

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-обогачительные 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 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

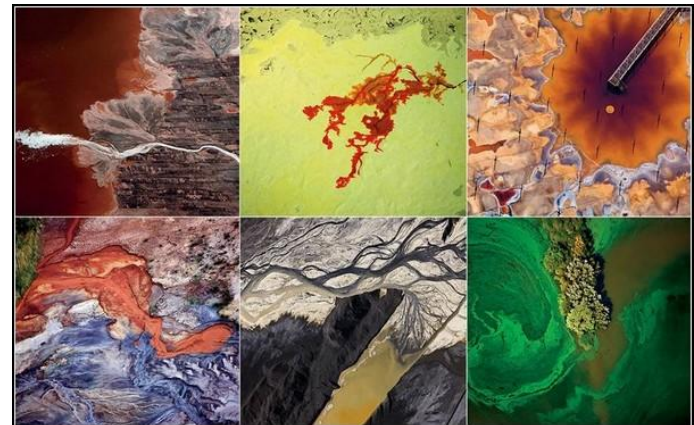
загрязнение среды материалами, оказывающими механическое воздействие без химических последствий. Может возникать при изъятии грунтов в процессе дноуглубительных работ, поступлении пыли в атмосферу, свалке строительного мусора на земельном участке.

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 CO_2 , H_2O , 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 > C₁₄-C₁₆ бициклические алканы > стераны > диастераны.

БИОДОСТУПНОСТЬ НЕКОТОРЫХ КЛАССОВ КСЕНОБИОТИКОВ

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

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 – NO_3^- , SO_4^{2-} , Fe^{3+} , Mn^{4+} , в качестве *восстановителя* используются восстановленные неорганические соединения (NH_4^+ , NO_2^- , H_2S , Fe^{2+} , 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:

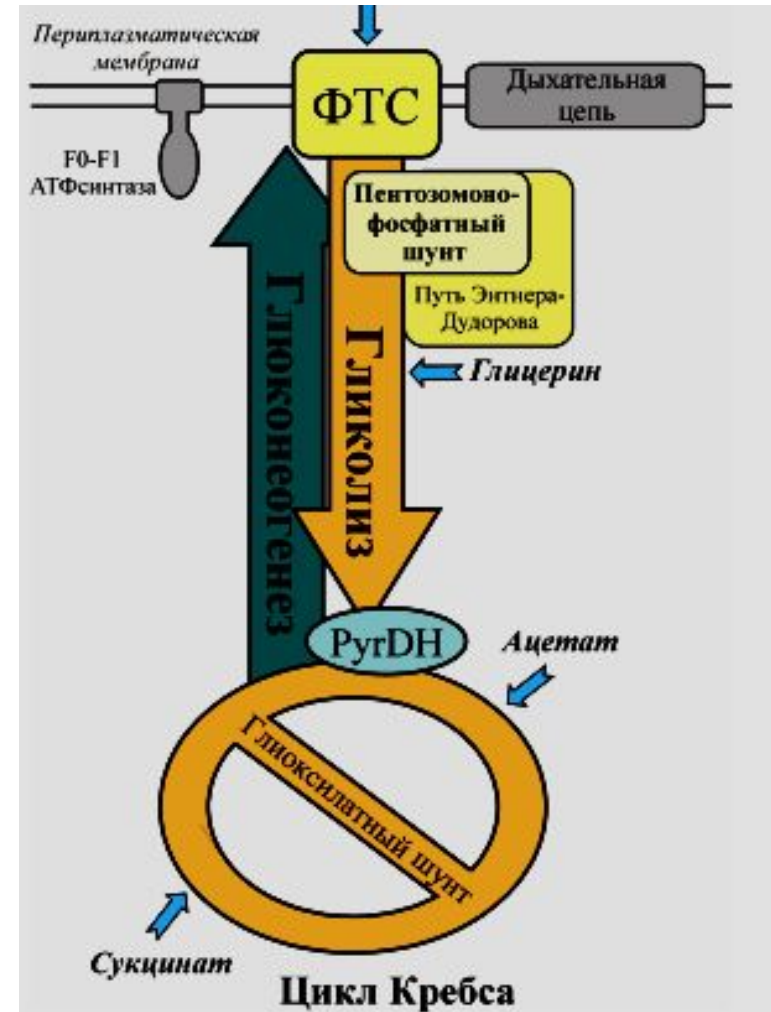
- окисление;
- восстановление;
- гидролиз;
- дезаминирование;
- декарбоксилирование;
- конъюгация;
- дегалогенирование

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;**
- **β -окисление жирных кислот;**
- **гидролиз эфирных связей;**
- **образование эпоксидов и сульфоксидов;**
- **окислительное расщепление ароматического и гетероциклического колец;**
- **гидролиз** (эстеразы, фосфотазы, лиазы) – расщепление эфирных, фосфоэфирных и амидных связей.

Анаэробные условия:

- **восстановление** (нитрогруппы в аминогруппу, насыщение двойных и тройных связей, восстановительное дегалогенирование, др.);
- **гидролиз** (эстеразы, фосфотазы, лиазы) – 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.

Углеводородокисляющие 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*.

Углеводородокисляющие 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 углеводородокисляющих бактерий всегда выше по сравнению с не загрязненными, хотя количественная связь между численностью углеводородокисляющих бактерий и количеством углеводов в среде отсутствует;*

При загрязнении биотопа нефтью или нефтепродуктами происходит постепенная смена доминантов микробного сообщества, состав доминирующих родов углеводородокисляющих 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*, *Actinomadura*, *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%**.

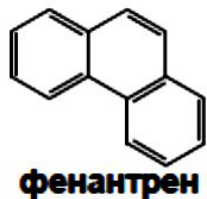
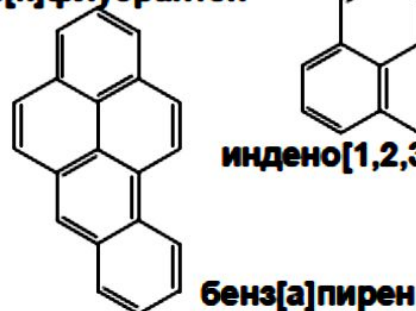
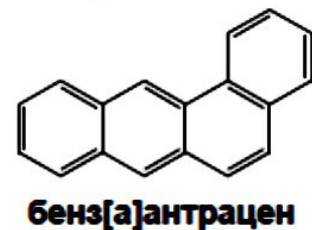
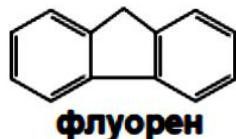
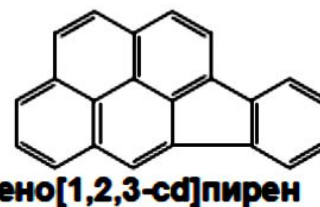
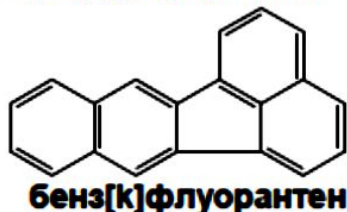
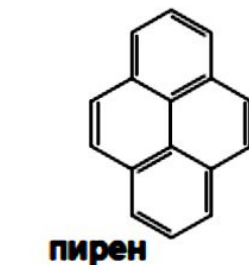
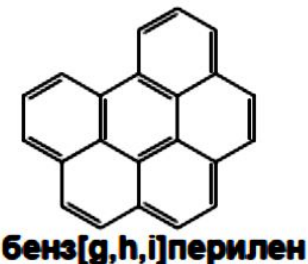
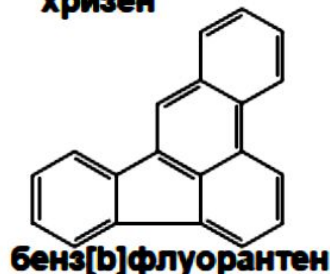
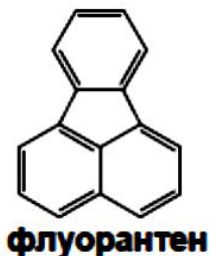
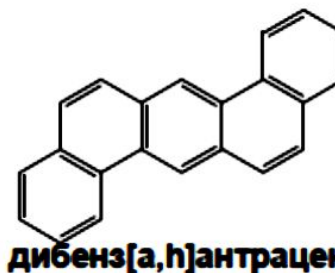
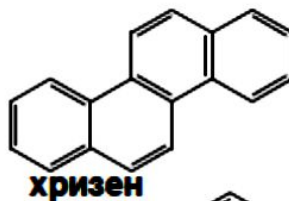
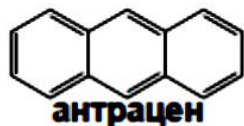
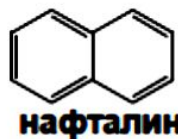
В благоприятных условиях основной *процесс биодеструкции* может протекать за **3-4 недели**, при этом численность углеводородоокисляющих микроорганизмов увеличивается в 100-1000 раз, изменяется численность других гетеротрофных микроорганизмов.

