

УДК 547.621+579.66

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ДЕСТРУКЦИЯ СМЕСИ ГИДРОКСИ- И МЕТОКСИПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИХЛОРБИФЕНИЛОВ

Д. О. Егорова^{1,*}, Т. И. Горбунова^{2,**}, М. Г. Первова², К. А. Плотникова², Т. Д. Кирьянова³,
член-корреспондент РАН В. А. Демаков¹, член-корреспондент РАН В. И. Салютин²,
академик РАН О. Н. Чупахин²

Поступило 14.11.2018 г.

Исследована возможность сочетания методов химической функционализации смеси полихлорированных бифенилов (ПХБ) с образованием смеси гидрокси- и метокси-хлорированных бифенилов и бактериальной трансформации полученных соединений с целью их уничтожения. В результате 100%-й конверсии при реакции смеси ПХБ “Совол” с MeONa в среде MeOH и ДМСО была получена смесь соединений, идентифицированных как метокси- (30 соединений), гидрокси- (44 соединения) и метокси(гидрокси)производные (47 соединений) конгенов ПХБ. Суммарное содержание всех гидроксипроизводных составило 77,2%. Установлено, что штамм *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7 осуществляет деструкцию 73–93% данной смеси при исходной концентрации 0,25–1,50 г/л. Наилучший результат получен при разложении 0,1 г/л смеси метокси- и гидроксиполихлорбифенилов (на 10-е сутки полное отсутствие исходных соединений). Удельная скорость деструкции находилась в прямой корреляционной зависимости от исходной концентрации смеси. Показано, что при бактериальной трансформации не происходит накопления токсичных промежуточных соединений.

Ключевые слова: полихлорированные бифенилы, химическая функционализация, бактериальная деструкция, метокси(гидрокси)производные, *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524863307-311>

Исследования структурных трансформаций полихлорбифенилов (ПХБ), относящихся к стойким органическим загрязнителям (СОЗ) и подлежащих уничтожению до 2028 г. [1], показали, что эти хлорароматические продукты в результате попадания в окружающую среду могут подвергаться гидроксилированию как под действием природных источников, так и в присутствии антропогенных факторов, образуя гидроксипроизводные (ПХБ-ОН) [2]. Сравнительно недавно в результате анализа осадков сточных вод на территории КНР наряду с ПХБ-ОН были обнаружены метоксипроизводные ПХБ (ПХБ-ОМе) [3]. Установлено, что эти два класса соединений

первоначально образуются из ПХБ под действием комплекса микробов, присутствующих в осадке, но за время обращения в природе ПХБ-ОН и ПХБ-ОМе могут взаимно превращаться друг в друга, что отмечается постоянным изменением их уровней нахождения в объектах окружающей среды.

В отличие от ПХБ производные ПХБ-ОН и ПХБ-ОМе обладают низкой летучестью, что способствует их более длительному периоду нахождения в почве, воде и донных отложениях. Эти группы соединений способны демонстрировать ещё более опасное влияние на биологические системы, чем исходные ПХБ [2–4]. В то же время ПХБ-ОН и ПХБ-ОМе, обладая лучшими гидрофильными свойствами по сравнению с ПХБ, являются и более доступными для микробиологической деградации.

Для исчерпывающей минерализации различных производных ПХБ необходимы бактериальные штаммы с высоким деградативным потенциалом. Ранее высокую активность ферментативных систем по отношению к водорастворимым производным на основе конгенов ПХБ технической смеси “Совол”

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской Академии наук, Пермь

²Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской Академии наук, Екатеринбург

³Пермский государственный национальный исследовательский университет

*E-mail: daryao@rambler.ru

**E-mail: gorbunova@ios.uran.ru

и полиэтиленгликолей (ПЭГ) [5] и к нерастворимым в воде производным на основе той же смеси ПХБ и 2-аминоэтанола (2-АЭ) [6] продемонстрировал бактериальный штамм *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112–7 (*R. wratislaviensis* КТ112–7), выделенный из почв, подвергнутых техногенной нагрузке [7].

