

УДК 579.222.2;579.87;579.66

## Штамм *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7 – основа для биорегенерации полихлорбифенил-загрязненного металл/углеродного катализатора

© 2018 Д.О. ЕГОРОВА<sup>1,\*</sup>, В.А. ДЕМАКОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов, филиал Пермского федерального научного центра, Уральское отделение Российской академии наук, 614081 Пермь

\*e-mail: daryao@rambler.ru

Поступила 31.05.2018 г.

Принята в печать 06.07.2018 г.

Показана возможность биорегенерации полихлорбифенил-загрязненных металл/углеродных катализаторов с применением в качестве биологических агентов аэробных бактериальных штаммов. На примере катализатора «5%-Pd/Сибунит», загрязненного продуктами реакции гидродеchlorирования коммерческой смеси полихлорбифенилов (ПХБ) марки Совол, и штамма *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7 показано, что применение бактериальной культуры позволяет очистить катализатор в короткие сроки и с минимальными технико-экономическими затратами. Установлено, что в условиях эксперимента с интактными клетками за 24 ч биорегенерации степень очистки катализатора составила 99% (0,77 мг/мл). По данным газожидкостной хроматографии, штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 осуществляет разложение всех конгенов, присутствующих на катализаторе «5%-Pd/Сибунит» после реакции гидродеchlorирования ПХБ. Эффективность бактериальной деструкции составила 97% (0,76 мг/мл). Оставшаяся часть загрязняющих веществ адсорбировалась бактериальными клетками. Таким образом, штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 может быть использован как биологический компонент в технологиях биорегенерации ПХБ-загрязненных металл/углеродных катализаторов.

*Ключевые слова:* *Rhodococcus*, катализатор, деструкция, полихлорированные бифенилы.

**doi:** 10.21519/01234-2758-2018-34-4-51-61

Полихлорированные бифенилы (ПХБ) в виде различных коммерческих смесей (Совол, Совтол, Арохлор, Канеклор, Фенхлор и др.) производили в ведущих странах мира в период с 1929 г (США) и до середины 1990-х гг. (СССР-Россия). За период эксплуатации ПХБ использовались как заливочные жидкости для трансформаторов и конденсаторов, а также как исходные соединения для производства лакокрасочной и полимерной продукции. Примерно 40% произведенных ПХБ оказалось в окружающей среде путем трансграничного переноса по воде, воздуху, почве и пищевым

цепям, а также вследствие преднамеренных и непреднамеренных проливов. Всего, по разным подсчетам, за этот период было произведено около 1 млн. т ПХБ [1, 2]. В 80-х гг. XX в. было установлено, что ПХБ являются супертоксичными для живых организмов. Благодаря высокой липофильности молекулы ПХБ аккумулируются в пищевых цепях. Накопление хлорбифенилов в организме животных и человека приводит к развитию онкологических заболеваний, изменениям в развитии организма на эмбриональной стадии, а также к нарушению ряда метаболических процессов [3].

Список сокращений: а.е.м. – атомная единица массы; ГХ-МС – газовый хроматограф-масс-спектрометр; ГХ-ПВД – газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором; ИЮПАК – Международный союз теоретической и прикладной химии; ОП – оптическая плотность; ПХБ – полихлорированные бифенилы; смесь П – смесь соединений, присутствующая на частицах катализатора и образовавшаяся в результате реакции гидродеchlorирования Совола.

В 1979 г. Агентство по охране окружающей среды (США) продекларировало необходимость прекращения производства и применения ПХБ [4]. В 2001 г. международным сообществом была принята Стокгольмская конвенция, согласно которой ПХБ запрещены к производству и применению как особо опасные для животных и человека соединения, а их запасы должны быть уничтожены до 2028 г. ([http://chm.pops.int/Portals/0/sc10/files/a/stockholm\\_convention\\_text\\_r.pdf](http://chm.pops.int/Portals/0/sc10/files/a/stockholm_convention_text_r.pdf)). Россия приняла на себя обязательства по выполнению положений Стокгольмской конвенции в 2011 г., о чем свидетельствует Федеральный закон от 27.06.2011 г. № 164-ФЗ «О ратификации Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях» (<http://base.garant.ru/12187282/>).

Уникальное химическое строение молекулы ПХБ (два ароматических кольца, объединенных С–С связью, содержащих от 1 до 10 атомов хлора в качестве заместителей) обусловило их высокую устойчивость к воздействию внешних факторов. Анализ литературных данных показал, что трансформация ПХБ возможна с применением физических и химических методов [5, 6]. Однако они имеют серьезные ограничения. Метод сжигания с применением ракетного двигателя требует высоких энергетических затрат, а также ряд жестких технологических требований. При этом он не является экологически безопасным. Пиротехнические методы развиты недостаточно и не имеют достоверной экологической экспертной оценки. Плазменные технологии нацелены на уничтожение остатков ПХБ, находящихся внутри электротехнического оборудования, и являются энергозатратными. Электрохимические методы применимы лишь к малым концентрациям ПХБ и сопряжены с поиском эффективных электродов. Исследования в области химической трансформации ПХБ представлены, в основном, методами восстановительного дехлорирования. В результате гидродеchlorирования ПХБ образуются соединения, которые могут быть использованы для дальнейшего химического синтеза [5]. Методы восстановительного дехлорирования сопряжены с использованием дорогостоящих палладиевых катализаторов. Палладий в большинстве случаев находится на инертном носителе, в качестве которого могут выступать оксиды алюминия или кремния, а также углеродные структуры. Одним из перспективных катализаторов для жидкофазных процессов является графитоподобный углеродный материал Сибунит, с нанесенными на него частицами палладия. Наносистемы Pd/Сибунит

являются активными катализаторами в реакциях гидродеchlorирования коммерческих смесей ПХБ. Однако отмечено, что использование катализатора в нескольких реакционных циклах снижает его активность, что влечет за собой проблему его восстановления [5–7].

Известно, что восстановление катализаторов может осуществляться выжиганием кислородсодержащим газом при высоких температурах, многократной обработкой химическими реагентами, содержащими аммиак и последующей термообработкой, а также сверхкритической флюидной экстракцией [8–10]. Однако все эти методы сопряжены с высокими технико-экономическими затратами, и не всегда отвечают требованиям экологической безопасности. В связи с этим остается актуальным поиск метода очистки металл/углеродных катализаторов, задействованных в системах трансформации ПХБ.