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 gentinae*, *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.*

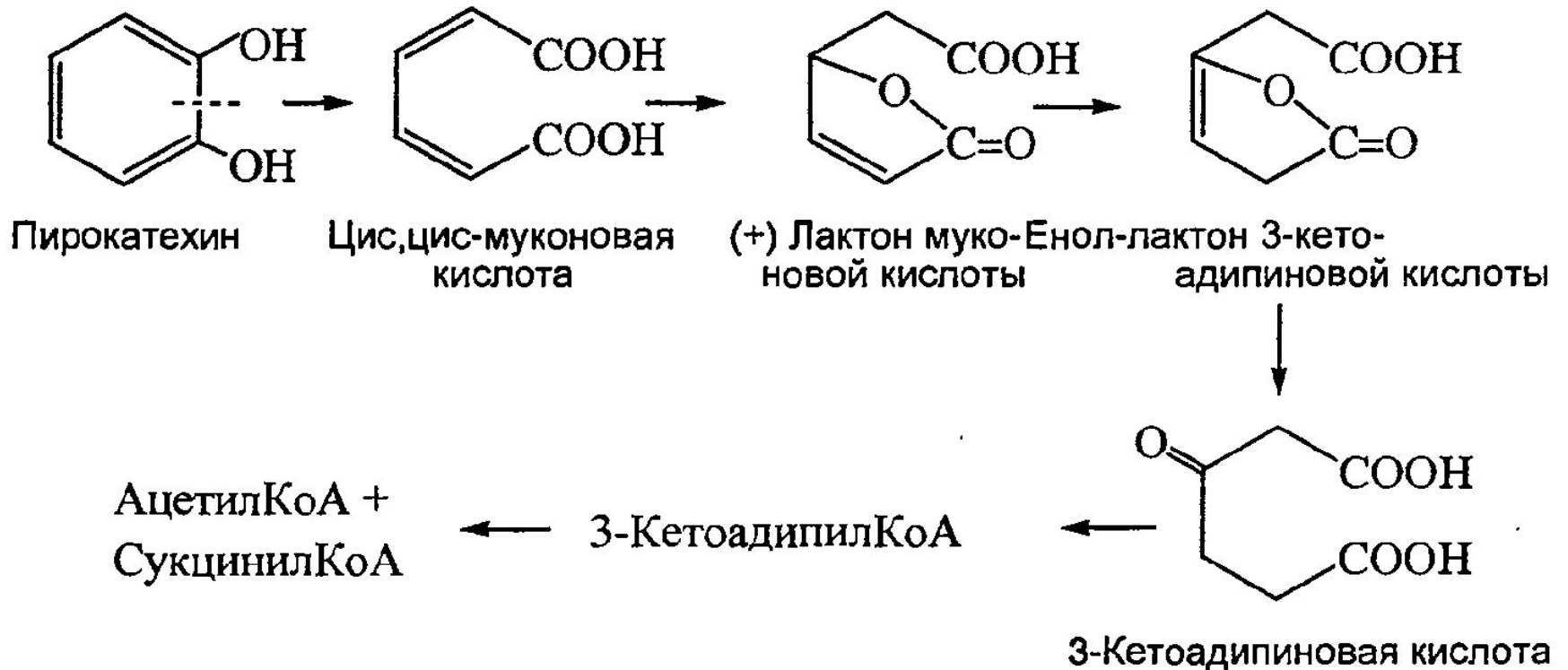
Ферменты – *дециклизирующие диоксигеназы (ДГ)*

Типы расщепления:

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

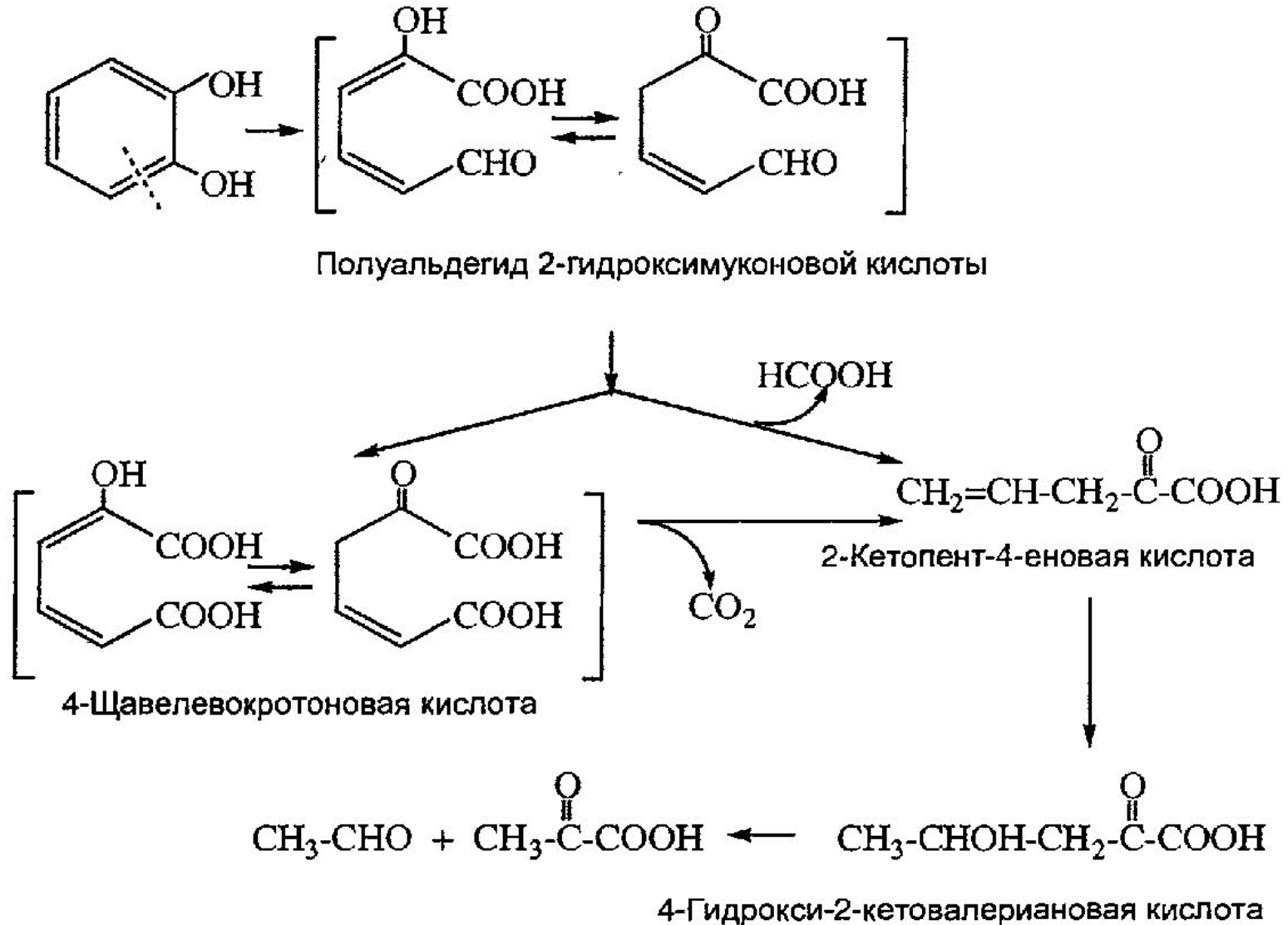
Пути биодegradации ПАУ у бактерий рода *Pseudomonas*

