

УДК 579.695:579.262:579.222.2

МЕТАНОГЕННАЯ ДЕСТРУКЦИЯ (АМИНО)АРОМАТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ АНАЭРОБНЫМИ МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ

© 2011 г. Ю. В. Линькова*, А. Т. Дьяконова*, М. А. Гладченко**, С. В. Калюжный**,
И. Б. Котова*, А. Стамс***, А. И. Нетрусов*

* Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992
e-mail: linkovay@gmail.com, kira1959@gmail.com

** Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992

*** Университет Вагенингена, 6703 НВ, Вагенинген, Нидерланды

Поступила в редакцию 08.12.2010 г.

Исследована деструкция ряда ароматических субстратов анаэробными микробными сообществами. Выделены активные метаногенные микробные сообщества, разлагающие аминокислоты и азокрасители до CH_4 и CO_2 . Продукты первичной трансформации аминокислот определены как 2-гидроксибензиловый и бензиловый спирты, последовательно превращающиеся в бензоат. Показано, что выделенные микробные сообщества способны без лаг-периода, но с разными скоростями превращать в биогаз бензиловый спирт, бензоат, салициловую кислоту и азокраситель золотисто-желтый, используемые как исходные субстраты. Впервые определены промежуточные ароматические и линейные интермедиаты биодеструкции ароматических аминов полученными накопительными культурами. Установлено селективное воздействие аминокислотных субстратов на микробное сообщество, выражающееся в снижении разнообразия и последовательной смене доминирующих морфотипов.

С развитием новых химических технологий в биосферу поступает большое количество токсичных и устойчивых соединений, уровень которых возрастает с каждым годом. Аминокислоты, используемые в производстве лекарственных препаратов и лакокрасочных материалов, содержатся в сточных водах предприятий химической и фармацевтической промышленности [1]. Аминокислоты являются также продуктами восстановления азокрасителей в анаэробных условиях [2], причем некоторые имеют природное происхождение. Например, 2-аминобензойная кислота (2-АБК) – предшественник синтеза алкалоидов в растениях, а 4-АБК (4-аминобензойная кислота, витамин H_1) используется кишечной микробиотой для синтеза фолиевой кислоты.

Деструкция таких (амино)ароматических соединений зачастую происходит более эффективно в анаэробных условиях, т.к. в присутствии кислорода многие из них полимеризуются, что затрудняет дальнейшую минерализацию либо образуют токсичные промежуточные продукты [3]. В связи с этим актуальны исследования, направленные на получение микробных сообществ, способных осуществлять процесс минерализации (амино)ароматических ксенобиотиков в отсутствие кислорода.

К настоящему моменту изучены физиолого-биохимические особенности процесса анаэробного расщепления бензольного кольца [1, 4–7], описаны как чистые культуры, так и микробные

сообщества, разрушающие аминокислоты в нитрат-, сульфат- и карбонатредуцирующих условиях [4, 5, 8, 9].

Цель работы – изучение способности микробных сообществ к деструкции ряда ароматических субстратов, часть из которых является интермедиатами анаэробной конверсии аминокислот.

МЕТОДИКА

Исследуемые образцы. Накопительные и чистые культуры выделяли из проб анаэробных илов ряда очистных сооружений и донных отложений естественного водоема (табл. 1, 2). Анаэробные культуры **O4** и **P2** были получены из мезофильного флокулярного ила очистных сооружений Курьяновской станции аэрации (ил **КСА**) путем адаптации к 2-АБК и 4-АБК соответственно в течение длительного периода. Исходным биоматериалом для культуры **EP** послужил анаэробный мезофильный гранулярный ил очистных сооружений пивоваренного завода “Efes Pilsener”, потребляемым субстратом являлась 2-АБК. Анаэробную культуру **Ц** получали путем адаптации анаэробного ила донных отложений озера Цайдам к 5-АСК. Используемые ароматические амины (2-АБК, 4-АБК, 5-АСК) являлись единственным источником углерода и энергии в сообществе.