В результате поиска эффективных методов деструкции ПХБ было установлено, что аэробные бактериальные штаммы способны трансформировать хлорированные бифенилы в природных условиях до менее токсичных соединений, а в ряде случаев и до соединений основного обмена клетки. Однако эффективность биоразложения ПХБ зависит от количества заместителей в молекуле. Большинство аэробных бактерий-деструкторов высокоактивны по отношению к моно- и дихлорбифенилам [11–13]. Однако в коммерческих смесях ПХБ представлены в основном конгенеры с количеством заместителей больше трех [6, 14]. Описано несколько штаммов родов *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhodococcus*, которые проявляют деградационную активность к средне- и высокохлорированным бифенилам [15–18]. Наиболее изученны среди них штаммы *Burkholderia xenovorans* LB400 и *Rhodococcus jostii* RHA1 [16]. Известно, что биодоступность ПХБ зависит не только от количества заместителей, но и от их расположения в молекуле бифенила [19, 20]. Наибольшей устойчивостью к бактериальной атаке и токсичностью для живых организмов обладают планарные конгенеры [19, 20]. Проведенные нами ранее исследования позволили выделить из окружающей среды уникальный штамм *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7, способный разлагать ряд ароматических соединений, в том числе и полихлорированные бифенилы [21, 22]. Ранее было показано, что штамм KT112-7 трансформирует смесь соединений, образующихся в результате гидродеchlorирования смеси ПХБ марки Совол, в диапазоне

концентраций 0,1–2,0 мг/мл. Анализ литературных данных и собственные исследования позволили предположить, что для регенерации ПХБ-загрязненных металл/углеродных катализаторов могут быть использованы культуры аэробных бактериальных штаммов, что позволит восстановить каталитическую активность с наименьшими технико-экономическими и экологическими затратами.

Цель настоящей работы – исследование культуры аэробного бактериального штамма *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7 в качестве биологического агента для биорегенерации Pd/Сибунит катализатора, загрязненного продуктами реакции гидродеchlorирования коммерческой смеси ПХБ торговой марки Совол.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Бактериальный деструктор

*Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7 (ВКМ Ас-2623D) обладает уникальными системами разложения ароматических соединений. Штамм осуществляет трансформацию бензойной кислоты и бифенила, а также их моно- и дихлорированных производных до соединений основного обмена в различных экстремальных условиях культивирования [21, 22].

### Нанодисперсный палладиевый катализатор

5%-Pd/Сибунит на основе углеродного материала Сибунит предоставлен Институтом органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН [7, 23]. Содержание палладия на Сибуните составляет 5%. Размер частиц Сибунита – 40–90 мкм. Основные характеристики данного катализатора рассмотрены в работе [7].

### Гидродеchlorирование ПХБ

Реакция протекала в реакторе, снабженном обратным холодильником. В реактор помещали 7,5 мл этанола, 0,15 г Совола (ПХБ), 0,15 г 5%-Pd/Сибунит катализатора, 0,1424 г NaOH и при перемешивании пропускали водород со скоростью потока 40 мл/мин при температуре 25 °С в течение 5 ч. Катализатор отделяли центрифугированием с последующей декантацией надосадочной жидкости без дополнительного промывания. Сушили при 50 °С в течение 10 ч [7, 23]. В результате реакции гидродеchlorирования образуются полихлорированные бифенилы с меньшим содержанием заместителей в молекуле, вос-

становленный бифенил, а также (хлор)фенилциклогексаны [7, 23]. Образовавшаяся в результате реакции смесь из конгенов ПХБ, входивших в состав Совола, а также из образовавшихся соединений в процессе реакции гидродеchlorирования с применением 5%-Pd/Сибунит-катализатора была обозначена как смесь П. Степень загрязнения частиц катализатора смесью П составила 15,6% от массы катализатора, что соответствует 23,4 мг смеси П на 150 мг Сибунита, использованного в реакции.

### Биорегенерация с интактными клетками ПХБ-загрязненного катализатора

Культуру штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 предварительно выращивали в колбах Эрленмее-ра объемом 250 мл с 100 мл жидкой минеральной среды К1 [24], с добавлением бифенила в качестве источника углерода в концентрации 1 г/л. Культивирование осуществляли на термостатируемой качалке Environmental Shaker-Incubator ES-20/60 (BioSan, Латвия) со скоростью 180 об/мин при 28 °С до достижения культурой оптической плотности  $ОП_{600} = 1,0$ . Отмытые дважды в минеральной среде К1 клетки (1 мл,  $ОП_{600} = 2,0$ ; 0,432 мг сухих клеток в 1 мл) переносили во флаконы с тефлоновыми крышками. 5%-Pd/Сибунит-катализатор, загрязненный продуктами реакции гидродеchlorирования смеси ПХБ Совол (смесь П=0,78 мг/мл), вносили во флаконы объемом 5 мл, содержащими 1 мл бактериальной культуры в количестве 5 мг/мл и инкубировали на термостатируемой качалке Environmental Shaker-Incubator ES-20/60 (BioSan) со скоростью 180 об/мин при 28 °С в течение 24 ч. В качестве контроля в аналогичных условиях инкубировали катализатор, содержащий смесь П, в минеральной среде без культуры штамма КТ112-7. Пробы для анализа эффективности биорегенерации отбирали сразу после внесения катализатора и далее – через 2, 4, 20 и 24 ч культивирования. Бактериальные клетки отделяли от частиц катализатора фильтрованием через мембрану Omnipore™ (PTFE) (Merk, Германия), диаметр пор 10 мкм (вакуумный насос VP30, аппарат для фильтрации Shimadzu, Япония). Частицы катализатора задерживались на мембране. Для дальнейшего анализа их смывали смесью ацетон–гексан и далее экстрагировали согласно методике (<https://rosexpertpravo.ru/law/Data2/1/4293773/4293773981.pdf>). Экстракции с последующим анализом были подвергнуты также следующие образцы: культуральная жидкость, содержащая катализатор и бактериальные

клетки; бактериальная культура, отделенная от катализатора фильтрованием; мембрана, через которую осуществляли фильтрацию. Качественный и количественный состав проб устанавливали методами ГХ-МС и ГХ-ПИД, описанными ниже.

### Анализ продуктов реакции гидродеchlorирования

Смесь П анализировали на газовом хроматографе «Shimadzu GC 2010» с пламенно-ионизационным детектором (ГХ-ПИД) и кварцевой капиллярной колонкой ZB-5 (длина 30 м, диаметр 0,25 мм), толщина пленки неподвижной фазы составляла 0,25 мкм (Shimadzu, Япония). Начальная температура колонки составила 40 °С (3 мин), последующее повышение температуры – 10 °С/мин до конечной температуры 290 °С. Температура испарителя – 280 °С, детектора – 320 °С.