Орто-путь расщепления (интрадиольный)



Пути биодegradации ПАУ у бактерий рода *Pseudomonas*

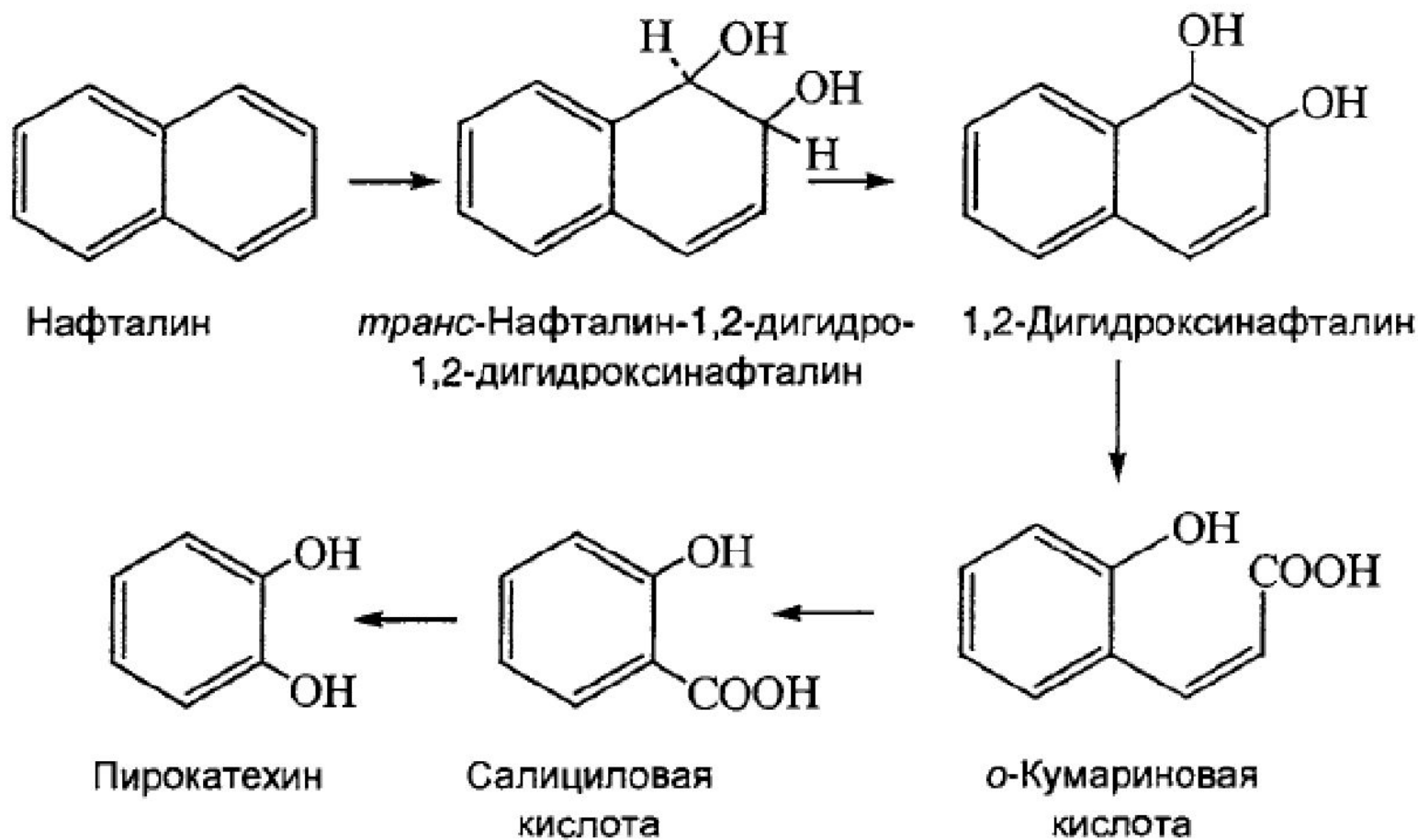
Мета-путь расщепления (экстрадиольный)



МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕГРАДАЦИЯ НАФТАЛИНА

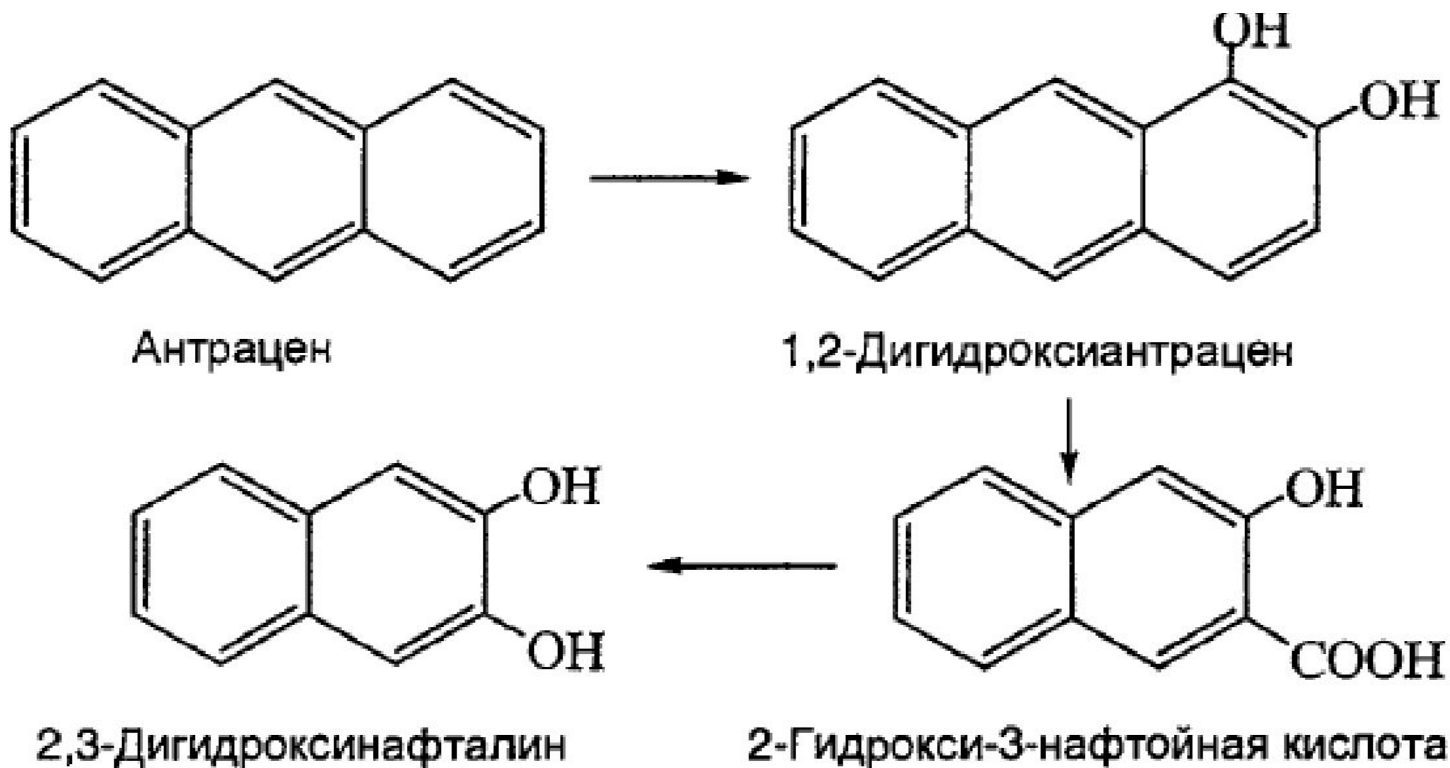
Наиболее часто происходит через образование *1,2-дигидроксинафталина* и *салициловой кислоты*