Условия культивирования. Пробы ила рассевали на минеральную среду [10, 11] следующего состава (мг/л): NH_4Cl – 280, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 10,

Таблица 1. Свойства анаэробных образцов ила, взятых для исследования

Анаэробный образец	Происхождение биологического материала	Физико-химические условия на момент отбора пробы	Морфологические особенности
Мезофильный флокулярный ил, КСА	Очистные сооружения Курьяновской станции аэрации, Москва	15–25°C, pH 7.0, содержание белка 0.69 мг/мл	Черные мелкие частицы, состоящие из тонких палочек разной длины, мелких прямых палочек, кокков разного размера, преимущественно в виде тетрад и крупных диплококков
Мезофильный гранулярный ил, ЕР	Очистные сооружения (EGSB-реактор) стоков пивоваренного завода "Efes Pilsener", Москва	25–30°C, pH 6.5–6.9, содержание белка 1.13 мг/мл	Темные частицы, состоящие из 11 типов палочек и 3 типов кокков, с преобладанием крупных прямых палочек с обрубленными концами в виде коротких цепочек и коккобацилл, лежащих попарно
Донные отложения, Ц	Озеро Цайдам, Бурятия	15–20°C, pH 9.2, содержание белка 0.38–0.53 мг/мл, общая минерализация 14 г/л	Зеленовато-серые крупные рыхлые хлопья, состоящие из скопленных мелких и крупных кокков и палочек разной длины и формы

Таблица 2. Накопительные культуры, расщепляющие аминокислотные субстраты

Вариант	Исходный ил	Параметры культивирования, субстрат	Лаг-период активности биоразложения, сут	Средняя скорость деградации в цикле потребления субстрата, мМ/сут	Стабильность активности (возраст культуры/число циклов потребления)
О4	КСА	30°C, pH 6.5–7.5, 2-АБК	10	0.03	Высокая (9 лет 9 мес/355)
Р2	КСА	30°C, pH 6.5–7.5, 4-АБК	10–14	0.03	Высокая (3 года 7 мес/129)
ЕР	ЕР	30°C, pH 6.5–7.5, 2-АБК	7–14	0.08	Средняя (5 лет 6 мес/39)
Ц	Ц	30°C, pH 7.0, 5-АСК	113	0.07	Средняя (2 года/10)

K_2HPO_4 – 250, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 100, ЭДТА – 1, $NaHCO_3$ – 5000, H_3BO_3 – 0.05, $FeCl_3 \cdot 4H_2O$ – 2, $ZnCl_2$ – 0.05, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 0.05, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0.03, $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ – 2, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0.05, $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$ – 0.1. Среда содержала также 100 мг/л дрожжевого экстракта и индикатор анаэробных условий резазурин (0.2 мг/л), начальный pH среды был 7.0–7.5. Анаэробные условия создавали с помощью замены азотом газовой фазы в закрытых резиновыми пробками флаконах объемом 120 мл, а также внесения восстановителя – 0.278 г/л $Na_2S \cdot 9H_2O$. В качестве основных аминокислотных субстратов использовали 2- и 4-аминобензойные кислоты (2- и 4-АБК), 5-аминосалициловую кислоту (5-АСК), а также бензойную кислоту (БК), 2-гидроксибензиловый спирт (2-ГБС), бензиловый спирт (БС) и салициловую кислоту (СК). Субстраты и другие необходимые добавки хранили в виде стерильных концентрированных растворов в анаэробных условиях и вносили в сосуды шприцем до нужной концентрации. Для формирования анаэробных сообществ в жидкую среду, содержащую (амино)ароматический субстрат, вносили 5–10% (об./об.) гомогенизированной

пробы ила. Накопительные культуры инкубировали при 30°C в статических условиях в темноте и пересевали с помощью стерильных шприцев, соблюдая условия анаэробнозиса.

Определение токсичности. Токсичность ароматических интермедиатов определяли стандартным методом по активности ацетокластического метаногенеза микробного сообщества [12]. В сосуды для культивирования с минеральной анаэробной средой вносили анаэробно инокулят (10% от объема стандартной среды) и добавляли шприцем раствор ацетата натрия до конечной концентрации 2 г/л в качестве субстрата метаногенеза. После внесения аликвот концентрированных растворов токсикантов флаконы помещали в термостат при 30°C. Конечные концентрации ароматических веществ в жидкой фазе составили от 0.5 до 12 мМ. В качестве контролей использовали флаконы без добавления ароматических веществ. Через каждые 24 ч методом газовой хроматографии измеряли концентрацию метана в газовой фазе, полученные результаты представляли в виде графика в координатах: Y – количество метана, мМ; X – время, сут. Значение аце-

токластической активности анаэробного ила рассчитывали по тангенсу угла наклона линейного участка кривой зависимости концентрации метана от времени. За 100% активности принимали тангенс угла наклона линейного участка этой кривой в эксперименте без добавления ароматических токсиантов. Поскольку скорость разложения ароматических веществ в описанных выше условиях (соответственно, и скорость образования ацетата на одном из этапов процесса разложения) намного ниже скорости ацетокластической реакции, вкладом ацетата, который образовался из ароматических веществ, пренебрегали (т.к. его количество слишком мало по сравнению с количеством вносимого ацетата).

