

# РОЛЬ БИОПЛЕНОК в ТРАНСФОРМАЦИИ ГИДРОФОБНЫХ ароматических УГЛЕВОДОРОДОВ

Рассмотрены результаты экспериментального моделирования микробиологической трансформации полициклических ароматических углеводородов (нафталина и фенантрена) при участии бактериобентоса из различных местообитаний. Образование биопленок зависело от температурного режима и характера загрязнения донных отложений ароматическими углеводородами на трансграничном участке р. Амур. При трансформации фенантрена формирование биопленок сопровождалось образованием цветных интермедиатов.



## Введение

Загрязнение природных вод нефтепродуктами приняло глобальный характер, а предотвращение углеводородного загрязнения природной среды — одна из самых сложных и актуальных проблем XXI столетия [1]. Отдельную группу ароматических углеводородов образуют полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). Среди широко распространенных промышленных загрязняющих веществ эти соединения представляют особый интерес из-за их устойчивости к разложению и токсичности. Актуальность исследования трансформации и деградации ПАУ обусловлена масштабом загрязнения водных объектов этими поллютантами и вызываемыми ими мутагенным, канцерогенным и тератогенным эффектами [2].

Высокомолекулярные ароматические углеводороды характеризуются гидрофобностью, в воде растворяются весьма ограниченно и могут переноситься с водными массами в составе взвешенных веществ, оседать в дон-

**Л.М. Кондратьева\***, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, ФГБУН Институт водных и экологических проблем Дальневосточного отделения Российской академии наук

**З.Н. Литвиненко**, аспирант, ФГБУН Институт водных и экологических проблем Дальневосточного отделения Российской академии наук

ные отложения (ДО). Наиболее быстро подвергается трансформации бициклический нафталин в связи с более высокой растворимостью (31,7 мг/л), по сравнению с трехциклическим фенантrenom (1,29 мг/л). Другие высокомолекулярные ПАУ более стойки к биодеградации из-за их низкой растворимости и большого молекулярного веса [3, 4].

В настоящее время наиболее широко изучены пути деградации нафталина и фенантрена при участии отдельных штаммов бактерий. Информация о механизмах их деградации используется для понимания и прогнозирования интенсивности разложения ПАУ, имеющих более сложную структуру [4, 5].

Известно, что нафталин метаболизируется через *цис*-1,2-дигидрокси-1,2-дигидронафталин до салицилового альдегида, салициловой кислоты и катехола. Нетипичными метаболитами нафталина являются 1-нафтол, 2,2-дигидрокси-нафталин, 2-карбоксикоричная кислота, фталиевая и бензойные кислоты. Фенантрен в результате последовательных реакций трансформируется до 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты. Дальнейшие биохимические пути деградации этого соединения могут быть различ-

\*Адрес для корреспонденции: kondrlm@rambler.ru

ными — возможно образование *o*-фталата и протокатехата, которые далее расщепляются до интермедиатов цикла Кребса [5].

Самоочищение водных экосистем от углеводородного загрязнения — сложный, многофакторный процесс, состоящий из одновременно протекающих физических, химических и биологических процессов. Важную роль в очищении водных экосистем от нефтепродуктов играют микробиологические процессы, в которых принимают участие планктонные и бентосные микробные комплексы.

Микроорганизмы могут выступать в качестве индикаторов поступления природных и антропогенных углеводородов, процессов их преобразования, а также вторичного загрязнения водной среды [3]. Например, бактериобентос принимает участие в самоочищении водных экосистем путем трансформации гидрофобных углеводородов, поступающих на дно в результате седиментации. Однако в отдельных случаях образуются промежуточные продукты разложения (интермедиаты), которые могут выступать в качестве факторов экологического риска в связи со своей высокой растворимостью и токсичностью [6].

Скорость трансформации ПАУ зависит от многих абиотических и биотических факторов, в том числе от способности микроорганизмов вести прикрепленный образ жизни. Установлено, что адгезивная активность микроорганизмов определяет эффективность утилизации углеводородов [7]. Высокая устойчивость к стрессам прикрепленных клеток микроорганизмов обусловлена способностью образовывать биопленки с развитым полисахаридным матриксом. Образование биопленок связано с персистенцией клеток к токсичным веществам, повышенной каталитической активностью и их способностью синтезировать экзогенные ферменты при контакте с гидрофобным субстратом [8, 9]. Клетки, объединенные в биопленки, более активны, чем свободные клетки, их иммобилизация способствует функциональной активности [10-12]. Формирование биопленок имеет важное значение для решения ряда технологических вопросов при очистке сточных вод [8, 13, 14].