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



МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕГРАДАЦИЯ АНТРАЦЕНА

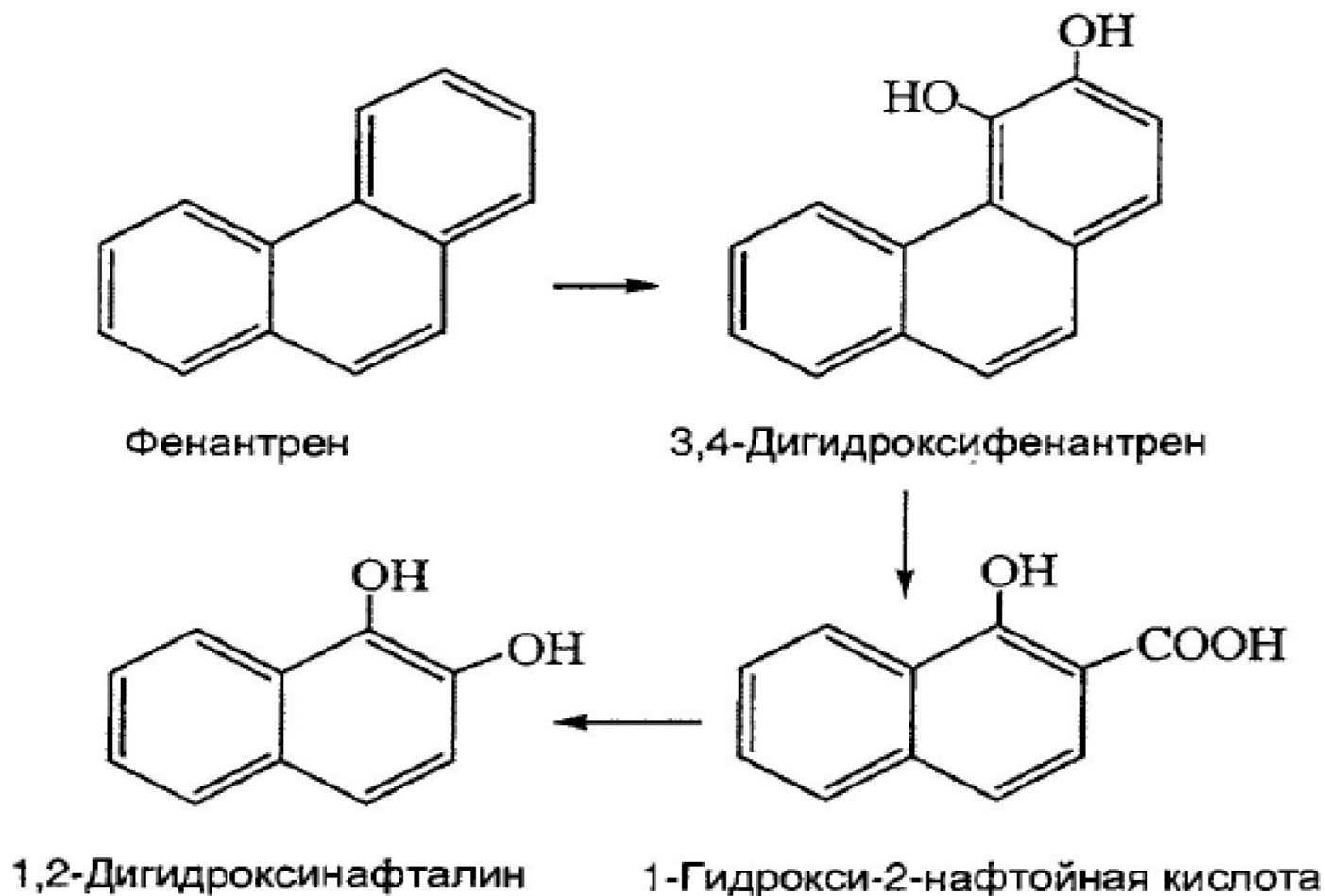
окисляется через *2-гидрокси-3-нафтойную кислоту*



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 -ONa, -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, хлорсульфанол* – 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) – *сульфанолаы 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 CO_2 и H_2O .

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.

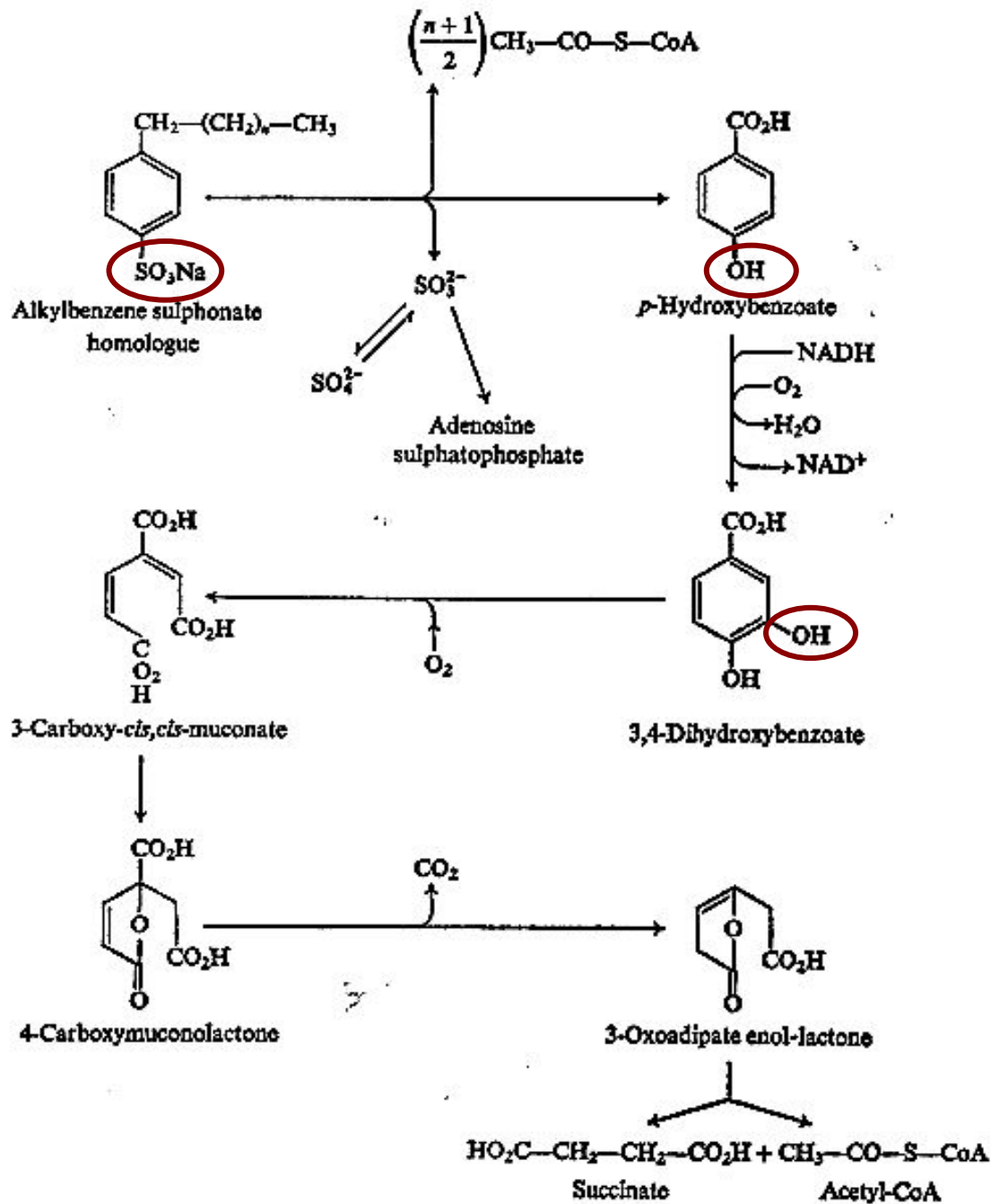
- **Пейн (W. J. Payne) в 1963 году** из почвы, взятой в районе очистного сооружения, методом накопительного культивирования выделил 2 штамма *Pseudomonas* sp. и 2 штамма *Nocardia* sp., способных к деградации анионных ПАВ.