Качественный состав смеси П определяли с помощью газового хроматографа-масс-спектрометра (ГХ-МС) «Agilent GC 7890A MSD 5975C inert XL EI/CI» (Agilent Technologies, США) с кварцевой капиллярной колонкой HP-5MS длиной 30 м, диаметром 0,25 мм, а также квадрупольного масс-спектрометрического детектора. Газ-носитель гелий, деление потока 1 (через колонку): 50 (на сброс). Начальная температура колонки – 40 °С (изотерма 3 мин), скорость повышения температуры – 10 °С/мин до конечной температуры 290 °С (изотерма 40 мин). Температура испарителя – 250 °С, переходной камеры – 280 °С, масс-спектрометрического источника – 230 °С, квадруполя – 250 °С. Сканирование осуществляли по полному ионному току в диапазоне масс 20–1000 а.е.м. в режиме электронной ионизации (70 эВ).

Количественный состав смеси П в каждом исследуемом образце (на частицах катализатора, на бактериальных клетках, в культуральной жидкости, содержащей катализатор и бактериальную культуру) проводили методом внутренней нормализации на основании суммы площадей всех пиков, представленных на хроматограмме ГХ-ПИД. На хроматограммах экстрактов, полученных с мембран после фильтрации клеток, пиков веществ, соответствующих соединениям смеси П, не было обнаружено. По-видимому, на мембране сорбирования данной смеси не происходит. При дальнейших расчетах учитывали, что в процессе разделения частиц катализатора и бактериальной культуры количественные потери смеси П отсутствуют.

### Определение показателей очистки катализатора

Расчет степени очистки 5%-Pd/Сибунит-катализатора от смеси П (%) проводили по формуле:

$$P = 100 - (C_{\text{эксп}} / C_{\text{контр}} \cdot 100), \quad (1)$$

здесь и далее  $C_{\text{эксп}}$  – концентрация смеси П на частицах катализатора в экспериментальном образце (мкг/мл),  $C_{\text{контр}}$  – концентрация смеси П в контроле (мкг/мл).

Величину деструкции смеси П (%), рассчитывали по формуле:

$$D = 100 (C_{\text{контр}} - K_{\text{эксп}}) / C_{\text{контр}}, \quad (2)$$

где  $K_{\text{эксп}}$  – концентрация смеси П в культуральной жидкости, содержащей катализатор и бактериальные клетки, в экспериментальном образце (мкг/мл).

Удельную скорость деструкции конгенов ПХБ, входящих в состав смеси П, определяли по формуле:

$$V_t = (C_0 - C_t) / t, \quad (3)$$

где  $C_0$  – концентрация конгенера ПХБ в начальной смеси,  $C_t$  – концентрация конгенера через 24 ч эксперимента, либо в момент времени, когда концентрация равна нулю,  $t$  – отрезок времени, за который концентрация конгенера ПХБ снизилась до нуля, либо 24 ч, если на момент окончания эксперимента данный конгенер детектируется в смеси П.

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием стандартных пакетов компьютерных программ Microsoft Excel и Statistica 6.0. Все эксперименты были выполнены в трехкратной повторности.

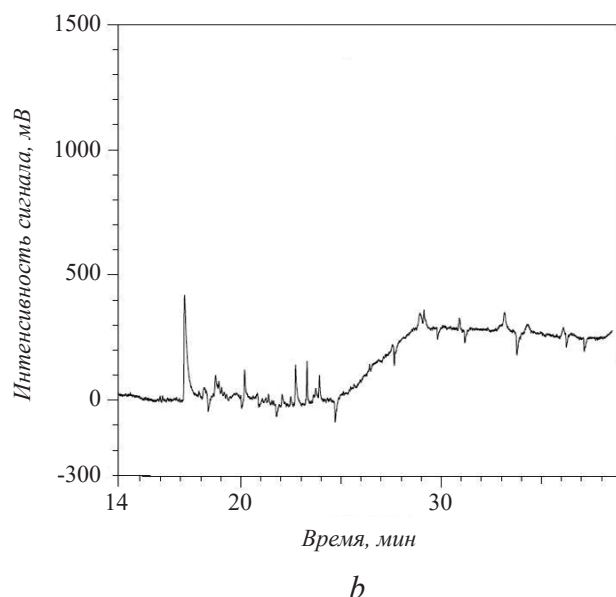
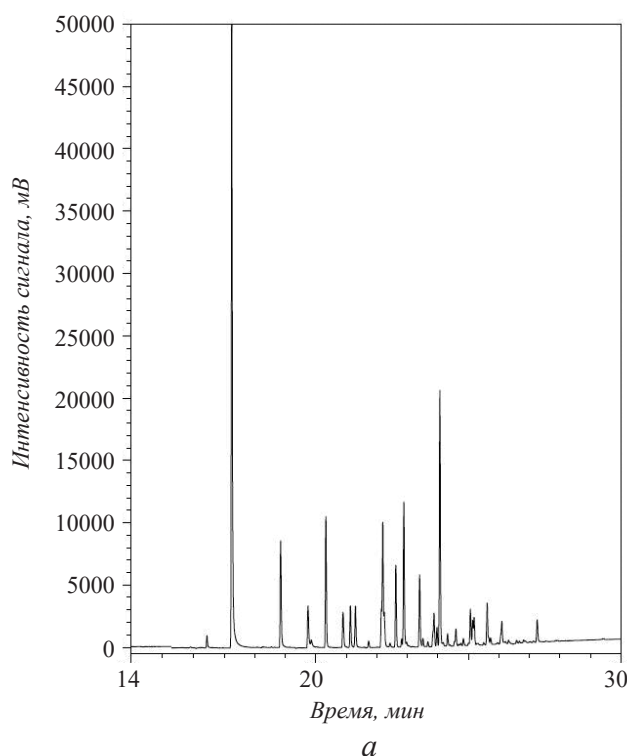
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения процесса биорегенерации ПХБ-загрязненных металл/углеродных катализаторов был использован катализатор «5%-Pd/Сибунит», содержащий 15,6% смеси П (смесь, образующаяся в результате реакции гидродеchlorирования Совола). Газо-хроматографический анализ показал, что на данном катализаторе присутствует более 50 соединений (пики на рис. 1а). В результате анализа состава каждого пика на основании базы данных прибора было установлено, что часть пиков соответствует конгенам полихлорированных бифенилов, входящих в состав Совола (табл. 1). Сканирование остальных пиков не позволило идентифицировать соединения, однако показало, что данные вещества являются

производными, образованными в процессе реакции гидродеchlorирования ПХБ. Полученные результаты согласуются с описанными особенностями изменения состава смеси ПХБ марки Совол в реакциях гидродеchlorирования при применении наносистем Pd/Сибунит [7, 23]. Таким образом, на исследуемом катализаторе присутствует сложная смесь замещенных ароматических соединений.