Аналитические методы. Концентрации ароматических соединений и продуктов их деградации определяли спектрофотометрически (Shimadzu UV-1202, "Shimadzu", Япония) при соответствующих длинах волн (нм): 5-АСК – 330, 2-АБК – 310, салициловая кислота – 300, сульфаниловая кислота – 255, 4-АБК – 275, а также высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) в обращенных фазах на колонках ChromSpher C18 2–10 см ("Chrompack", Нидерланды) по поглощению при 230 нм. Концентрацию органических кислот и спиртов определяли с помощью ВЭЖХ на колонке Varian Metacarb 67H (300 × 6.5 мм; "Merck", ФРГ). Содержание газов измеряли на газовом хроматографе Shimadzu GC-2014 ("Shimadzu", Япония) с двумя колонками. Разделение водорода и метана проводили на колонке Molsieve 2 м × 3 мм, температура детектора – 100°C, газ-носитель – гелий. CO₂ измеряли на том же хроматографе, температура детектора 33°C, газ-носитель – гелий, колонка – Poraplot Q C37554, 25 м × 0.53 мм ("Chrompack", "Varian Inc.", США).

Микроскопические методы. Морфологические особенности микроорганизмов в образцах исследовали методами фазово-контрастной и световой (микроскоп Биолам-2, "ЛОМО", Россия) микроскопии препаратов живых и термически фиксированных окрашенных фуксином клеток соответственно. Микрофотографии с использованием фазового контраста получали с использованием микроскопа Leica DMR HC ("Wetzlar", ФРГ), оборудованного цифровой камерой Leica DC 250.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Накопительные культуры, деградирующие аминокислоты. Анаэробные накопительные культуры О4, Р2, ЕР и Ц получали путем селективной адаптации активных метаногенных илов к различным аминокислотам.

Для повышения эффективности биodeградации изменяли условия культивирования, используя различные сочетания температуры инкубации и кислотности среды. Оптимальными для про-

цесса биodeградации выбранных аминокислотных субстратов были 30°C и рН 6.5–7.5.

Для всех накопительных культур на начальном этапе был характерен определенный лаг-период, в течение которого не наблюдали активной деструкции субстрата. Время адаптации и длительность цикла минерализации исходного аминокислотного субстрата (табл. 2) в разных вариантах накопительных культур различались, но последовательность появления, состав основных интермедиатов и конечных продуктов оставались неизменными. В качестве промежуточных продуктов всегда образовывались CO₂, H₂ и NH₄⁺, затем бензоат, ацетат. Конечными продуктами деструкции были CH₄ и CO₂. Такая последовательность интермедиатов характерна и для разрушающих аминокислотные соединения анаэробных сообществ, полученных из других источников [8].

Анализ продуктов трансформации аминокислотных субстратов. Для того чтобы определить продукты, образовавшиеся в результате первичной трансформации основных субстратов, был проведен ВЭЖХ-анализ культуральной жидкости, который выявил в качестве продукта первичной трансформации 2-аминобензойной и салициловой кислот бензиловый спирт, последовательно превращающийся в бензоат. Продуктом анаэробной деградации бензилового спирта также была бензойная кислота (табл. 3).

Ранее при исследовании деградации (амино)ароматических соединений в качестве продукта первичной трансформации 5-АСК метаногенным сообществом, полученным из ила очистных сооружений свиноводческого комплекса [9], был определен 2-ГБС. Продукт трансформации 5-АСК микробным сообществом, выделенным из ила озера Цайдам (Бурятия), был также идентифицирован, как 2-ГБС, превращающийся последовательно в бензоат.

Для проверки возможности реализации альтернативных путей деградации аминокислоты, где в качестве центральных интермедиатов выступают резорцин или флороглюцинол, было изучено потребление сообществом ЕР, изначально адаптированным к 2-АБК, флороглюцинола, резорцина и его аналога пирогаллола (табл. 4). Отсутствие потребления флороглюцинола и резорцина данным сообществом наряду с наличием интермедиатов разложения 2-АБК и 5-АСК свидетельствует о реализации бензоил-КоА-пути деструкции аминокислотных субстратов [13] микробными сообществами.