Весьма актуальным является исследование активности природных микробных комплексов при загрязнении водных экосистем углеводородами сложного строения. Среди целого ряда экологических проблем Приамурья существует проблема трансграничного загрязнения р. Амур загрязненными

**О.Ю. Морозова,**  
младший научный сотрудник,  
ФГБУН Институт водных и экологических проблем  
Дальневосточного отделения  
Российской академии наук

водами р. Сунгари, водосбор которой расположен на территории Китая. Последствия загрязнения р. Амур связаны с биоаккумуляцией токсичных веществ в рыбе, риском для здоровья населения и проблемами водоподготовки [15, 16]. Поэтому исследование механизмов трансформации стойких органических веществ, включая ПАУ, имеет важное научное и прикладное значение.

Цель наших исследований состояла в определении особенностей трансформации нафталина и фенантрена бентосными микробными комплексами из различных местообитаний при изменении температурного режима.

## Материалы и методы исследования

**Н**а участке от г. Благовещенска до г. Хабаровска в формировании качества воды и химического состава ДО р. Амур принимают участие три крупных притока — реки Зeya, Бурea и Сунгари. Интенсивное развитие промышленности и сельского хозяйства в бассейне р. Сунгари оказывает существенное влияние на качество воды на трансграничном участке от ее устья до водозабора г. Хабаровска. Среди приоритетных загрязнителей р. Амур в зоне влияния стока р. Сунгари были идентифицированы различные органические соединения, включая ПАУ [15, 16].

Для оценки самоочищающей способности р. Амур по отношению к стойким ароматическим углеводородам (бициклический — нафталин и трехциклический — фенантрен) были использованы бентосные микробные комплексы из ДО, отобранных на различных участках р. Амур — выше и ниже устья р. Сунгари, на Нижнем Амуре (с. Савинское).

Культивирование бентосных микроорганизмов проводили в жидкой питательной среде следующего состава (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 1,33;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 2,67;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  — 1,0;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  — 2,0;  $\text{KNO}_3$  — 2,0;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — следы,  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  — 0,1. Инокулят готовили из расчета 1 г сырой навески ДО на 100 мл дистиллированной воды, встряхивали на шейкере в течение 20 мин. Затем 1 мл суспензии вносили в колбы со 100 мл стерильной питательной среды с предварительно внесенными источниками углерода. Фенантрен и нафталин вносили в горячую питательную среду в виде растертой пудры из расчета 100 мг на 100 мл.

Учитывая сезонность трансформации ПАУ, оценивали влияние трех вариантов температурного режима:

1 вариант: 2 °С — имитация зимнего периода;

2 вариант: 23 °С — условия, приближенные к теплому периоду года (середина лета);

3 вариант: переходный температурный режим — 30 сут культивировали при 2 °С, затем до конца эксперимента при 23 °С.

Длительность эксперимента составляла 80 сут. Для оценки активности трансформации ПАУ каждую неделю проводили описание культуральных характеристик модельных комплексов, учитывая следующие показатели: изменение цветности культуральной жидкости (**КЖ**), разрыхление частиц субстрата, образование биопленок, адгезия на стекле (на дне колб). Качественные показатели выражали в баллах от 0 до 2. Такой подход позволяет определить: активность биосорбции бентосных микроорганизмов на гидрофобных углеводородах; влияние температурного фактора на характер трансформации; адаптационный потенциал к загрязнению местообитаний выше и ниже устья р. Сунгари и на Нижнем Амуре.

Идентификацию продуктов трансформации ПАУ проводили в аналитической лаборатории Хабаровского краевого центра экологического мониторинга природной среды методом хроматомасс-спектрометрии на приборе GCMS-QP 2010 «Shimadzu» по полному ионному току.