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 β -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 β -окислению, их биохимическое окисление происходит в процессе ω -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 β -кетoadипиновой кислоты, которая подвергается β -окислению)



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

Этапы биodeградации ПАВ

1. Дeградация *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 оксиэтилаты разрушаются быстро и полностью;
 - наличие разветвленных цепей, присутствие гомологов и изомеров замедляет процесс биохимического окисления.

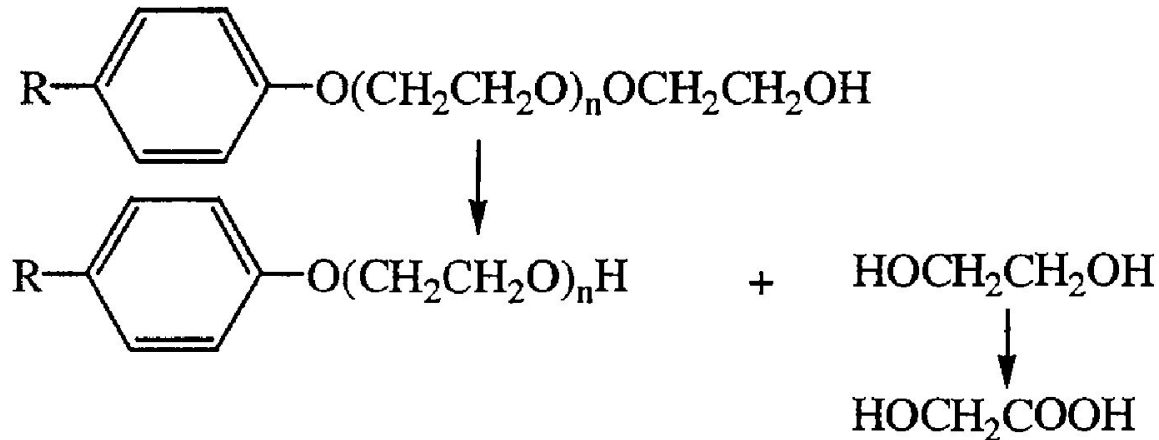


Схема бактериального окисления оксиэтилатов алкилфенолов

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

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ БИОДЕГРАДАЦИЯ ПЕСТИЦИДОВ

Возможные результаты биодegradации 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 биодegradации, 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*

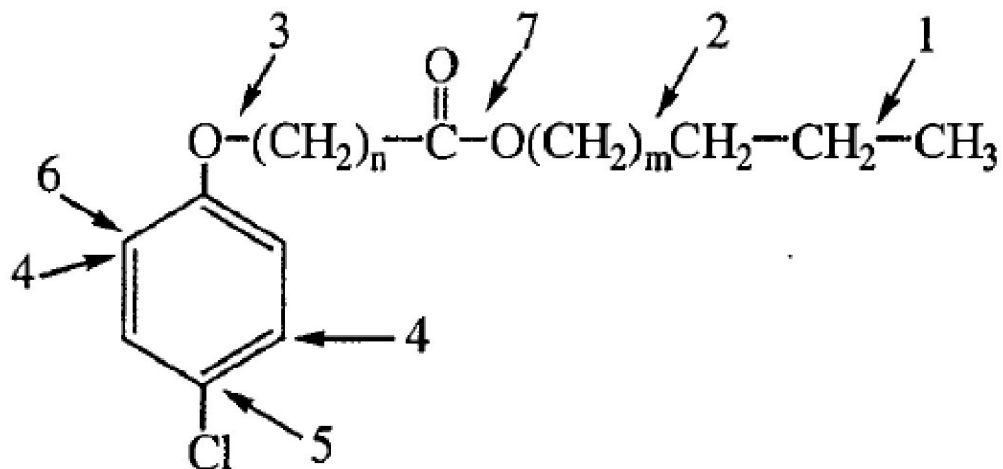
- низкая скорость транспорта пестицидов к микробной клетке;
- отсутствие органических субстратов для биodeградации пестицида в режиме кометаболизма;
- снижение биодоступности пестицидов в результате сорбции почвенными частицами и коллоидами;
- сорбция почвенными частицами внеклеточных ферментов, осуществляющих 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

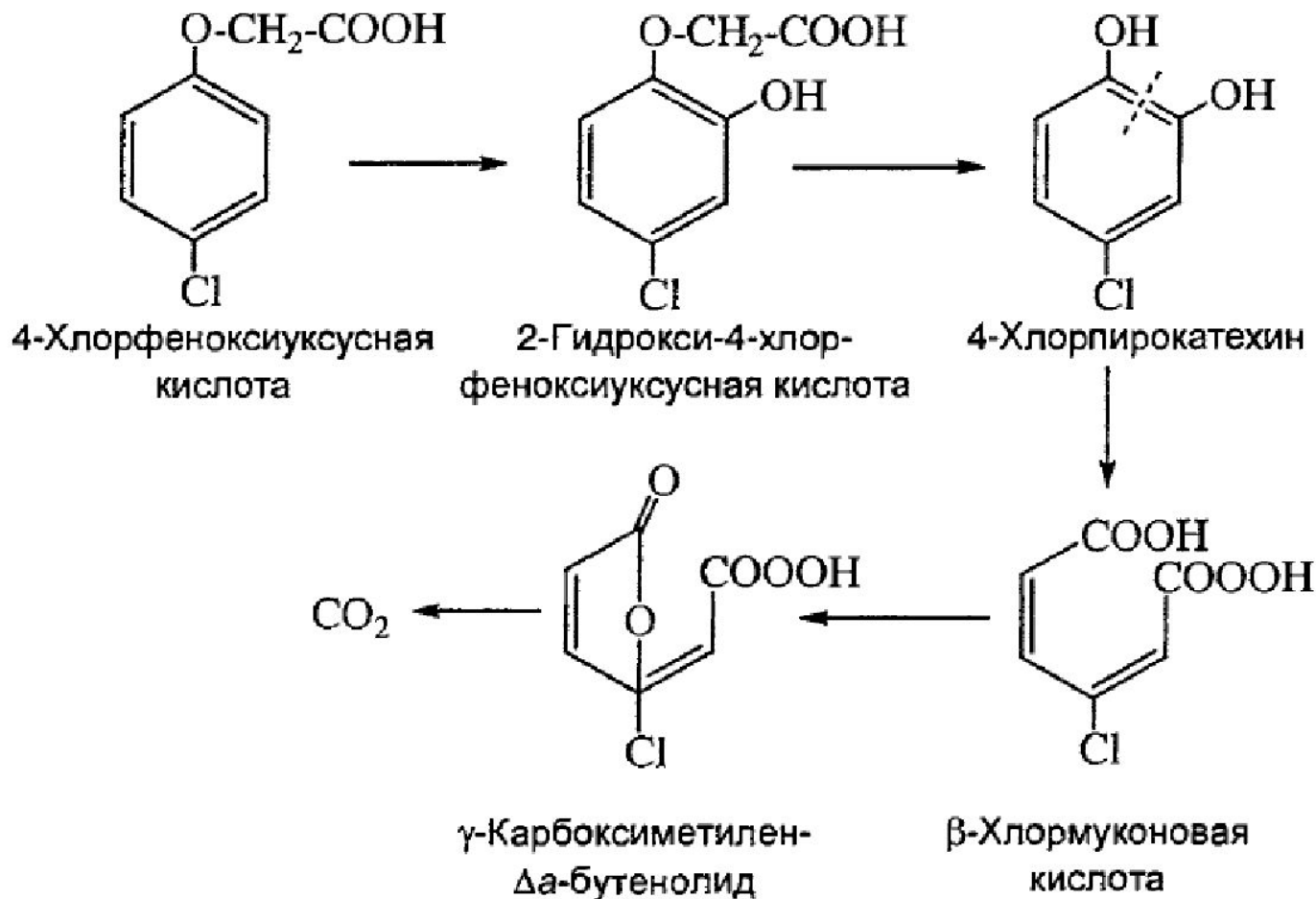
используются как регуляторы роста и избирательные гербициды