Представленные выше производные ПХБ [5, 6] синтезированы реакцией нуклеофильного замещения (S_N) по связи $C_{Ar}-Cl$. Известно, что конгенеры смеси “Совол” в процессах нуклеофильного обмена атомов хлора на другие функциональные группы проявляют умеренную активность, что приводит к неполной конверсии смеси исходных соединений [8]. В последние годы совершенствование методических приёмов позволило нам осуществить исчерпывающее превращение всех конгенов смеси “Совол” в новые производные. Это взаимодействие основано на реакции смеси “Совол” с MeONa в среде MeOH и ДМСО [9, 10]. В результате 100%-ной конверсии методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) были идентифицированы метокси- (I, 30 соединений), гидрокси- (II, 44 соединения) и метокси(гидрокси)производные (III, 47 соединений) конгенов ПХБ (схема 1). Наибольший вклад в смесь продуктов вносили ПХБ-ОН (II), а суммарное содержание всех гидроксипроизводных (II, III) составило 77,2%. На рис. 1 представлена хроматограмма смеси продуктов (I, II, III), которая имеет достаточно сложный вид. Многие из пиков содержат информацию о соэлюировавшихся двух и более продуктах.

Целью настоящего исследования является изучение деградативного потенциала штамма *R. wratislaviensis* КТ112–7 для биоразложения смеси метокси-, гидрокси- и метокси(гидрокси)производных ПХБ.

Ранее было показано, что полная минерализация растворимых в воде производных ПХБ и ПЭГ под

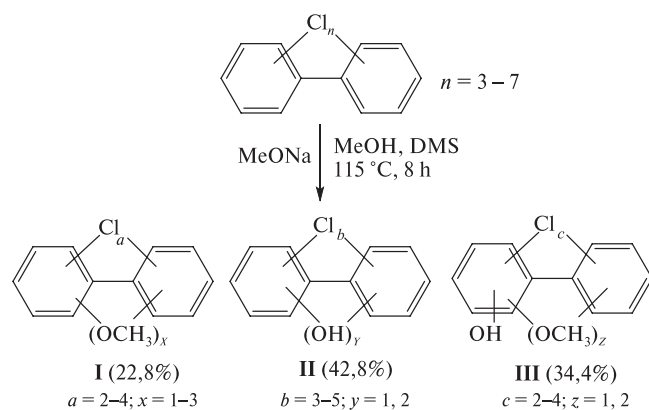


Схема 1

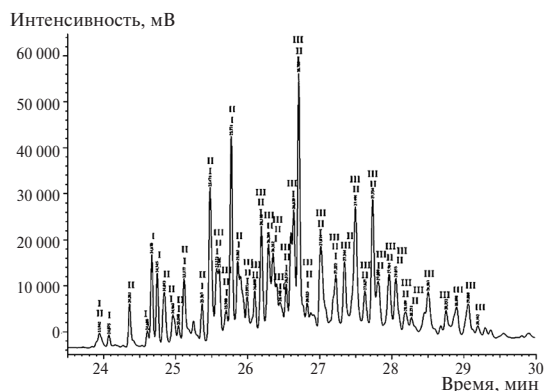


Рис. 1. Хроматограмма продуктов взаимодействия технической смеси ПХБ “Совол” с MeONa в среде MeOH и ДМСО.

действием штамма *R. wratislaviensis* КТ112–7 достигалась через 5 сут (концентрация производных 0,30 г/л), по окончании продукты распада органических соединений в культуральной жидкости не обнаружены [5]. Для нерастворимых в водной среде производных ПХБ и 2-АЭ исчерпывающая деградация наступала через 14 сут (концентрация производных — 0,47 г/л), а в качестве продуктов бактериальной деструкции зарегистрированы хлор- и гидроксизамещённые бензойные кислоты, а также катехол [6].

В настоящем исследовании бактериальную деструкцию смеси соединений (I, II, III) проводили аналогичным образом: навески исходной смеси растворяли в ацетоне, и ацетоновый раствор с заданной концентрацией вносили во флаконы с бактериальной культурой. Сразу же и по истечении нескольких суток (τ) осуществляли анализ методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором (ГХ-ПИД), а также методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

По результатам ГХ-ПИД установлено, что проследить за доминированием убыли тех или иных конкретных производных (I, II, III) фактически невозможно, поскольку все зарегистрированные пики соединений на хроматограммах по мере протекания бактериальной деструкции уменьшались одновременно. Эти сведения также подтвердились при анализе методом ГХ-МС. И поэтому биоразложение соединений (I, II, III) под действием штамма *R. wratislaviensis* КТ112–7 оценивали по суммарным площадям пиков ($\Sigma S_{\text{общ.}}$) всех идентифицированных продуктов с учётом концентрации исходных продуктов. Каждый опыт по биоразложению смеси соединений (I, II, III) проводили в трёх параллелях (СКО < 3%). Результаты представлены на рис. 2.