Деструкция накопительными культурами аминокислотных субстратов. Для определения метаболических возможностей накопительных культур О4, Р2 и ЕР проверяли их способность к деструкции интермедиатов анаэробной биоконверсии ами-

Таблица 3. Использование ароматических субстратов сообществами O4, P2 и EP, адаптированными к аминокислотам

Культура	Субстрат	Скорость потребления, мМ/сут	Промежуточные продукты	Конечные продукты
O4	2-АБК, основной	0.03	Бензиловый спирт, бензоат, ацетат, NH ₄ ⁺	CH ₄ , CO ₂
	ЗЖ	0.25	Сульфаниловая кислота, ацетат, этанол	CH ₄ , CO ₂
	БС	0.167	Бензоат, ацетат, этанол (следы)	CH ₄ , CO ₂
	БК	0.071	Ацетат, этанол (следы)	CH ₄ , CO ₂
	2-ГБС	0	—	—
	СК	0	—	—
P2	4-АБК, основной	0.03	Бензиловый спирт, бензоат, ацетат, NH ₄ ⁺	CH ₄ , CO ₂
	ЗЖ	0.22	Сульфаниловая кислота, ацетат, этанол	CH ₄ , CO ₂
	БС	0.040	Бензоат, ацетат, этанол (следы)	CH ₄ , CO ₂
	БК	0	—	—
	2-ГБС	0	—	—
	СК	0	—	—
EP	2-АБК, основной	0.08	Бензиловый спирт, бензоат, ацетат, NH ₄ ⁺	CH ₄ , CO ₂
	ЗЖ	0.12	Сульфаниловая кислота, ацетат, этанол	CH ₄ , CO ₂
	БС	0.022	Бензоат, ацетат, этанол	CH ₄ , CO ₂
	БК	0.113	Ацетат, этанол (следы)	CH ₄ , CO ₂
	2-ГБС	0.002	H ₂ (следы), бензоат, ацетат, этанол (следы)	CH ₄ , CO ₂
	СК	0	—	—

нобензойных кислот (бензиловый спирт, бензойная кислота, 2-гидроксibenзиловый спирт), а также салициловой кислоты и кислотного азокрасителя золотисто-желтого (ЗЖ).

Довольно активное, практически без лаг-периода, потребление бензинового спирта с образованием CH₄ и CO₂ в качестве конечных продуктов наблюдали в культурах O4, P2 и EP. Наиболее значительная деградация происходила в сообществах O4 и P2, ранее подвергавшихся более длительному воздействию аминокислотного субстрата, чем вариант EP. Бензойную кислоту с образованием CH₄ и CO₂ потребляли накопительные культуры O4 и EP, причем вариант EP отличался большей активностью. В качестве промежуточных продуктов регистрировали ацетат и следы этанола.

Незначительное потребление 2-гидроксibenзинового спирта (0.34 мМ) с образованием CH₄ и CO₂ происходило только в варианте EP (табл. 3). При этом лаг-период активности культуры составил 150 сут. На 7 сут регистрировали следы молекулярного водорода, бензоат, ацетат, а также следы этанола. Полной минерализации субстрата не происходило даже спустя 200 сут, что могло быть связано с токсичностью данного субстрата.

Таким образом, изученные накопительные культуры оказались способны к расщеплению ряда ароматических субстратов без лаг-периода, но с разными скоростями. Это согласуется с данными других авторов [11, 12] о значении химической природы и положения заместителей в молекулах ароматических соединений для их деструкции метаногенными микробными сообществами.