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

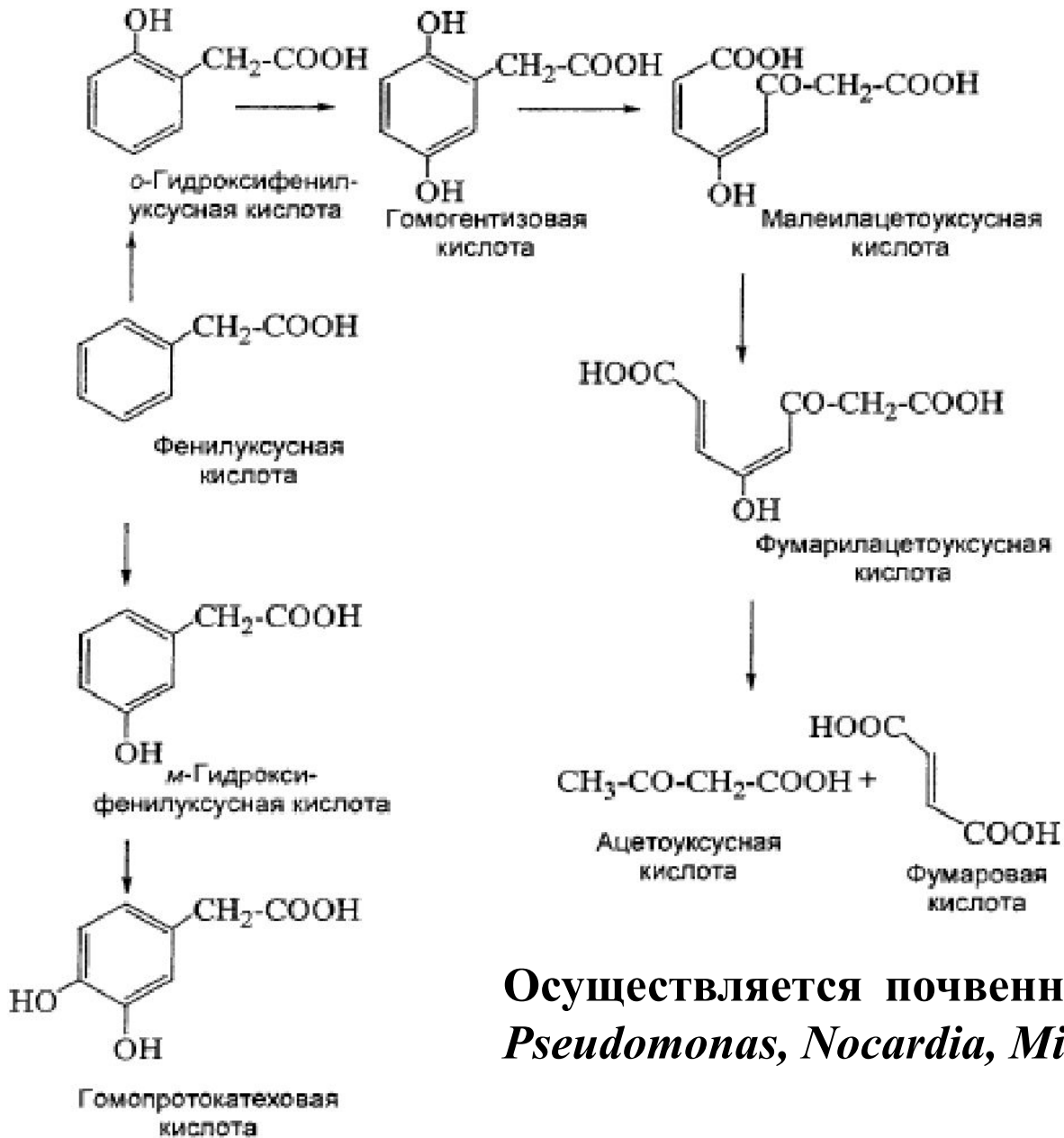
- 1 – гидроксирование терминального метила алифатической цепи;
- 2 – β -окисление;
- 3 – окислительное расщепление эфирной связи;
- 4 – гидроксирование ароматического кольца;
- 5 – окислительное дехлорирование;
- 6 – расщепление ароматического кольца;
- 7 – гидролитическое расщепление эстеразой.

Биотрансформация 4-хлорфеноксиуксусной кислоты



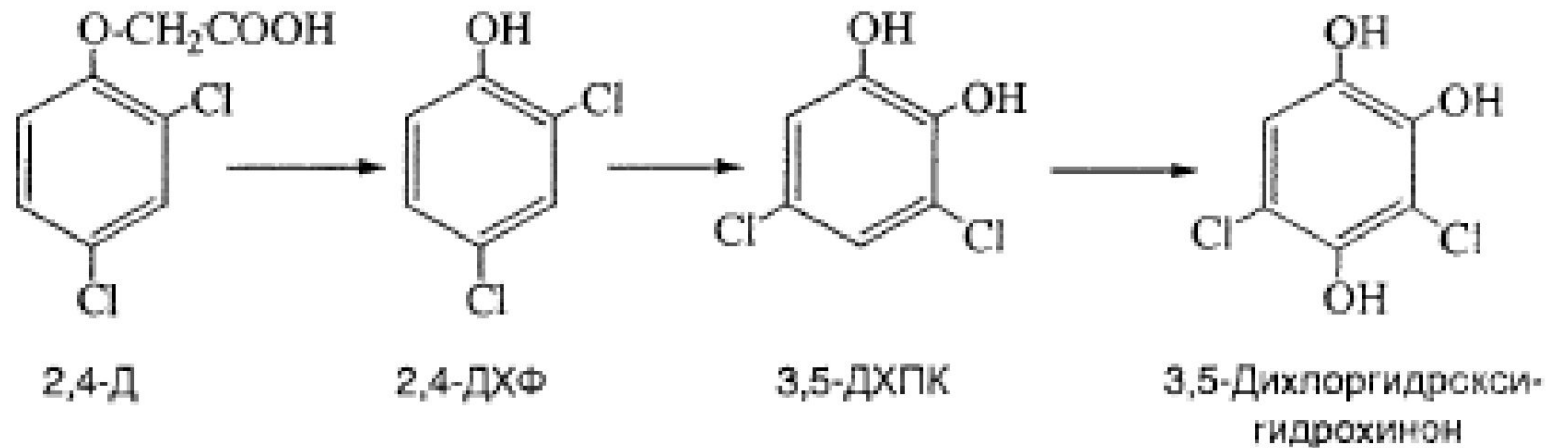
- осуществляется бактериями;
- ключевые интермедиаты – 2-гидрокси-4 хлорфеноксиуксусная кислота, 4-хлорпирокатехин;
- конечные продукты – уксусная кислота (восстановление); гликолевая кислота (гидролиз); глиоксильная кислота (окисление)