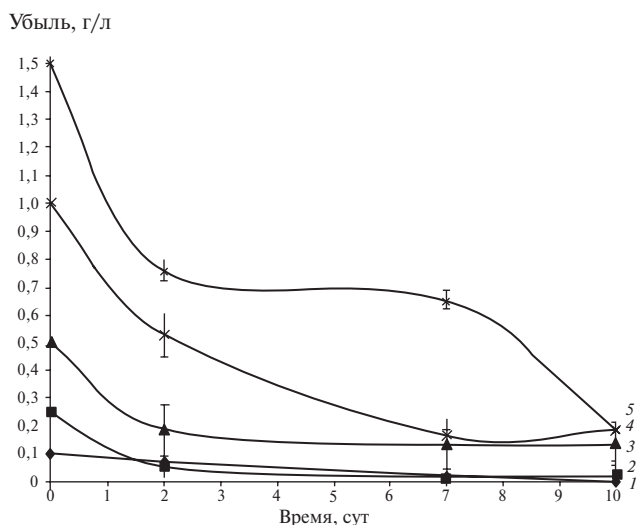


Рис. 2. Динамика убьели смеси продуктов (I, II, III) в культуральной среде в зависимости от времени бактериальной деструкции: 1 – 0,10 г/л, 2 – 0,25 г/л, 3 – 0,50 г/л, 4 – 1,00 г/л, 5 – 1,50 г/л.

Анализ полученных результатов показывает, что эффективность деструкции смеси соединений (I, II, III) составила 73–93% при исходной концентрации 0,25–1,50 г/л. Наиболее оптимальным и стабильным является результат бактериальной деструкции смеси соединений (I, II, III), исследованной в концентрации 0,10 г/л. Динамика деструкции носила линейный характер, а на 10-е сутки пиков продуктов на хроматограмме практически не зарегистрировано (рис. 3).

Повышение концентрации исследуемой смеси (I, II, III) приводит к тому, что профиль кривой убьели данных соединений (I, II, III) становится вогнутым и приближается к классической экспо-

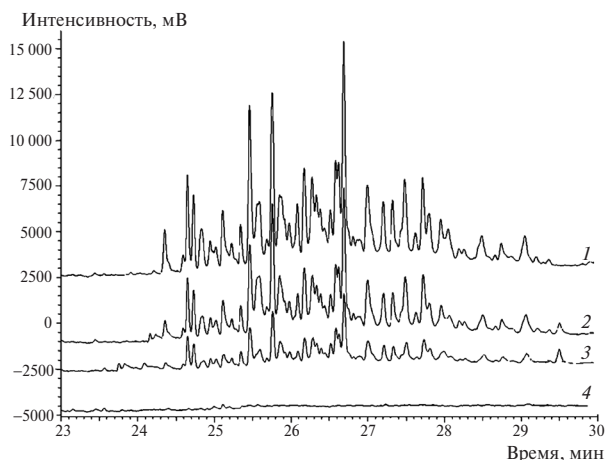


Рис. 3. Хроматограммы гексановых экстрактов смеси продуктов (I, II, III) с концентрацией 0,10 г/л после 0 (1), 2 (2), 7 (3) и 10 (4) суток бактериальной деструкции.

нциальной кривой (рис. 2), характерной для процесса бактериальной деструкции труднодоступных субстратов [11]. Аналогичная закономерность обнаружена при разложении штаммом *R. wratislaviensis* KT112–7 производных ПХБ и 2-АЭ [6].

Установлено, что удельная скорость деструкции смеси соединений (I, II, III) штаммом *R. wratislaviensis* KT112–7 находится в прямой корреляционной зависимости от исходной концентрации смеси (в пределах исследованного диапазона) и составляет 11,4; 23,3; 36,5; 81,4 (мг/л)/сут и 131,3 (мг/л)/сут при исходной концентрации 0,10; 0,25; 0,50; 1,00 и 1,50 г/л соответственно. Коэффициент корреляции составил 0,99. Стоит отметить, что скорость деструкции исследуемой смеси (I, II, III) сопоставима со скоростью деструкции смеси производных ПХБ и 2-АЭ данным штаммом при сходных начальных концентрациях [6].