В литературе описаны аэробные бактериальные штаммы, осуществляющие разложение коммерческих смесей ПХБ различных торговых марок [12, 15, 17, 25, 26]. Однако большинство исследований посвящены бактериальной деструкции исходных конгенов ПХБ, а не соединений, образующихся в процессе их химической или биологической трансформации [11, 13, 16–20]. На основании анализа полученных нами ранее результатов, для изучения процесса биорегенерации ПХБ-загрязненного катализатора был отобран штамм *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7 [21, 22]. Штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 проявляет деградирующую активность как к хлорированным бифенилам, так и к ряду их химически модифицированных производных [22, 27, 28]. В результате ранее проведенных исследований установлено, что штамм КТ112-7 трансформирует смесь соединений, образующихся в результате гидродеchlorирования смеси ПХБ марки Совол, в диапазоне концентраций 0,1–2,0 мг/мл (данные не опубликованы).

Установлено, что в процессе биорегенерации ПХБ-загрязненного катализатора с применением клеток штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 концентрация смеси П на частицах катализатора 5%-Pd/Сибунит снизилась за 24 ч. на 99% и составила 2,5 мкг/мл (рис. 1*b*, рис. 2, кривая 4). При этом, было установлено, что 20% (0,16 мг/мл) от начальной концентрации смеси П сорбировано бактериальными клетками, а остальная часть подверглась бактериальной трансформации (рис. 2, кривые 2 и 3). По-видимому, очистка катализатора происходит не только в результате биодеструкции, но и в результате сорбирования соединений смеси П бактериальными клетками. Данная особенность взаимодействия ПХБ, в частности смеси Совол, и бактериальных клеток описана в работе [29]. Клетки штаммов почвенных бактерий аккумулялировали от 1,5 до 13,6 мкг ПХБ/мг сухого веса клеток за 10 дней. Анализ полученных данных свидетельствует о более высокой скорости адсорбции смеси П штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7 (скорость адсорбции в первые 2 ч эксперимента составила 318 (мкг/мг)/ч). Сочетание процессов



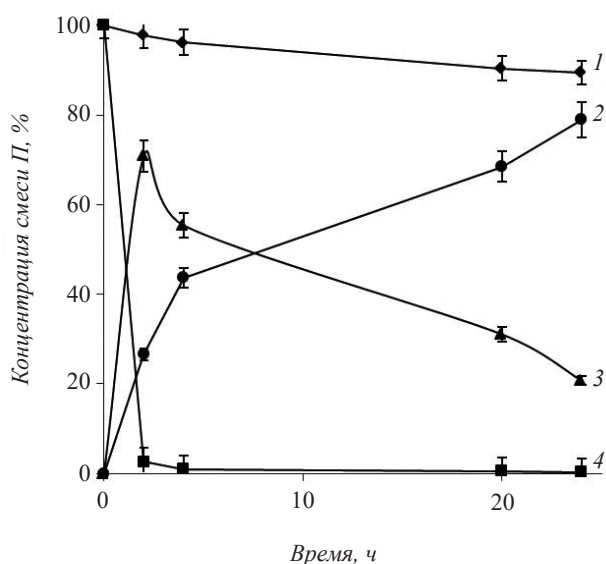
**Рис. 1.** ГХ-ПИД хроматограмма смеси П, присутствующей на исследуемом 5%-Pd/Сибунит катализаторе до биорегенерации (а) и через 24 ч (б) после начала биорегенерации

**Fig. 1.** GC-FID chromatogram of mixture P occurring on studied 5%-Pd/Sibunit catalyst before (a) and 24 h after (b) bioregeneration

## Полихлорированные бифенилы, входившие в состав Совола, идентифицированные в смеси П

## Polychlorinated biphenyls, components of Sovol, identified in mixture P

Номер пика	Время выхода пика, мин	Номер ПХБ по ИЮПАК	Положение заместителей в молекуле	Номер пика	Время выхода пика, мин	Номер ПХБ по ИЮПАК	Положение заместителей в молекуле
22	23,41	28	2,4,4'-	39	25,51	56	2,3,3',4'-
23	23,52	20	2,3,3'-	40	25,62	101	2,4,5,2',5'-
		33	3,4,2'-				
		53	2,5,2',6'-				
25	23,88	52	2,5,2',5'-	41	25,73	99	2,4,5,2',4'-
26	23,97	49	2,4,2',5'-	43	26,09	97	2,4,5,2',3'-
27	24,07	47	2,4,2',4'-	44	26,22	87	2,3,4,2',5'-
29	24,32	44	2,3,2',5'-	45	26,32	85	2,3,4,2',4'-
30	24,59	42	2,3,2',4'-	46	26,58	110	2,3,6,3',4'-
		37	3,4,4'-				
31	24,69	41	2,3,4,2'-	47	26,68	82	2,3,4,2',3'-
		64	2,3,6,4'-				
32	24,76	40	2,3,2',3'-	48	26,81	118	2,4,5,3',4'-
35	25,07	74	2,4,5,4'-	51	27,26	132	2,3,4,2',3',6'-
						153	2,4,5,2',4',5'-
36	25,19	70	2,5,3',4'-	52	27,54	105	2,3,4,3',4'-
37	25,28	66	2,4,3',4'-	53	27,86	138	2,3,4,2',4',5'-
		95	2,3,6,2',5'-				
38	25,32	91	2,3,6,2',4'-	55	29,41	180	2,3,4,5,2',4',5'-



**Рис. 2.** Разложение смеси П. 1 – на катализаторе в бесклеточном контроле; 2 – деструкция смеси П штаммом *KT112-7*; 3 – на бактериальных клетках; 4 – на катализаторе 5%-Pd/Сибунит

**Fig. 2.** Decomposition of mixture P: (1), on catalyst in cell-free control; (2), by *R. wratislaviensis* *KT112-7* strain; (3), during adsorption on bacterial cells; and (4), on 5% Pd/Sibunit catalyst