Биодеградация феноксиуксусных кислот



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

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

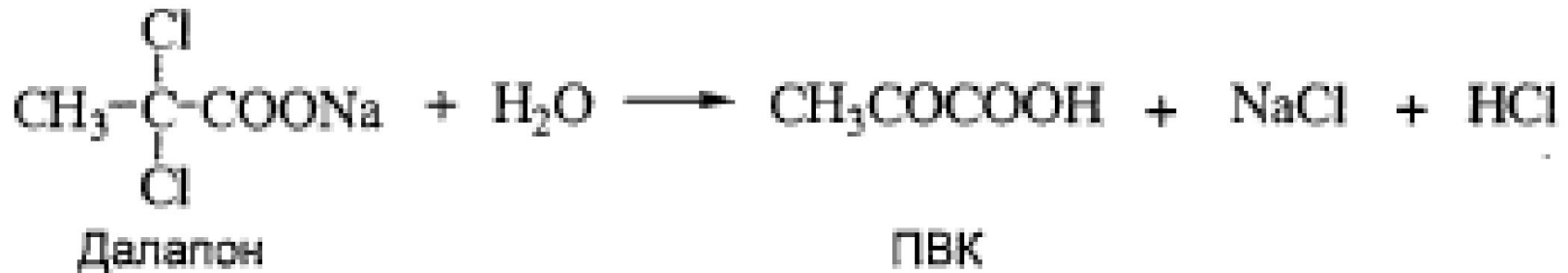


- В **аэробных условиях** начинается с **элиминирования ацетатной группы** с последующим **гидроксилированием** хлорированного ароматического кольца, осуществляется бактериями родов *Flavobacterium* sp., *Achromobacter* sp., *Clostridium* sp., *Nocardia simplex*;
- В **анаэробных условиях** трансформацию 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

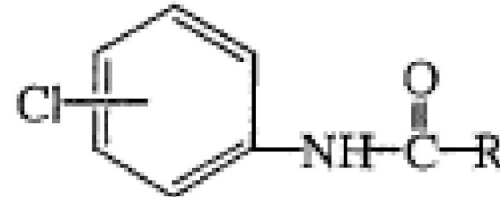
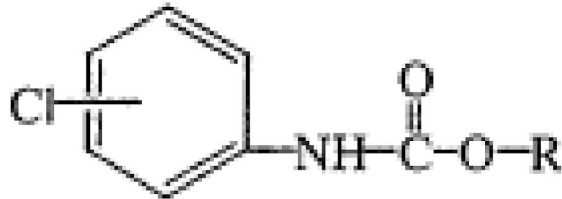


Первая реакция – гидролитическое дехлорирование.

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 биodeградации 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.

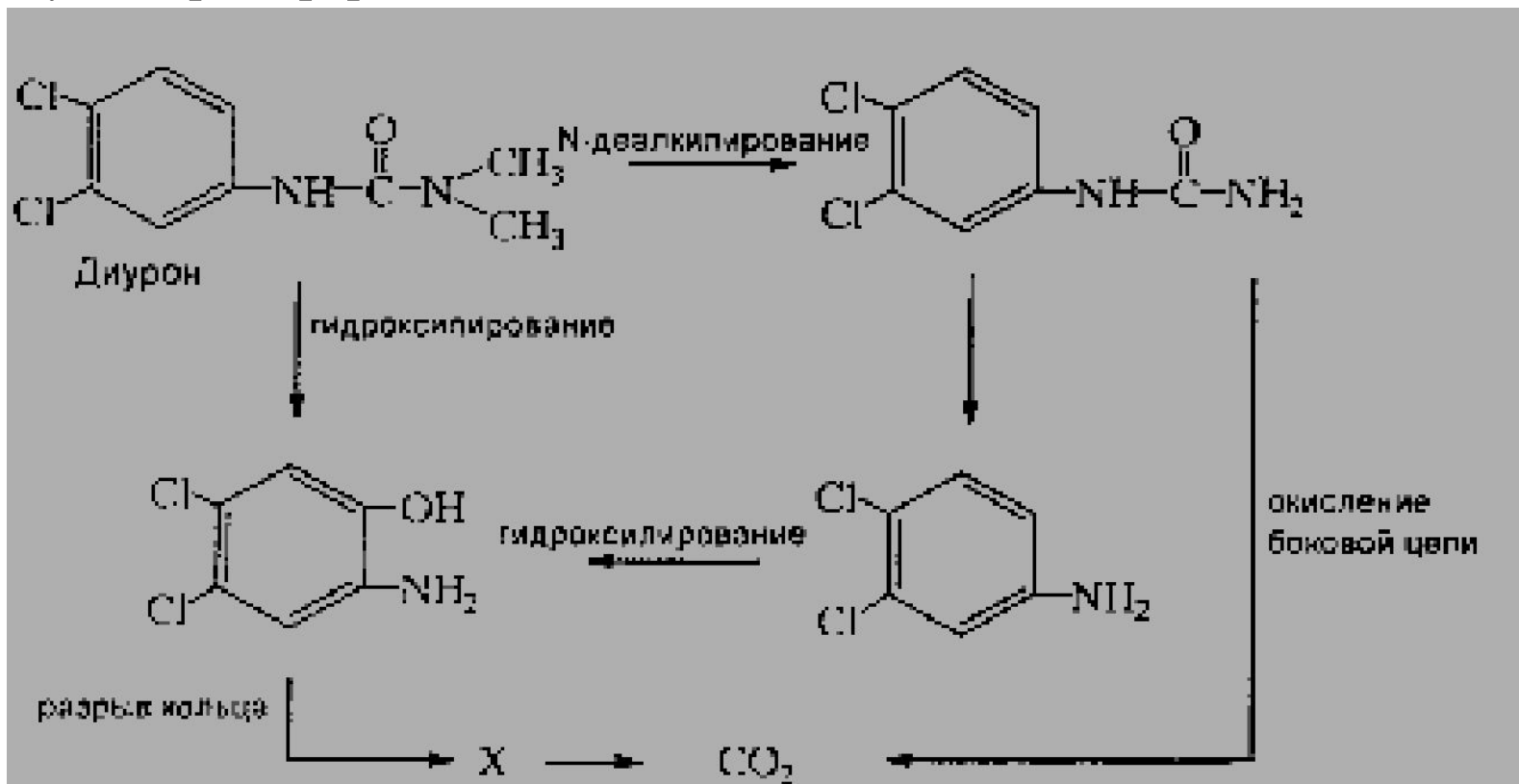
Микробиологическая трансформация меркаптана