Токсичность использованных ароматических субстратов. Оценка цитотоксичности ароматических ксенобиотиков является одним из важных параметров при определении возможности использования микроорганизмов для минерализации таких веществ. Зачастую стадия образования метана лимитирует процесс минерализации органического вещества микробным сообществом. Центральным субстратом метаногенеза считается ацетат, из которого при разложении органических веществ образуется более 70% метана [14]. Изменение уровня ацетокластического метаногенеза в присутствии поллютанта можно сравнительно легко зарегистрировать в лабораторных условиях, в связи с чем этот метод применяют, как стандартный способ определения токсичности ксенобиотика для микробного сообщества [11]. Однако данный метод не позволяет определить степень воздействия токсиканта на другие функ-

Таблица 4. Использование ароматических субстратов накопительной культурой E.P, первоначально адаптированной к 2-АБК

Субстрат	Скорость потребления субстрата, мМ/сут	Ароматические промежуточные продукты	Линейные промежуточные продукты	Конечные продукты
2-АБК	0.08	Бензиловый спирт → бензоат	→ ацетат	CH ₄ , CO ₂ , NH ₄ ⁺
2-АБК + пируват	0.20	Бензиловый спирт → бензоат	→ ацетат, пропионат, H ₂	CH ₄ , CO ₂ , NH ₄ ⁺
Бензиловый спирт	0.022	→ Бензоат	→ ацетат, этанол (следы)	CH ₄ , CO ₂
Бензиловый спирт + пируват	1.419	→ Бензоат	→ ацетат, пропионат	CH ₄ , CO ₂
Бензойная кислота	0.113	–	→ ацетат, этанол (следы)	CH ₄ , CO ₂
Бензойная кислота + пируват	0.312	–	→ ацетат, пропионат	CH ₄ , CO ₂
Салициловая кислота	0	–	–	–
Салициловая кислота + пируват	0.0745	Бензиловый спирт → бензоат	→ ацетат, пропионат, H ₂	CH ₄ , CO ₂
2-гидроксибензиловый спирт	0.002	Бензальдегид → бензоат	→ ацетат	CH ₄ , CO ₂
2-ГБС + пируват	0.011	Бензальдегид → бензоат	→ ацетат, пропионат	CH ₄ , CO ₂
Бензальдегид	0	–	–	–
Бензальдегид + пируват	0.5	→ Бензоат	→ ацетат, пропионат	CH ₄ , CO ₂
Пирогаллол	0	–	–	–
Пирогаллол + пируват	0.019	–	→ ацетат, бутират, H ₂	CH ₄ , CO ₂
Флороглюцинол	0	–	–	–
Резорцин	0	–	–	–
Флороглюцинол + пируват	Потребления субстрата не происходило, наблюдали только сбраживание пирувата	–	→ ацетат, бутират (из пирувата)	CH ₄ , CO ₂
Резорцин + пируват		–	→ ацетат, формиат, лактат, бутират	CH ₄ , CO ₂

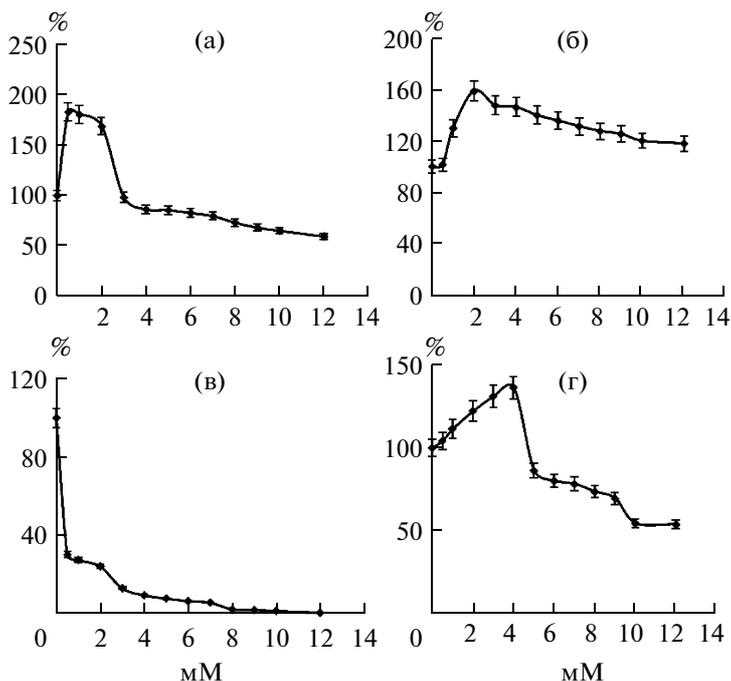


Рис. 1. Токсичность ароматических субстратов по отношению к метаногенному сообществу ЕР (ацетокластическая активность, %): а – бензиловый спирт; б – салициловая кислота; в – 2-гидроксибензиловый спирт; г – бензойная кислота.

циональные и таксономические группы микроорганизмов, входящие в сообщество.