**Ключевые слова:** биопленки, трансформация, нафталин, фенантрен, бактериобентос

## Результаты и их обсуждение

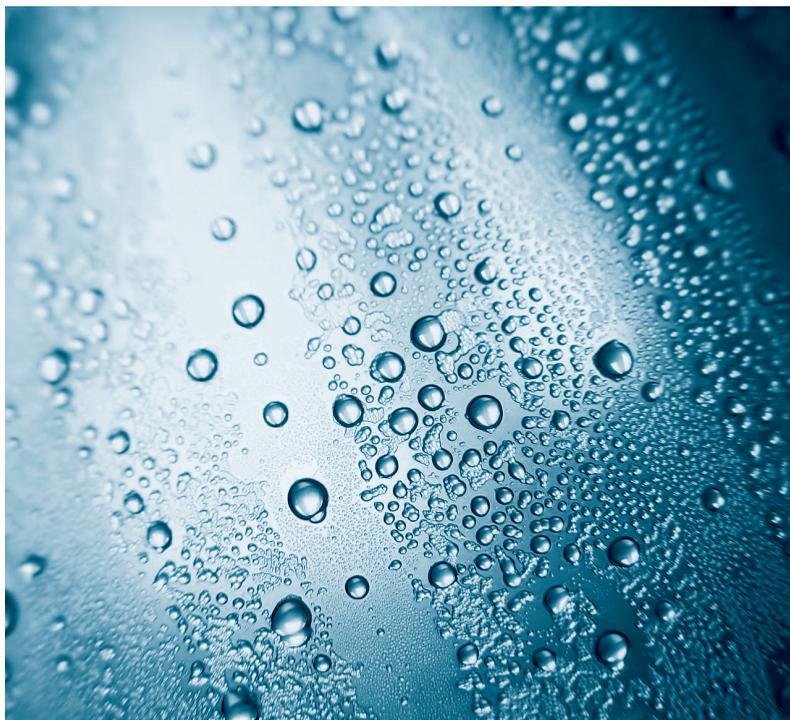
Известно, что особую роль в формировании химического состава природных вод играют ДО. Донный ил выступает в роли сорбента и как активная среда для жизнедеятельности бентосных организмов, участвующих в процессах самоочищения водных экосистем. ДО являются индикаторами загрязнения водных объектов стойкими органическими веществами и ионами тяжелых металлов [3]. Исследование микробиологических процессов в ДО позволяет прогнозировать вторичное загрязнение водной среды [6].

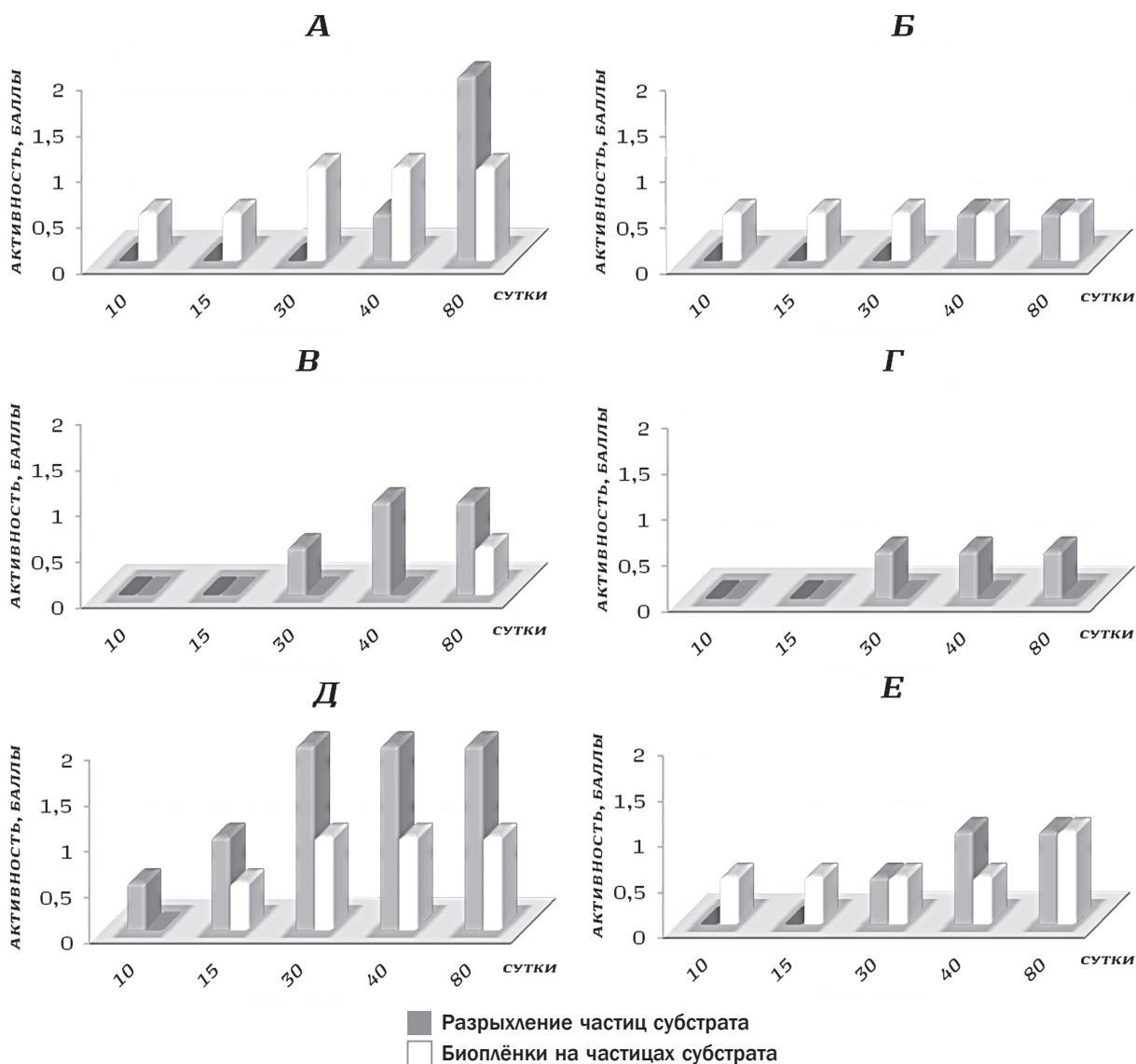
Как показали наши исследования, трансформация ПАУ (нафталин, фенантрен) и механизмы биосорбции бентосных микробных комплексов с различных участков р. Амур отличались в разных вариантах культивирования.