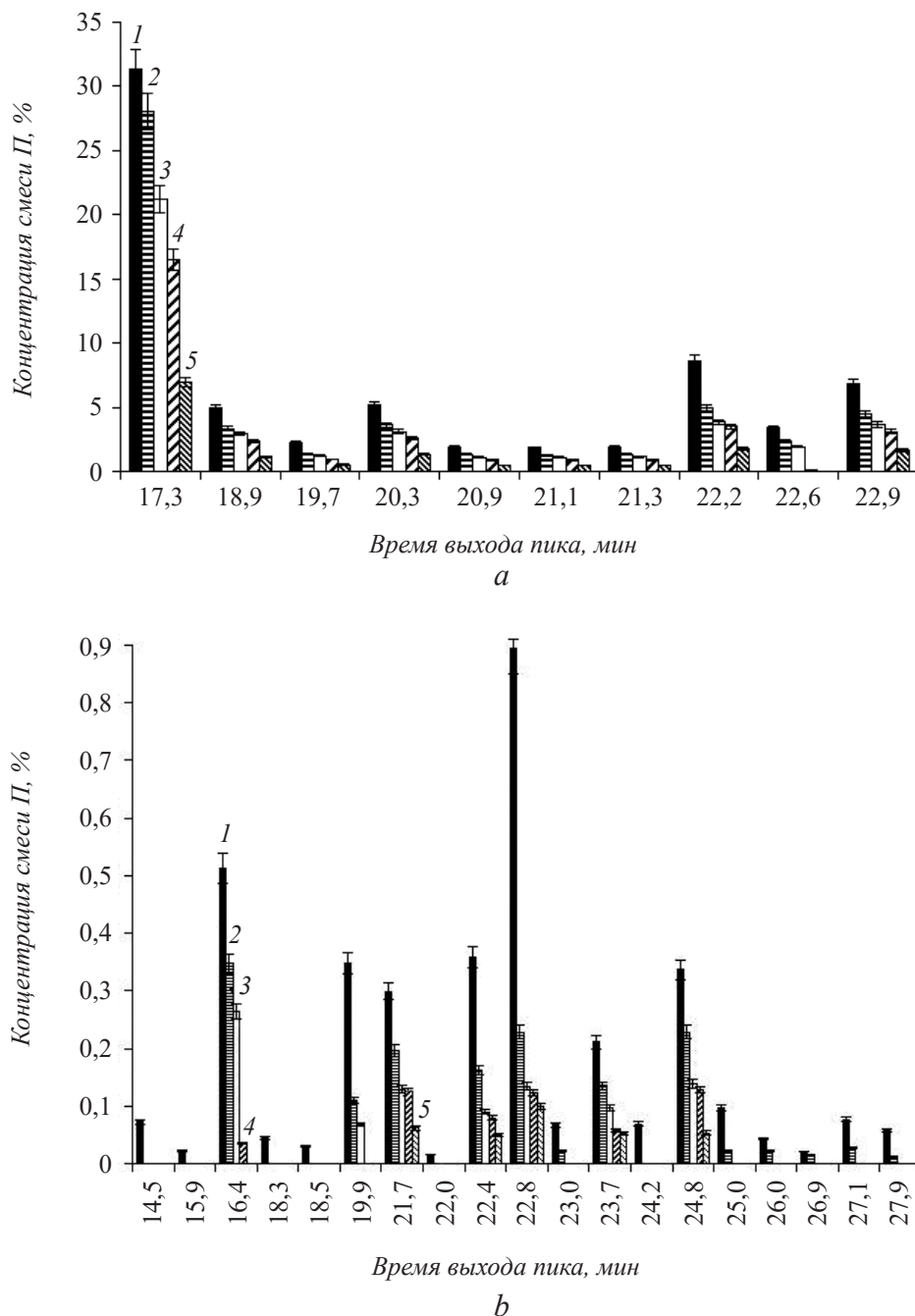
биодеструкции и биосорбции приводит к тому, что через 2 ч эксперимента степень очистки катализатора составила 97% (рис. 2, кривая 4). При этом, очистка металл/углеродного катализатора от органических соединений происходит в условиях, не требующих высоких затрат энергии и других ресурсов, как в ряде известных методов [5, 8–10].

Как видно из рис. 2, штамм *R. wratislaviensis* *KT112-7* не только сорбирует соединения смеси П, но и осуществляет их разложение. Наиболее эффективно деструкция протекает в первые часы взаимодействия бактериальной культуры и ПХБ-содержащих частиц катализатора – в первые 4 ч происходит разложение 44% смеси П (рис. 2, кривая 2), далее в течение 20 ч отмечено разложение еще 35%. Таким образом, за 24 ч деструкция смеси П составила 79% (0,62 мг/мл). Известны штаммы рода *Rhodococcus*, способные трансформировать Совол и ряд коммерческих смесей ПХБ, близких по составу (смеси марки «Арохлор») [12, 25, 26, 30]. Так, штаммы *Rhodococcus* sp. MD1 и MD2 за 24 ч утилизировали 67,2–85,5% Совола (начальная концентрация 0,6 мг/мл) при культивировании в минеральной среде, штаммы *R. ruber* Z56 и Z57, а также *R. erythropolis* Z6, D3-1, D3-2 и

D3-3 осуществляли деструкцию 40–61% Арохлора 1248 (начальная концентрация 0,05 мг/мл) в течение 14 сут [12, 30].

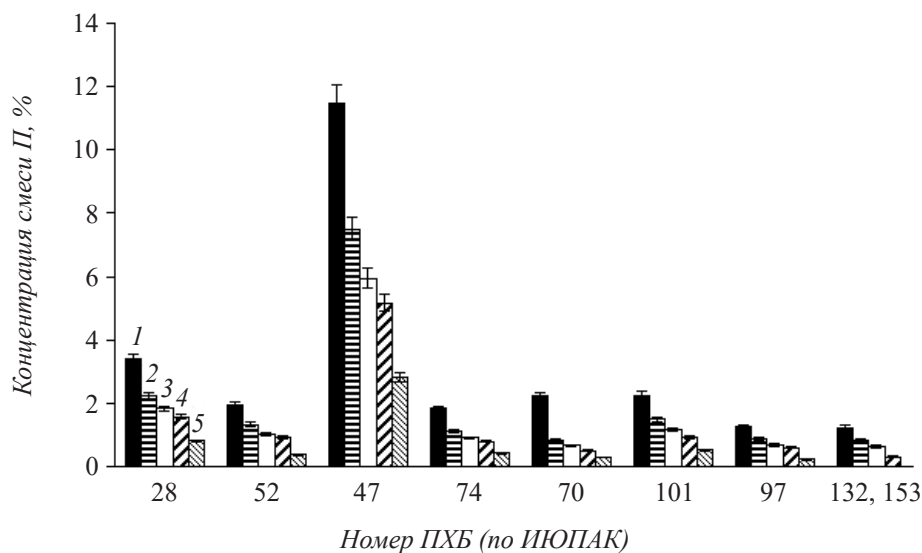
Анализ динамики концентрации компонентов смеси П показал, что штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 проявляет активность ко всем представленным соединениям (рис. 3, 4). Соединения, входящие в смесь П, были условно разделены на две