Методом ВЭЖХ установлено, что профиль хроматограммы культуральной среды, содержащей смесь соединений (I, II, III), изменяется в процессе бактериальной деструкции неравномерно (рис. 4).

Вероятно, что в процессе биоразложения происходит образование замещённых катехолов, а также гидроксibenзойных кислот, о чём свидетельствует увеличение или появление на хроматограмме пиков веществ со временем удерживания в диапазоне 2,0–4,8 мин (рис. 4) [6, 7]. Данные соединения являются промежуточными при бактериальной трансформации замещённых ароматических веществ [2, 7], а их наличие подтверждает глубокую трансформацию смеси (I, II, III) с последующей полной минерализацией. Анализ хроматограмм показывает, что на 10-е сутки концентрация замещённых катехолов снижается, а пики соединений, элюирующихся с колонки после 5 мин и относящихся к исходной смеси (I, II, III), отсутствуют. Установлено, что при более

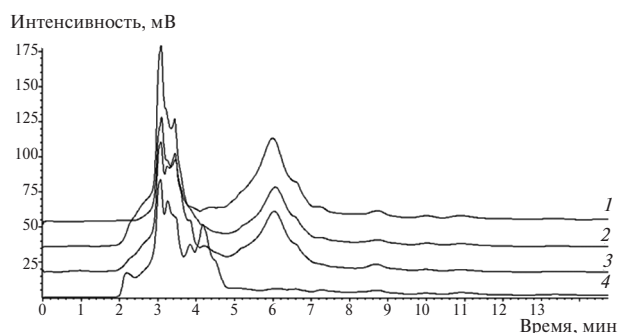


Рис. 4. Хроматограммы культуральной среды, содержащей смесь продуктов (I, II, III) с концентрацией 0,1 г/л, после 0 (1), 2 (2), 7 (3) и 10 (4) суток бактериальной деструкции.

высоких исходных концентрациях смеси соединений (I, II, III) в культуральной среде также фиксируется появление и накопление замещённых катехолов и гидроксизамещённых бензойных кислот в начальный период биотрансформации смеси с последующим их разложением. Полученные результаты свидетельствуют о том, что биодеструкция смеси (I, II, III) с участием штамма *R. wratislaviensis* КТ112–7 не приводит к накоплению токсичных для окружающей среды соединений аналогично данным из работы [5].

Таким образом, в результате проведённого исследования установлено, что штамм *R. wratislaviensis* КТ112–7 обладает высоким деградативным потенциалом и эффективно осуществляет разложение смеси метокси-, гидрокси- и метокси(гидрокси)производных ПХБ. Полученные результаты демонстрируют потенциальную возможность создания на междисциплинарной основе эффективных методов уничтожения функционализированных конгенов ПХБ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Смесь соединений (I, II, III) синтезировали аналогично данным из работ [9, 10]. Элементный анализ исходной смеси “Совол” в расчёте на пентахлорбифенил ($C_{12}H_5Cl_5$):

Найдено, %: С 44,28; Н 1,65; Cl 54,07.

Вычислено, %: С 44,15; Н 1,54; Cl 54,31.

Элементный анализ смеси продуктов в (I, II, III) в расчёте на (гидрокси)тетрахлорбифенил ($C_{12}H_5Cl_4(OH)$):

Найдено, %: С49,49; Н 3,85; Cl 29,08.

Вычислено, %: С46,83; Н 1,96; Cl 46,02.

Идентификацию и количественную оценку продуктов взаимодействия смеси ПХБ “Совол” с MeONa в среде MeOH и ДМСО проводили в условиях, представленных в [10]. Анализ и контроль за биологической деструкцией продуктов (I, II, III) осуществляли аналогично данным из работ [5, 6].

Бактериальную деструкцию смеси продуктов (I, II, III) проводили в эксперименте с “отмытыми” клетками аналогично [6]. Смесь соединений (I, II, III) вносили во флаконы с бактериальной культурой в виде ацетонового раствора до конечной концентрации 0,10; 0,25; 0,50; 1,00 и 1,50 г/л. Образцы для анализа эффективности бактериальной деструкции отбирали сразу после внесения смеси соединений (I, II, III), а также через 2 сут, 7 сут и 10 сут культивирования.