**Нафталин.** В большинстве случаев в вариантах с нафталином биопленки находились в свободном состоянии, реже развивались на частицах субстрата, при встряхивании распались, что свидетельствовало об обратимой адгезии микробных комплексов. Обратимая адгезия является способом быстрого реагирования микроорганизмов на стресс без изменения жизненной стратегии [8].

Адгезия на частицах нафталина бактериобентоса из проб ДО, отобранных на участке выше устья р. Сунгари, наблюдалась уже на 15 сут при температурах 2 °С и 23 °С. Наиболее активная колонизация частиц нафталина с образованием биопленок происходила при низкой температуре начиная с 10 сут, хотя при температуре 2 °С разрыхление частиц субстрата было отмечено только на 80 сут. При температуре 23 °С, начиная с 30 сут, было отмечено образование биопленок на частицах субстрата и их разрыхление (рис. 1). Бактериобентос с Нижнего Амура был менее активным по отношению к нафталину. Образование тонких биопленок наблюдали только при температуре 23 °С.

**Фенантрен.** Трансформация фенантрена сопровождалась бактериальной адгезией к стеклу (на дне колб) при непосредственном контакте с частицами субстрата. При интенсивном изменении цветности КЖ образовывались слизистые темно-бурые биопленки. Это может быть связано с дифференциацией бактериального сообщества на представителей, способных к необратимой адгезии на стекле и развивающихся в виде биопленок в толще КЖ за счет растворенной составля-





**Рис. 1.** Трансформация нафталина бактериобентосом р. Амур при различной температуре: А, Б — при 2 °C выше и ниже устья р. Сунгари; В, Г — при смене температурного режима от 2 °C до 23 °C там же; Д, Е — при 23 °C там же.