группы: начальная концентрация в смеси выше 1% (от суммы всех компонентов смеси П), и начальная концентрация ниже 1%. Через 24 ч биорегенерации 100%-ная деструкция отмечена для трех соединений, включенных в первую группу (соединение с временем выхода пика 22,62 мин (рис. 3а), ПХБ132, ПХБ153 (рис. 4а)) и для 27 соединений, включенных во вторую группу (рис 3б и 4б).

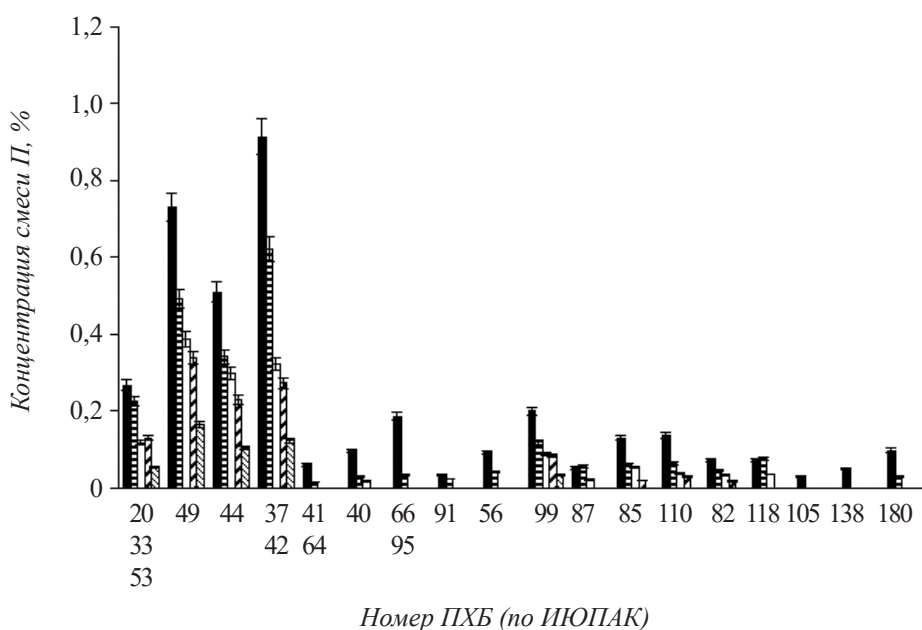


**Рис. 3.** Динамика концентрации неидентифицированных соединений смеси П в культуральной жидкости, содержащей катализатор и бактериальные клетки: *a* – начальная концентрация соединений в смеси выше 1% (от суммы всех компонентов смеси П), *b* – начальная концентрация соединений в смеси менее 1% (от суммы всех компонентов смеси П). Здесь и на рис. 4 время после внесения катализатора соответствует: 1 – 0 ч, 2 – 2 ч, 3 – 4 ч, 4 – 20 ч, 5 – 24 ч

**Fig. 3.** Dynamics of concentrations of unidentified mixture P components in culture liquid containing catalyst and bacteria cells: (*a*), initial concentration of components is superior to 1% of total content of components in mixture P; (*b*), initial concentration is lower than 1%. Here and in Fig. 4, time after catalyst introduction is: 1, 0 h, 2, 2 h, 3, 4 h, 4, 20 h, 5, 24 h



a



b

**Рис. 4.** Динамика концентрации ПХБ смеси П в культуральной жидкости, содержащей катализатор и бактериальные клетки: *a* – начальная концентрация соединений в смеси выше 1 % (от суммы всех компонентов смеси П), *b* – начальная концентрация соединений в смеси менее 1% (от суммы всех компонентов смеси П).

**Fig. 4.** Dynamics of PCB concentration in mixture P in culture liquid containing catalyst and bacterial cells: (*a*), initial concentration of components is superior to 1% of total content of components in mixture P; (*b*), initial concentration is lower than 1%

Установлено, что штамм КТ112-7 эффективно разлагает неидентифицированные соединения, содержащиеся в смеси П (рис. 3). Уже через 2 ч культивирования происходит изменение состава, на хроматограмме не регистрируются пять соединений, со временем выхода пиков 14,5, 15,9, 18,3, 18,5 и 22,0 мин (рис. 3). К концу эксперимента среди неидентифицированных веществ отсут-

ствует 14 соединений (рис. 3). Ранее нами было показано, что данный штамм проявляет высокую активность к производным ПХБ, образующимся при реакции смеси ПХБ марки Совол и полиэтиленгликолем, а также с 2-аминоэтанолом [27, 28]. Таким образом, штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 эффективно разлагает производные ПХБ, полученные различными химическими методами.



Известно, что аэробные бактериальные штаммы предпочтительно окисляют низкохлорированные бифенилы (1–4 атома хлора в молекуле), а анаэробные бактерии осуществляют восстановление высокохлорированных конгенов ПХБ [13, 15, 16, 20]. При аэробном процессе происходит ферментативное окисление одного из колец молекулы ПХБ, преимущественно с меньшим количеством заместителей. Анализ литературы показал, что деструктивная активность штаммов зависит не только от количества заместителей, но и от их расположения в молекуле бифенила. Ряд штаммов предпочтительнее окисляет ПХБ, молекула которых хлорирована в *орто*-положении. Наиболее известным штаммом с данным типом активности является *Burkholderia xenovorans* LB400 [16, 20]. Напротив, известны штаммы, эффективно окисляющие конгены ПХБ с заместителями в *пара*-положении. Типичным представителем данной группы является штамм *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 [16]. Для штаммов рода *Rhodococcus* (*R. jostii* RHA1, *R. ruber* P25, *Rhodococcus* sp., В7а, *Rhodococcus* sp. G12а) описана способность эффективно разлагать конгены ПХБ, содержащие монохлорированное кольцо с заместителем как в *пара*-, так и в *орто*-положении [15, 16, 25].