БИОДЕГРАДАЦИЯ ПРОИЗВОДНЫХ МОЧЕВИНЫ

фенурон, диурон, монурон, линурон – широко применяемые гербициды

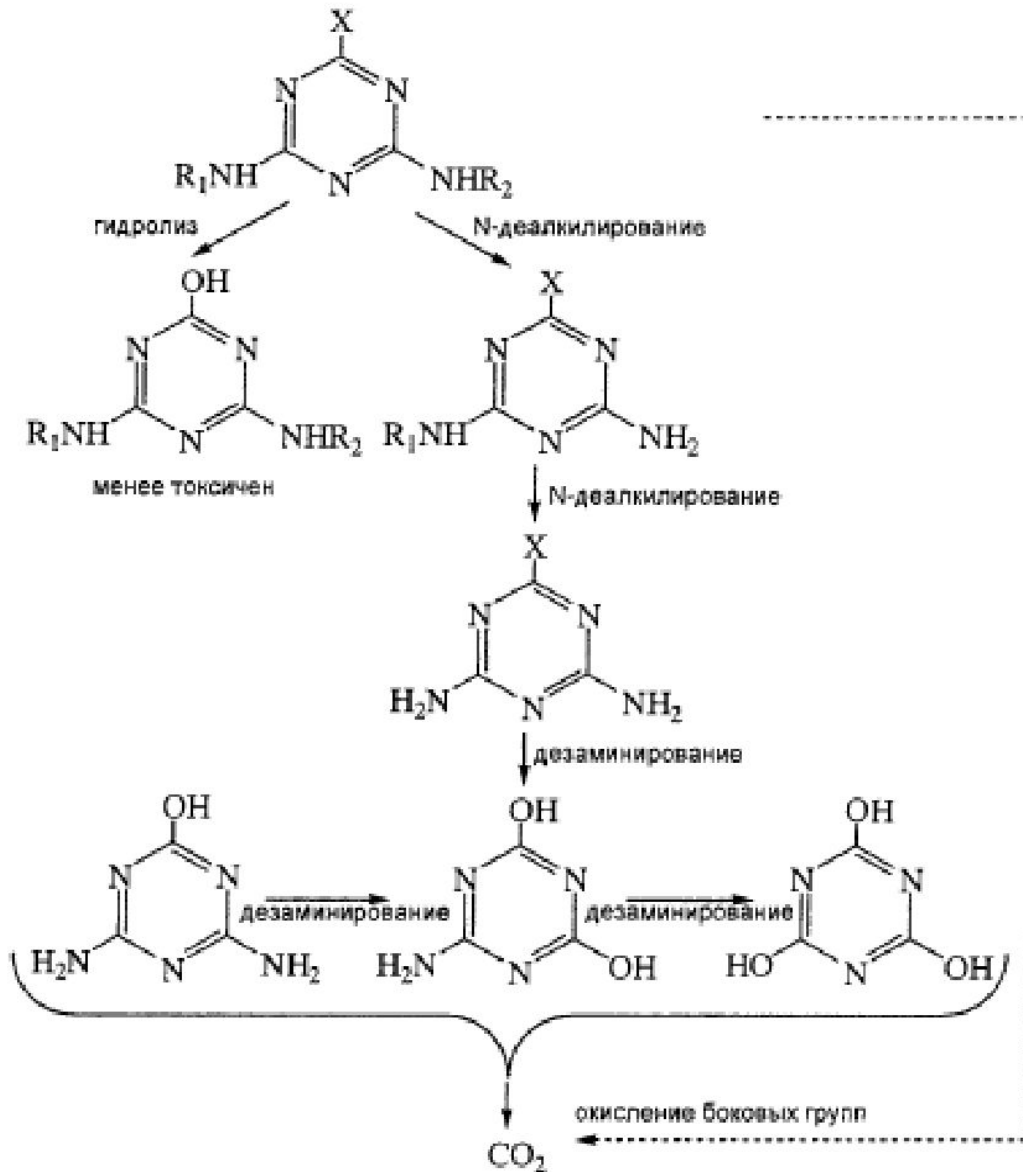
- разлагаются бактериями родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Sarcina*, *Bacillus*, грибами родов *Penicillium*, *Aspergillus*;
- реакции деметилирования, декарбоксилирования, дезаминирования и гидроксирования в кольце;
- продукты трансформации не токсичны или вообще не активны.



Микробиологическая деградация гербицида диурона

БИОДЕГРАДАЦИЯ ТРИАЗИНОВ

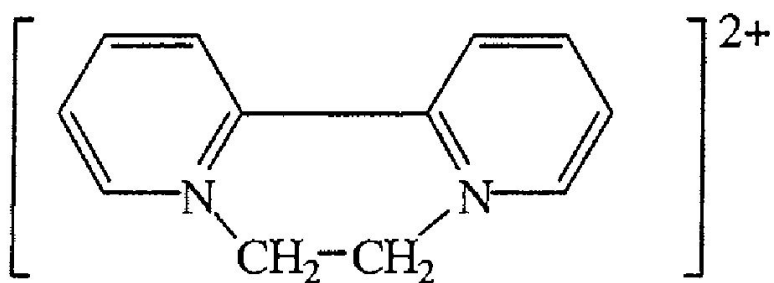
симазин, атразин, аметрин, прометрин – гербициды



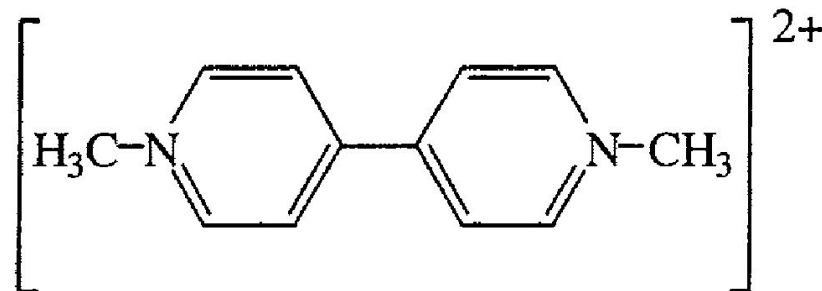
- основа молекулы — циануровая кислота;
- используются микроорганизмами в качестве источников углерода и азота;
- основные реакции трансформации — гидролиз, N -алкилирование, расщепление кольца, окисление боковых цепей;
- продукты гидролиза не обладают свойствами гербицидов.

БИОДЕГРАДАЦИЯ ДИПИРИДИЛОВ

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



Дикват

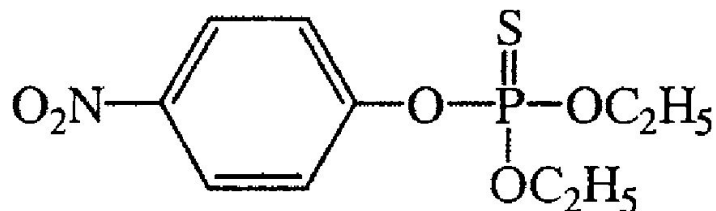


Паракват

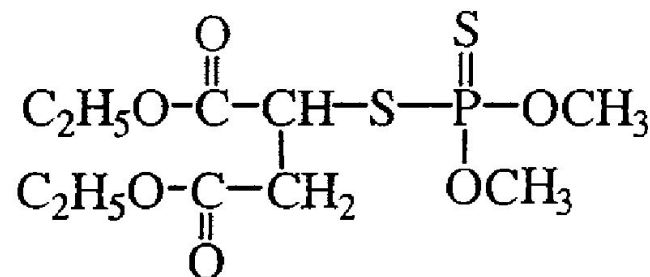
- Разлагается аэробными бактериями *Corynebacterium fascians* и анаэробными бактериями *Clostridium pasteurianum*.
- Дрожжи *Lipomyces starkeyi* используют паракват в качестве единственного источника азота при его концентрации 20 г/л.

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.