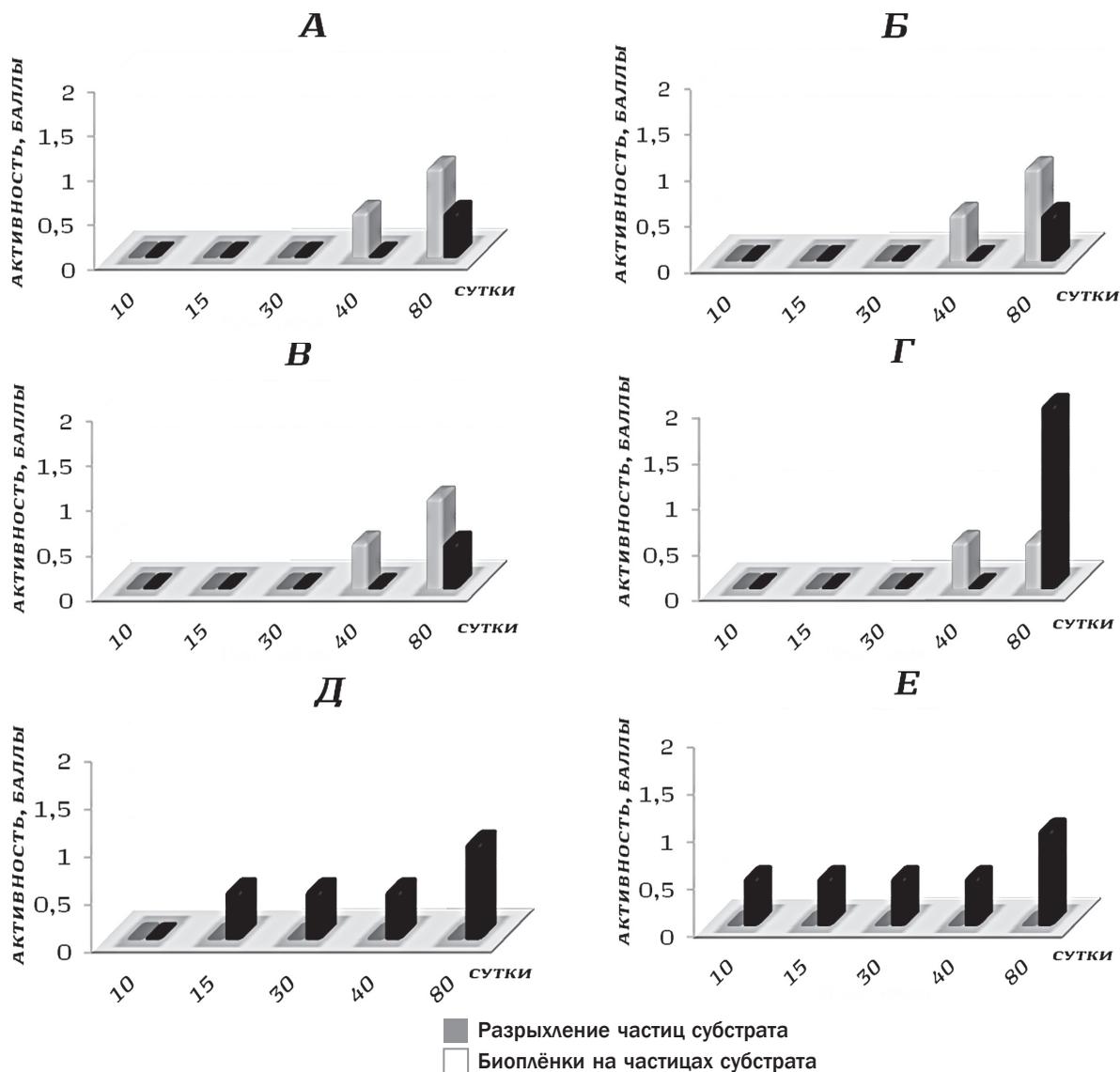
ющей с образованием цветных интермедиатов. Интенсивное образование слизистого матрикса можно связать с защитным механизмом против накопления в КЖ токсичных цветных продуктов деградации ПАУ.

Активное образование биопленок микробными комплексами (местообитания выше и ниже устья р. Сунгари) при культивировании на фенантрене было отмечено уже на 15 сут при температуре 23 °C. Интенсивное образование бурых биопленок к концу эксперимента наблюдали при смене температурного режима при участии бактериобентоса из ДО, отобранных в зоне влияния стока р. Сунгари (рис. 2). При температуре 2 °C активность трансформации фенантрена была слабой и не зависела от местообитания бактерио-

бентоса. Микробные комплексы с Нижнего Амура проявляли слабую активность по отношению к фенантрону только при температуре 23 °C, формируя тонкие биопленки на дне колб.