Анализ хроматограмм, полученных при биорегенерации 5%-Pd/Сибунит-катализатора, показал, что штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 проявляет наибольшую активность к три- и тетрахлорированным конгенам с заместителями в *орто*- и *пара*-, но не в *мета*-положении (рис. 4, табл. 1). Удельная скорость деструкции для ПХБ47 (2,4,2',4'-ХБ) составила  $46,6 \cdot 10^{-3}$  мкг/ч, а для ПХБ28 (2,4,4'-ХБ) –  $13,8 \cdot 10^{-3}$  мкг/ч. Ранее нами было отмечено, что штамм КТ112-7 способен разлагать устойчивые к микробной атаке ПХБ49 и ПХБ52 (в молекуле присутствуют заместители в *орто*- и *мета*-положении) в процессе биодеструкции химически модифицированной смеси Совол [27]. В настоящем исследовании штамм КТ112-7 также проявил высокую деградативную активность к данным конгенам (рис. 4). Удельная скорость деструкции для ПХБ49 (2,4,2',5'-ХБ) составила  $3,0 \cdot 10^{-3}$  мкг/ч, а для ПХБ52 (2,5,2',5'-ХБ) –  $8,5 \cdot 10^{-3}$  мкг/ч.

Анализ удельной скорости деструкции показал, что для конгенов ПХБ, включенных в первую группу (начальная концентрация выше 1% от суммы всех компонентов в смеси П) данный показатель составил  $(5,6–46,6) \cdot 10^{-3}$  мкг/ч, а для конгенов ПХБ, включенных во вторую группу –  $(0,3–4,2) \cdot 10^{-3}$  мкг/ч. При этом отмечено, что

штамм КТ112-7 эффективно разлагал пента- и гекса-хлорированные бифенилы (рис. 4, табл. 1). 100%-ная деструкция через 2 ч отмечена для ПХБ105 и ПХБ138, через 4 ч – для ПХБ41, ПХБ56, ПХБ64, ПХБ66, ПХБ91, ПХБ95 и ПХБ180, а через 24 ч – для ПХБ40, ПХБ82, ПХБ85, ПХБ87, ПХБ 110 и ПХБ118. В работе Kolar et al. описаны бактериальные ассоциации, содержащие в своем составе штаммы рода *Rhodococcus*, осуществляющие 100%-ную деструкцию дихлорированных бифенилов и ПХБ25, ПХБ26, ПХБ27 (трихлорированные бифенилы) при трансформации Арохлора 1248 [12]. Изученный нами ранее штамм *R. ruber* P25 в условиях биоремедиации Совол-загрязненной почвы за 15–30 сут осуществляет 100%-ную деструкцию ряда три-, тетра- и пентахлорированных бифенилов, а именно ПХБ28, ПХБ44, ПХБ64, ПХБ74 и ПХБ91 [25]. Можно предположить, что высокая активность штамма КТ112-7 обусловлена взаимодействием субстрат–клетка–катализатор, обеспечивающим оптимальное расположение молекул ПХБ для ферментативной атаки.

Таким образом, проведенные исследования подтвердили предположение о возможности осуществления регенерации металл/углеродных катализаторов, загрязненных смесью хлорароматических соединений, с помощью биологических агентов, а в частности, аэробных бактерий. Использование штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 при биорегенерации ПХБ-загрязненного 5%-Pd/Сибунит катализатора обеспечило очистку частиц катализатора на 99%. При этом основная часть загрязняющей смеси была отделена от катализатора за первые два часа взаимодействия бактериальных клеток и частиц 5%-Pd/Сибунита. Важным является и тот факт, что штамм КТ112-7 эффективно трансформирует соединения, входящие в состав загрязняющей смеси. Уровень деструкции составил 97%. Полученные результаты позволяют разработать метод биорегенерации ПХБ-загрязненных металл/углеродных катализаторов, который будет обеспечивать компромиссный выбор между экономической эффективностью и экологической безопасностью.

Авторы выражают благодарность к.х.н. Перовой М.Г. (ИОС УрО РАН, г. Екатеринбург) за помощь в исследовании образцов методом газохроматографического анализа. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Поиск и селекция новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии. Создание иммунохимических диагностических систем» (номер государственной регистрации 01201353246).

