в присутствии бактерий родов *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, дрожжей и мицелиальных грибов с участием эстераз.
- в оптимальных условиях в смешанных культурах скорость деградации может достигать 0,5 г/л сутки и выше.