Токсичность ароматических веществ по отношению к анаэробному сообществу ЕР уменьшается в ряду: 2-ГБС > бензиловый спирт > бензойная кислота > салициловая кислота (рис. 1). Концентрация, при которой ацетокластическая метаногенная активность микробного сообщества снижается на 50% (IC_{50}), составила для 2-ГБС 0.355 мМ. В случаях бензинового спирта, бензойной и салициловой кислот наблюдали увеличение ацетокластической активности вплоть до концентрации 3, 4 и 12 мМ соответственно. Это можно объяснить минерализацией промежуточного продукта бензоата, в процессе которой в качестве интермедиата образуется дополнительное количество ацетата.

Образование CH_4 и CO_2 накопительными культурами свидетельствует о том, что использованные нами концентрации аминокислот (2–3 мМ) не оказывают сильного токсического действия на метаногенные организмы, присутствующие в культурах, хотя этот метод не является информативным для определения влияния данных ксенобиотиков на другие группы микроорганизмов в сообществе.

Вместе с тем снижение биоразнообразия в сообществе [3] свидетельствует о возможной токсичности ароматики для микроорганизмов, осуществляющих неметаногенные стадии процесса биоразложения.

Стимулирование пируватом процесса биодеградации ароматических субстратов. Помимо основного субстрата, 2-АБК, культура ЕР в присутствии пирувата оказалась способна к деструкции других ароматических субстратов (табл. 4). Внесение 20 мМ пирувата в среду культивирования стимулировало процесс биодеградации как 2-АБК, так и других ароматических веществ. Причем некоторые вещества (салициловая кислота, пирогаллол, бензальдегид) накопительная культура ЕР разлагала только в присутствии пирувата как дополнительного источника углерода и энергии. В случае, когда исследуемый субстрат потреблялся культурой в качестве единственного источника углерода и энергии, добавление пирувата увеличивало скорость потребления ароматики в 2–60 раз.

Таким образом, в присутствии пирувата минерализация основного и других ароматических субстратов происходила значительно быстрее, чем при росте на (амино)ароматическом веществе как единственном источнике углерода и энергии (табл. 4). Параллельно с деструкцией ароматического субстрата сообщество сбраживало пируват, образуя ацетат, пропионат, формиат, бутират и лактат в качестве промежуточных продуктов.

Микроскопическая картина сообщества. При сравнении морфологических особенностей исходного ила и активных накопительных культур было обнаружено селективное воздействие аминокислот. Для накопительной культуры ЕР, разрушающей 2-АБК, при формировании ста-