#### *Продукты трансформации.*

Экспериментальные исследования показали, что при трансформации ПАУ накопление цветных продуктов определяется температурным режимом и структурой микробных комплексов, зависящей от места отбора проб ДО. Образование токсичных цветных продуктов стимулирует продуцирование защитного слизистого матрикса. Изменение абиотических и биотических факторов оказывает существенное влияние на спектр образуемых токсичных продуктов.



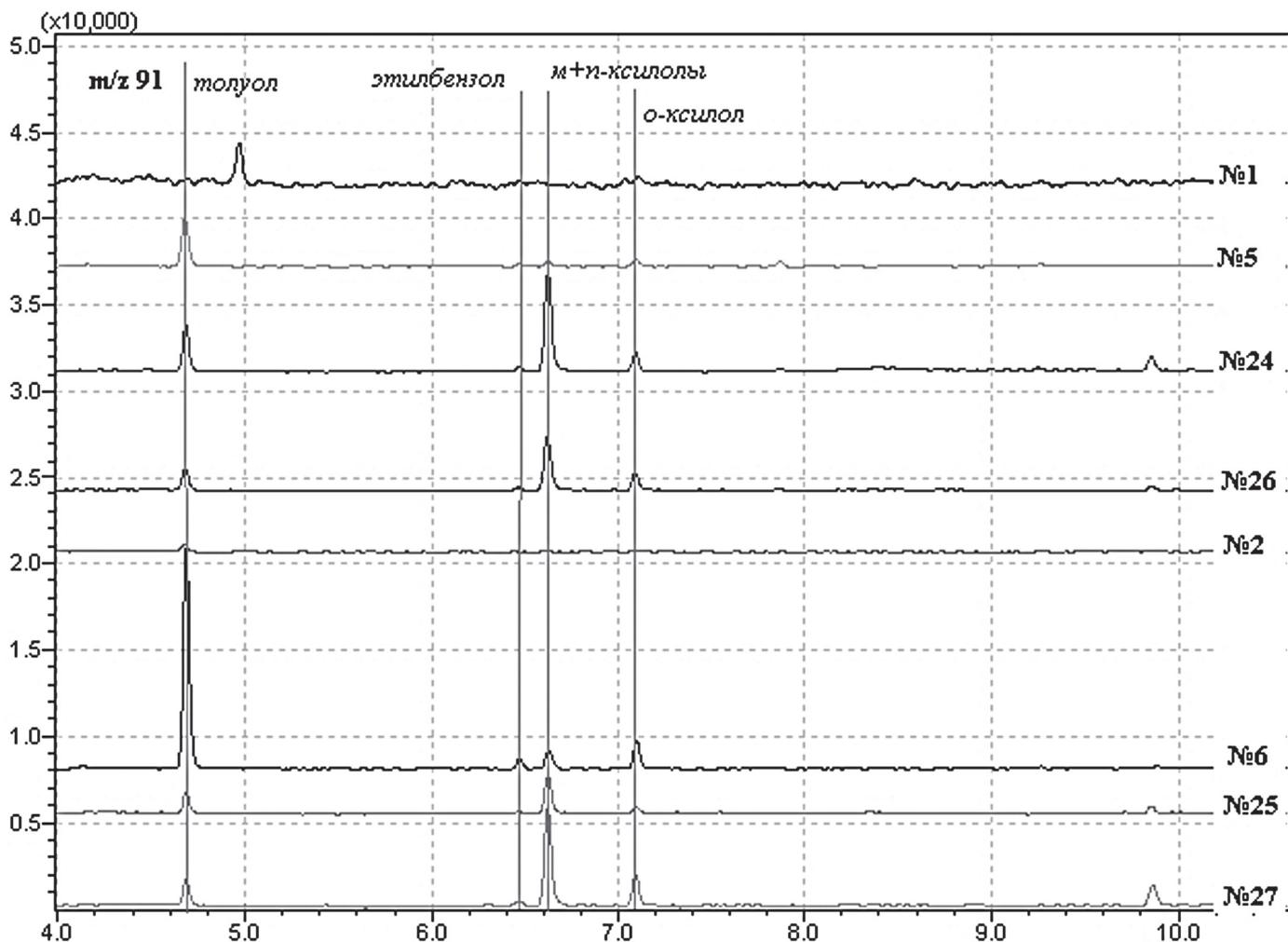
**Рис. 2.** Трансформация фенантрена бактериобентосом р. Амур при различной температуре: А, Б — при 2 °С выше и ниже устья р. Сунгари; В, Г — при смене температурного режима от 2 °С до 23 °С там же; Д, Е — при 23 °С там же.