Наличие промежуточных продуктов бактериальной деструкции соединений (I, II, III) определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе LC-20A Prominace (“Shimadzu”, Япония) с УФ-детектором (при 205 нм) и колонкой C18 (“Supelco”) в системе ацетонитрил — 0,1%-ная H_3PO_4 (70 : 30).

Расчёт эффективности деструкции в процентах и удельной скорости деструкции проводили стандартными методами [7].

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18–29–05016 мк).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Stockholm Convention on Persistent Organic pollutants (POPs)* // Secretariat of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants United Nations Environment Programme (UNEP). <http://www.mfe.govt.nz/more/international-environmental-agreements/multilateral-environmental-agreements/stockholm>
2. *Tehrani R., Van Aken B.* // Environ. Sci. Pollut. Res. 2014. V. 21. P. 6334–6345.
3. *Sun J., Zhu L., Pan L., Wei Z., Song Y., Zhang Y., Qu L., Zhan Y.* // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 29782–29790.
4. *Mizukami-Murata S., Sakakibara F., Fujita K., Fukuda M., Kuramata M., Takagi K.* // Chemosphere. 2016. V. 165. P. 173–182.
5. *Егорова Д.О., Горбунова Т.И., Первова М.Г., Демаков В.А.* // Биотехнология. 2013. № 4. С. 56–64.
6. *Горбунова Т.И., Первова М.Г., Панюкова А.А., Егорова Д.О., Салютин В.И., Демаков В.А., Чупахин О.Н.* // ДАН. 2014. Т. 454. № 4. С. 411–416.
7. *Егорова Д.О., Корсакова Е.С., Демаков В.А., Плотникова Е.Г.* // Прикладная биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. № 3. С. 267–278.
8. *Горбунова Т.И., Салютин В.И., Чупахин О.Н.* // Успехи химии. 2010. Т. 79. № 6. С. 565–586.
9. *Боярский В.П., Хайбулова Т.Ш., Горбунова Т.И., Первова М.Г., Плотникова К.А., Салютин В.И., Чупахин О.Н.* Патент № 2623216 РФ. // Бюл. 2007. № 18.
10. *Плотникова К.А., Первова М.Г., Горбунова Т.И., Хайбулова Т.Ш., Боярский В.П., Салютин В.И., Чупахин О.Н.* // ДАН. 2017. Т. 476. № 1. С. 45–50.
11. *Saavedra J.M., Acevedo F., Gonzalez M., Seeger M.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 87. P. 1543–1554.

**BACTERIAL DEGRADATION OF A MIXTURE OF HYDROXY-
AND МЕТОХYPOLYCHLORINATED BIPHENYLS**

**D. O. Egorova¹, T. I. Gorbunova², M. G. Pervova², K. A. Plotnikova², T. D. Kiryanova³,
Corresponding Member of the RAS V. A. Demakov¹, Corresponding Member of the RAS V. I. Saloutin²,
Academician of the RAS O. N. Chupakhin²**

*¹Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
Perm, Russian Federation*

²Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

*³Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
Perm, Russian Federation*

Received November 14, 2018

In this work, the possibility of combining the methods of chemical functionalization of a mixture of polychlorinated biphenyls before the formation of a mixture of hydroxy- and methoxy-chlorinated biphenyls and the bacterial transformation of the compounds obtained with the aim of their utilization was investigated. As a result of a 100% conversion, a mixture of compounds identified as methoxy- (30 compounds), hydroxy- (44 compounds) and methoxy (hydroxy) derivatives (47 compounds) was obtained by reacting a mixture of Sovol with MeONa in MeOH and DMSO. PCB congeners. The total content of all hydroxy derivatives was 77.2%. It was established that the strain *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 carries out the destruction of 73–93% of this mixture at the initial concentration of 0.25–1.50 g / l. The best result was obtained with a decomposition of 0.1 g / l of a mixture of methoxy- and hydroxy-polychlorobiphenyls (on the 10th day the total absence of the starting compounds). The specific rate of destruction was in direct correlation with the initial concentration of the mixture. It has been shown that during bacterial transformation there is no accumulation of toxic intermediate compounds.

Keywords: Polychlorinated biphenyls, chemical functionalization, bacterial destruction, methoxy(hydroxy) chlorobiphenyls, *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7.