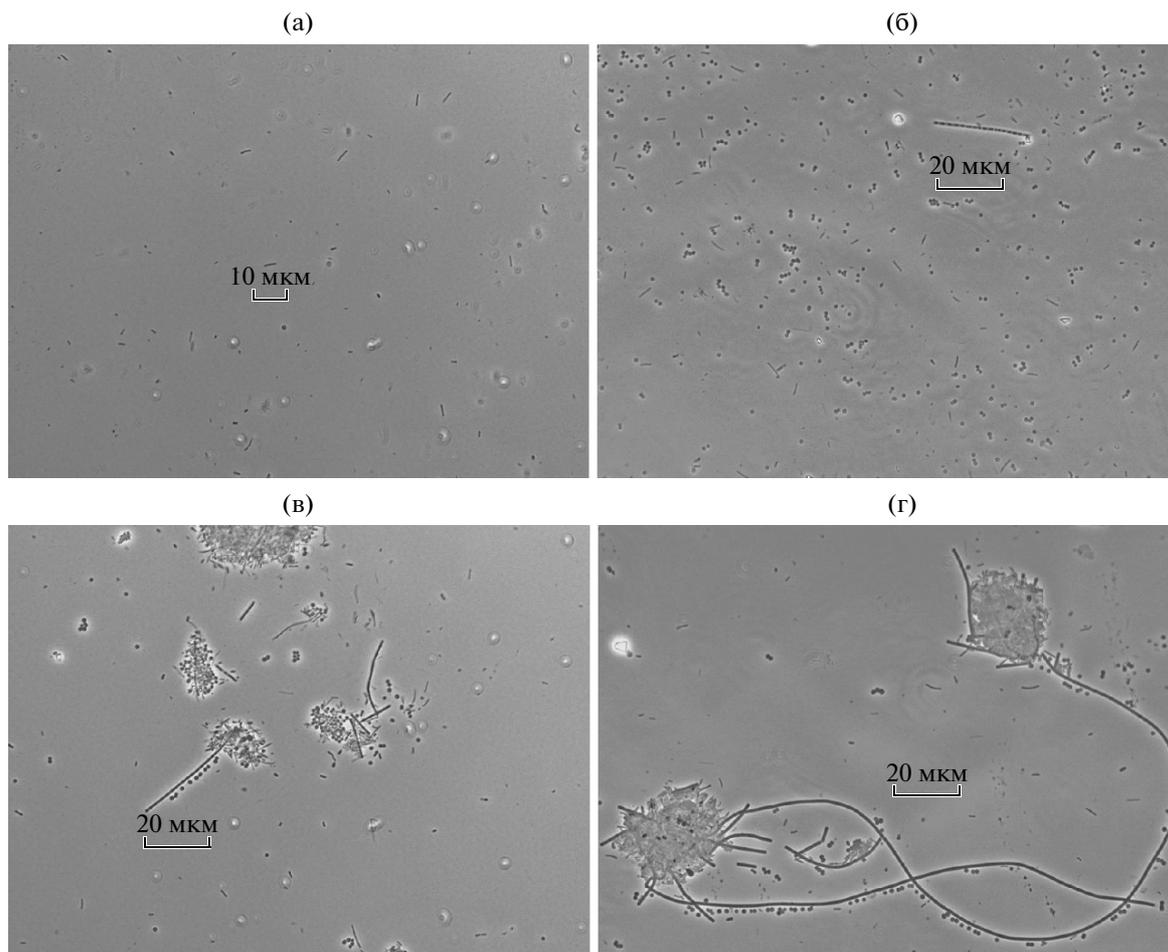


Рис. 2. Изменение микроскопической картины сообщества ЕР в течение цикла потребления 2-АБК (световая микроскопия с фазово-контрастным устройством, $\times 1200$): а – нулевая точка, б – 2, в, г – 6–8 сут цикла.

бильного метаногенного сообщества зафиксировано уменьшение числа морфотипов клеток от 14 (исходный неадаптированный ил) до 5. Снижение количества сателлитных микроорганизмов, приводящее к уменьшению числа микробных морфотипов под воздействием аминокислотных веществ, было описано и другими авторами [3]. В течение цикла потребления 2-АБК наблюдали сукцессию сообщества ЕР (рис. 2). Вначале в культуре присутствовали короткие и средней длины палочки, а также небольшое количество кокков (рис. 2а). Начало метаногенеза всегда было связано с появлением в сообществе длинных палочек или нитей, окруженных кокками (рис. 2в, 2г). Клетки в составе агрегатов в активной накопительной культуре часто были ослизнены (рис. 2г).

Как известно, симбиотическая кооперация (синтрофия) между метаболически разными микроорганизмами, зависящими друг от друга при разрушении субстратов, в анаэробных местообитаниях является одним из важных условий, т.к. зачастую

отдельные члены ассоциации из-за энергетических барьеров не могут использовать химически стабильные вещества [5, 15]. Кооперация микроорганизмов-партнеров при синтрофных взаимодействиях оптимальна, если расстояния, на которых происходит поступление субстрата путем молекулярной диффузии, предельно малы. Это достигается в случае тесного физического контакта партнеров, т.е. пространственного объединения трофически связанных типов микроорганизмов [5, 15]. Вероятно, кокки (рис. 2в, 2г) образуют синтрофную ассоциацию с длинными палочками (сходными с метаногеном *Methanosaeta*), обладают броидильным типом метаболизма и превращают пируват (либо бензоат) в ацетат, который используется организмом подобным *Methanosaeta*. Микроскопическая картина сообщества с дополнительным источником углерода (пируват) близка таковой, где присутствует только ароматический субстрат, однако наблюдается увеличение общего количества клеток

и увеличение количества кокков средних размеров (рис. 2б).

Синтрофные взаимодействия в анаэробных сообществах зачастую усложняют выделение чистых культур из метаногенных микробных сообществ и затрудняют их культивирование из-за таких особенностей, как, например, низкое парциальное давление водорода, которое поддерживается метаногенными археями [16], или наличие особых ростовых факторов.