## ЛИТЕРАТУРА

- Трегер Ю. СО<sub>3</sub> – стойкие и очень опасные. *The Chemical Journal*, 2013, (1), 30–34.
- Erikson M.D., Kaley P.R.G. Applications of polychlorinated biphenyls. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2011, 18(2), 135–151. doi: 10.1007/s11356-010-0392-1
- Murugan K., Vasudevan N. Intracellular toxicity by PCBs and role of VBNC bacterial strains in biodegradation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2018, 157, 40–60. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.03.014
- Ross G. The public health implications of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2004, 59, 275–291. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.003>
- Горбунова Т.И., Первова М.Г., Забелина О.Н., Салютин В.И., Чупахин О.Н. Полихлорирбифенилы. Проблемы экологии, анализа и химической утилизации. М.: Красанд, 2011, 400.
- Занавескин Л.Н., Аверьянов В.А. Полихлорбифенилы: проблемы загрязнения окружающей среды и технологические методы обезвреживания. *Успехи химии*. 1998, 67(8), 788–800. doi:10.1070/RC1998v067n08ABEH000412
- Межаев А.В., Первова М.Г., Таран О.П., и др. Наносистемы Pd/Сибунит – эффективные катализаторы процесса гидрохлорирования токсичных хлорароматических продуктов. *Наносистемы, наноматериалы, нанотехнологии*. 2010, 8(4), 799–811.
- Сагдеев К.А., Галлямова Р.Ф., Сагдеев А.А., Гумеров Ф.М. Исследование процесса регенерации алюмопалладиевого катализатора методом сверхкритической флюидной экстракции. *Химия и химическая технология*. 2014, 57(8), 64–67.
- Макаров А.М. Регенерация металлических катализаторов в промышленной очистке газовых выбросов предприятий. *Фундаментальные исследования*. 2006, (8), 91.
- Каменер Е.А., Кравченко А.З., Афанасьева Т.С. и др. Способ регенерации хемосорбента-катализатора на угольной основе. Патент РФ, 2011, № 2436629.
- Adebusoye S.A., Ilori M.O., Picardal F.W. et al. Cometary degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by axenic cultures of *Ralstonia* sp. strain SA-5 and *Pseudomonas* sp. strain SA-6 obtained from Nigerian contaminated soils. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 24(1), 61–68. doi: 10.1007/s11274-007-9438-z
- Kolar A.B., Hršak D., Fingler S., et al. PCB-degrading potential of aerobic bacteria enriched from marine sediments. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2007, 60, 16–24. doi: 10.1016/j.ibiod.2006.11.004
- Kim S., Picardal F.W. A novel bacterium that utilizes monochlorobiphenyls and 4-chlorobenzoate as growth substrates. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000, 185(2), 225–229. doi: 10.1016/S0378-1097(00)00091-4
- Frame G. Congener-specific PCB analysis. *Anal. Chem.* 1997. 69(15), 468A-475A. doi: 10.1021/ac971725x
- Егорова Д. О., Демаков В. А., Плотникова Е. Г. Разложение смеси (три-гекса)хлорированных бифенилов штаммами рода *Rhodococcus*. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2011, 47(6), 655–662. doi: 10.1134/S0003683811060044.
- Pieper D.H. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, 67(2), 170–191. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1810-4>
- Hatamian-Zarmi A., Shojaosadati S.A., Vasheghani-Farahani E., et al. Extensive biodegradation of highly chlorinated biphenyl and Aroclor 1242 by *Pseudomonas aeruginosa* TMU56 isolated from contaminated soils. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2009. 63, 788–794. doi: 10.1016/j.ibiod.2009.06.009
- Petric I., Bru D., Udiković-Koljic N., Hršak D., et al. Evidence for shifts in the structure and abundance of the microbial community in a long-term PCB-contaminated soil under bioremediation. *J. Hazard. Materials*. 2011, 195, 254–260. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.08.036
- Borja J., Taleon D.M., Auresenia J., Gallardo S. Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process Biochemistry*, 2005, 40(6), 1999–2013. doi: 10.1016/j.procbio.2004.08.006
- Field J.A., Sierra-Alvarez R. Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls. *Environmental Pollution*, 2008, 155, 1–12. doi: 10.1016/j.envpol.2007.10.016
- Егорова Д.О., Корсакова Е.С., Демаков В.А., Плотникова Е.Г. Деструкция ароматических углеводородов штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7, выделенным из отходов соледобывающего предприятия. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2013, 49(3), 267–278. doi: 10.7868/S0555109913030070
- Егорова Д.О., Первова М.Г., Демаков В.А., Плотникова Е.Г. Особенности разложения хлорированных бифенилов штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7 в условиях засоления. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2018, 54(3), 253–263. doi: 10.7868/S0555109918030042
- Межаев А.В., Бутин Ф.Н., Первова М.Г., и др. Pd/Сибунит как эффективный катализатор переноса водорода в реакции гидрохлорирования полихлорбифенилов. *Журнал органической химии*. 2014, 50(6), 912–913. doi: 10.1134/S1070428014060244
- Зайцев Г.М., Карасевич Ю.Н. Подготовительный метаболизм 4-хлорбензойной кислоты у *Arthrobacter globiformis*. *Микробиология*. 1981, 50, 423–428.
- Egorova D.O., Demakov V.A., Plotnikova E.G. Bioaugmentation of a polychlorobiphenyl contaminated soil with two aerobic bacterial strains. *J. Hazardous Materials*, 2013, 261, 378–386. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.07.067

26. Papale M., Giannarelli S., Francesconi S., et al. Enrichment, isolation and biodegradation potential of psychrotolerant polychlorinated-biphenyl degrading bacteria from the Kongsfjorden (Svalbard Islands, High Arctic Norway). *Marine Pollution Bull.*, 2017, 114 (2), 849–859. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.11.011
27. Егорова Д.О., Горбунова Т.И., Первова М.Г., Демаков В.А. Бактериальная деструкция смеси, полученной при химической модификации полихлорированных бифенилов полиэтиленгликолями. *Биотехнология*. 2013, 4, 56–64. doi: 10.1134/S0003683814070023
28. Горбунова Т. И., Первова М. Г., Панюкова А. А. и др. Пример междисциплинарного подхода к проблеме обезвреживания техногенных полихлорбифенилов. *Доклады Академии Наук*. 2014, 454(4), 411–416. doi: 10.7868/S086956521404015X
29. Kim A.A., Djuraeva G.T., Takhtobin K.S., et al. Investigation of PCBs biodegradation by soil bacteria using tritium-labeled PCBs. *J. Radioanalytical Nuclear Chemistry*, 2004, 259(2), 301–304. doi: 10.1023/B:JRNC.0000017307.35460.b9
30. Егорова Д.О., Первова М.Г. Применение природных штаммов-деструкторов в процессах разложения химических поллютантов. *Известия Самарского научного центра РАН*. 2013, 15(3(4)), 1287–1290.

## A strain *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 as a basis for Bioregeneration of PCB-Contaminated Metal/Carbon Catalyst

D.O. EGOROVA<sup>1,\*</sup>, and V.A. DEMAКOV<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Scientific Center, Russian Academy Sciences, Ural Branch, 614081 Perm, Russia*

\*e-mail: daryao@rambler.ru

Received May 31, 2018

Accepted July 6, 2018

**Abstract**—A possibility of the bioregeneration of polychlorobiphenyl-contaminated metal/carbon catalysts using aerobic bacteria as biological agents has been shown. Using the 5%-Pd/Sibunit catalyst contaminated by the products of the hydrodechlorination of the commercial mixture of PCB brand Sovol and a strain of *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 it was proved that the use of the bacterial culture permits to rapidly clean the catalyst with the minimal technical and economic costs. It was established that the degree of the catalyst cleaning for 24 h with the help of the intact bacteria cells was equal to 99% (0.77 mg/mL). According to the gas-liquid chromatography, the *R. wratislaviensis* KT112-7 strain decomposes all the components occurring on 5%-Pd/Sibunit after the reaction of PCB hydrodechlorination. The efficiency of the bacterial destruction made up 97% (0.76 mg/mL). The residual portion of contaminating compounds was adsorbed by the bacterial cells. Therefore, the *R. wratislaviensis* KT112-7 strain can be used as a biological component in the systems for PCB-contaminated metal/carbon catalyst cleaning.

*Key words:* *Rhodococcus*, catalyst, destruction, polychlorinated biphenyls.

**Acknowledgements**—The work was performed within the framework of the state task (number of state registration 01201353246 «Search and selection of new promising microorganisms for biotechnology. The creation of immunochemical diagnostic systems»).

doi: 10.21519/01234-2758-2018-34-4-51-61