При трансформации нафталина и фенантрена было отмечено образование диметилбензолов (ксилолов), они накапливались в КЖ независимо от местообитания бактериобентоса. Более высокие концентрации диметилбензолов встречались при трансформации нафталина при низкой температуре, причем доминировали *m*- и *p*-ксилолы.

Экспериментальное моделирование процессов трансформации нафталина позволило выявить вероятность образования в природных условиях целого комплекса метилированных производных бензола (рис. 3), которые часто идентифицируются как компоненты, содержащиеся в сточных водах. Максимальное содержание метилбензола (толуола) было отмечено при трансформации

нафталина в присутствии дополнительного источника углерода (0,2 % пептона) при 23 °С с участием бактериобентоса, испытывающего хроническое загрязнение в зоне влияния р. Сунгари. Такая ситуация может складываться в условиях эвтрофирования в летнее время, когда в водной среде присутствуют азотсодержащие органические вещества и ПАУ. При низкой температуре трансформация нафталина происходила с образованием диметилбензолов независимо от присутствия ко-субстрата.

Изменение абиотических факторов среды обитания коренным образом влияло на механизмы трансформации фенантрена, не только используемого микроорганизмами в качестве единственного источника углерода, но и



**Рис. 3.** Идентификация производных бензола при трансформации нафталина: 1, 5 — бактериобентос из разных местообитаний (выше и ниже устья р. Сунагри) при 23 °С; 24, 26 — то же при 2 °С; 2, 6 — то же в присутствии ко-субстрата при 23 °С; 25, 27 — то же в присутствии ко-субстрата при 2 °С.

при соокислении с легко доступными органическими веществами. Например, фенантрен в условиях эвтрофирования разлагался очень медленно даже при оптимальном температурном режиме (23 °С). Среди продуктов трансформации в зависимости от условий культивирования присутствовал нафталин. При участии бентосных микробных комплексов в трансформации фенантрена был обнаружен бутилацетат. Токсичность этого интермедиата для гидробионтов недостаточно изучена.

## Заключение

Проведенные экспериментальные исследования особенностей трансформации двух представителей ПАУ (нафталина и фенантрена) бентосными микробными комплексами показали, что разнообразие механизмов

преобразования сложных органических молекул *in situ* регулируется множеством абиотических и биотических факторов, а также их суммарным воздействием. Ведущим фактором, определяющим механизм трансформации ПАУ, является структура сообществ, сформировавшихся под влиянием конкретных поллютантов благодаря их адапционным возможностям, включая адгезивную способность.

Принимая во внимание, что стойкие органические вещества разлагаются очень медленно, они вовлекаются в процесс трансформации, происходящий в разные сезоны года при изменяющемся температурном режиме, который в значительной степени определяет ферментативную активность микробных комплексов. Образование биопленок и разрушение частиц нафталина наиболее активно происходило при участии бактериобентоса, развивающегося выше устья р. Сунагри

при широком диапазоне температур (23 °С и 2 °С).

В зоне влияния р. Сунгари повышенная активность микробных комплексов, культивируемых на фенантрена, отмечалась при температуре 23 °С, а также при смене температурного режима через 30 сут с 2 °С до 23 °С. Изменение температурного режима не повлияло на характер трансформации нафталина.

Использование бентосных сообществ из различных местообитаний позволило выявить особенности трансформации бициклических и трициклических ПАУ на трансграничном участке р. Амур. Полученные данные позволяют предположить, что при медленном разложении ПАУ могут накапливаться вещества, изменяющие цветность водной среды. Изменение цветности можно использовать в качестве маркера активизации микробиологических процессов, происходящих при трансформации ароматических углеводородов, в результате которых образуются токсичные интермедиаты. Отметим, что показатели цветности и образования биопленок не зависели друг от друга. Это может быть связано с различными механизмами утилизации субстрата – потреблением растворенной составляющей фенантрена и при непосредственной сорбции и образовании биопленок на частицах нафталина. Адгезивные свойства и образование биопленок микроорганизмами зависели от места их обитания и характерного загрязнения ДО, обусловленного источниками поступления ПАУ.