Итак, выделенные нами анаэробные микробные сообщества проявляли активность в отношении ряда ароматических ксенобиотиков. Изучение разложения поллютантов накопительными культурами из очистных сооружений демонстрирует высокий метаболический потенциал как самих культур, так и исходных илов, из которых они были получены. Исследование деградации аминокислот анаэробными микробными сообществами из донных отложений способствует осмыслению механизмов самоочищения естественных мест обитания. Понимание процессов анаэробной биодеструкции (амино)ароматических веществ позволяет прогнозировать судьбу таких ксенобиотиков в природе и очистных сооружениях и служит фундаментальной основой создания специальных биотехнологий для борьбы с подобными загрязнениями.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Федерации европейских микробиологических обществ (FEMS) № FRF 2009-2, RU-IMRS.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carmona M., Zamarró M.T., Blázquez B., Durante-Rodríguez, Juárez J.F., Valderrama J.A., Barragan M.J.L., Garcia J.L., Diaz E. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2009. V. 73. № 1. P. 71–133.
2. Емашова Н.А., Котова И.Б., Нетрусов А.И., Калюжный С.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 2. С. 195–201.
3. Savelieva O., Kotova I., Roelofs W., Stams A.J.M., Netrusov A. // Arch. Microbiol. 2004. V. 181. № 2. P. 163–170.
4. Schnell S., Schink B. // Arch. Microbiol. 1992. V. 158. № 4. P. 328–334.
5. Schink B. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997. V. 61. № 2. P. 262–280.
6. Harwood C.S., Burchhardt G., Herrmann H., Fuchs G. // FEMS Microbiol. Rev. 1999. V. 22. № 5. P. 439–458.
7. Fuchs G. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2008. V. 1125. № 1. P. 82–99.
8. Котова И.Б., Савельева О.В., Дьяконова А.Т., Скляр В.И., Калюжный С.В., Стамс А., Нетрусов А.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 4. С. 422–428.
9. Савельева О.В., Емашова Н.А., Котова И.Б., Нетрусов А.И., Калюжный С.В. // Усп. современ. биологии. 2003. Т. 123. № 4. С. 336–349.
10. Kalyuzhnyi S.V., Scljar V.I., Mosolova T.P., Kucherenko I.A., Russkova I.A., Degtyarova N.N. // Water Sci. Technol. 2000. V. 42. № 5–6. P. 363–370.
11. Razo-Flores E., Luijten M., Donlon B.A., Lettinga G., Field J. // Water Sci. Technol. 1997. V. 36. № 6–7. P. 65–72.
12. Donlon B.A., Razo-Flores E., Field J.A., Lettinga G. // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. № 11. P. 3889–3893.
13. Heider J., Fuchs G. // Anaerobe. 1997. V. 3. № 1. P. 1–22.
14. Калюжный С.В., Данилович Д.А., Ножевникова А.Н. // Итоги науки и техники. Серия “Биотехнология”. Т. 29. М.: ВИНТИ, 1991. С. 156.
15. Stams A.J.M., Plugge C.M. // Nature Rev. Microbiol. 2009. V. 7. № 8. P. 568–577.
16. Schink B., Stams A.J.M. The Prokaryotes. 3 ed. / Eds. M. Dworkin, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt. N.Y.: Springer Verlag, 2002. P. 25.

Methanogenic Destruction of (Amino)Aromatic Compounds by Anaerobic Microbial Communities

Yu. V. Linkova^a, A. T. Dyakonova^a, M. A. Gladchenko^b, S. V. Kalyuzhnyi^b,
I. B. Kotova^a, A. Stams^c, and A. I. Netrusov^a

^a School of Biology, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia
e-mail: linkovay@gmail.com, kira1959@gmail.com

^b School of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

^c Wageningen University, 6703 HB Wageningen, Netherlands

Received December 8, 2010

Abstract—Destruction of a number of aromatic substrates by anaerobic microbial communities was studied. Active methanogenic microbial communities decomposing aminoaromatic acids and azo dyes into CH₄ and CO₂ were isolated. Products of primary conversion were found to be 2-hydroxybenzyl and benzyl alcohols gradually transforming into benzoate. It was shown that isolated microbial communities are capable of converting the initial substrates—benzyl alcohol, benzoate, salicylic acid, and golden yellow azo dye—into biogas without a lag-phase but with different velocities. Aromatic and linear intermediates of biodestruction of aromatic amines by obtained enrichment cultures were determined for the first time. Selective effect of aromatic substrates on a microbial community that was expressed in decrease in diversity and gradual change of dominant morphotypes was revealed.