При экспериментальном моделировании трансформации нафталина и фенантрена природными микробными комплексами было установлено, что изменение абиотических факторов оказывает существенное влияние на соотношение токсичных летучих продуктов, среди них чаще всего встречались метилированные и этилированные производные бензола. Учитывая субстратную специфичность ферментов, принимающих участие в деструкции ПАУ независимо от их происхождения, можно прогнозировать вторичное загрязнение водной среды при загрязнении ДО ароматическими углеводородами.

## Литература

1. Гаев А.Я. К методике изучения углеводородного загрязнения / А.Я. Гаев, В.В. Фетисов, В.И. Якшина, Е.А. Леонтьева // Вестник Воронежского государственного университета. Вып. Геология. 2001. №11. С. 261-263.

2. Озерский А.Ю. Основы геохимии окружающей среды. Красноярск: ИПК СФУ, 2008. 316 с.

3. Кондратьева Л.М. Экологический риск загрязнения водных экосистем. Владивосток: Дальнаука, 2005. 299 с.

4. Jong-Su Seo. Bacterial degradation of aromatic compounds / Jong-Su Seo, Young-Soo Keum, Qing X. Li // Int. J. Env. Res. Pub. He. 2009. №6. P. 278-309.

5. Пунтус И.Ф. Деграция фенантрена бактериями родов *Pseudomonas* и *Burkholderia* в модельных почвенных системах / И.Ф. Пунтус, А.Е. Филонов, Л.И. Ахметов, А.В. Карпов, А.М. Боронин // Микробиология. 2008. Т. 77. №1. С. 11-20.

6. Кондратьева Л.М. Вторичное загрязнение водных экосистем // Водные ресурсы. 2000. Т. 27. №2. С. 221-231.

7. Рубцова Е.В. Влияние условий культивирования родококков на их адгезивную активность в отношении жидких углеводов / Е.В. Рубцова, М.С. Куюкина // Матер. VII Междунар. науч. конф. «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии», Минск: Беларуская навука, 2010. С. 328-384.

8. Costerton J. W. The Biofilm Primer. Springer Berlin Heidelberg New York, 1 ed, 2007. 199 p.



9. Николаев Ю.А. Ауторегуляция стрессового ответа микроорганизмов. Автореф. дис. д-ра. биол. наук. М., 2011. 48 с.
10. Meyer-Reil L.A. Microbial life in sedimentary biofilms – the challenge to microbial ecologists // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1994. V. 112. P. 303-311.
11. Singh R. Biofilms: implications in bioremediation / Singh R., Paul D., Jain R.K. // *Trends Microbiol.* 2006. V. 14. №9. P. 49-64.
12. Shimada K. Efficacy of forming biofilms by naphthalene degrading *Pseudomonas stutzeri* T102 toward bioremediation technology and its molecular mechanisms / Shimada K., Itoh Y., Washio K., Morikawa M. // *Chemosphere.* 2012. №87(3). P. 226-233.
13. Николаев Ю.А. Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? / Ю.А. Николаев, В.К. Плакунов // *Микробиология.* 2007. Т. 76. №2. С. 149-163.
14. Плакунов В.К. Микробные биопленки: перспективы использования при очистке сточных вод // *Вода: химия и экология.* 2008. №2. С. 11-13.
15. Кондратьева Л.М. Загрязнение р. Амур полиароматическими углеводородами / Л.М. Кондратьева, Н.К. Фишер, О.Ю. Стукова, Г.Ф. Золотухина // *Вестник ДВО РАН.* 2007. №4. С. 17-26.
16. Рапопорт В.Л. Загрязнение реки Амур антропогенными и природными органическими веществами / В.Л. Рапопорт, Л.М. Кондратьева // *Сибирский экологический журнал.* 2008. Т. 15. №3. С. 485-496.



L.M. Kondrat'eva, Z.N. Litvinenko, O.Yu. Morozova

## BIOFILM ROLE IN TRANSFORMATION OF HYDROPHOBIC AROMATIC HYDROCARBONS

This work considers the results of experimental modeling of microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (naphthalene, phenanthrene) by bacteriobenthos of various habitats. Biofilm formation depended on temperature regime and sediment pollution by aromatic hydrocarbons in the transboundary area of the Amur River. During phenanthrene transformation biofilm formation resulted in production of colored intermediates.

**Key words:** biofilms, transformation, naphthalene, phenanthrene, bacteriobenthos.