

УДК 579.841.111.083.12

ВЫДЕЛЕНИЕ ШТАММА *PSEUDOMONAS SP. ASA2* ИЗ МЕТАНОГЕННОГО СООБЩЕСТВА, РАСЩЕПЛЯЮЩЕГО АМИНОБЕНЗОАТ И АМИНОСАЛИЦИЛАТ

© 2002 г. О. В. Савельева, И. Б. Котова, В. И. Скляр, С. В. Калужный, А. И. Нетрусов

Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Поступила в редакцию 30.08.01 г.

Аминоароматические соединения являются продуктами анаэробного разложения азокрасителей, а также микробного или абиотического восстановления гомоциклической нитроароматики. В последние десятилетия эти ксенобиотики оказывают все большее негативное влияние на окружающую среду, связанную с их мутагенным и канцерогенным действием. Такие вещества накапливаются на дне водоемов и в почвах в местах расположения предприятий лакокрасочной, текстильной и фармацевтической промышленности и кардинально изменяют трофические связи и видовой состав данной среды обитания. Основным способом удаления подобных антропогенных загрязнений является деятельность микробных сообществ. Поскольку в окислительных условиях некоторые аминоароматические соединения полимеризуются в трудно разлагаемые макромолекулы, а аэробная деградация часто приводит к образованию ряда токсичных промежуточных продуктов, деградация этих соединений более эффективна в анаэробных условиях. В настоящее время массовое применение процессов анаэробной биodeградации ограничено недостаточным пониманием поведения микробных популяций как в естественных средах обитания, так и в искусственных очистных сооружениях. В связи с этим представляется интересным изучение анаэробных микробных сообществ, разлагающих аминоароматические субстраты, и выделение бактерий, осуществляющих первые этапы этой деградации. Было показано разложение изомеров аминобензойной (АБК) и аминосалициловой (АСК) кислот в метаногенных илах и накопительных культурах [1–3]. Были выделены бактерии, разлагающие АБК в анаэробных условиях [2, 4–6], тогда как анаэробное разложение АСК до сих пор мало изучено [7].

Из анаэробного мезофильного ила были получены накопительные культуры, способные расщеплять изомеры АБК и АСК до метана. Культивирование проводили в анаэробных флаконах, продувках N_2 , на минеральной среде определенного состава [8], в среду вносили от 3 до 8 мМ АБК или АСК и 50 мг/л дрожжевого экстракта. Кис-

лотность среды устанавливали на уровне pH 7.3; восстановителем служил сульфид натрия (0.8 мМ), культивирование проводили при 30°C. Накопительные культуры росли в отсутствие экзогенных акцепторов электронов в среде. Потребление аминоароматического субстрата оценивали по УФ-спектру культуральной жидкости или результатам высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Количество аммонийного азота определяли с реактивом Неслера [9].

Одна из полученных накопительных культур разлагала до метана как 5-АСК, так и 2-АБК. Ацетат и CO_2 были определены газовой хроматографией как промежуточные продукты; происходило увеличение количества NH_4^+ в среде культивирования, что, возможно, свидетельствует о дезаминировании аминоароматических субстратов. Было интересно выяснить, один или разные виды бактерий осуществляют трансформацию АБК и АСК в этом сообществе.

Выделение первичного деструктора аминоароматики из сообщества, который разлагал 5-АСК и 2-АБК, проводили на анаэробной агаризованной среде (1.9% агара), содержащей 2 мМ 2-АБК без дрожжевого экстракта. 5-АСК легко полимеризуется как при нагревании, так и в присутствии следовых количеств кислорода, поэтому ее не использовали как субстрат для выделения. Активную накопительную культуру, которая прошла несколько циклов деградации субстрата, методом предельных разведений высевали в анаэробные флаконы с агаризованной средой. Одиночные колонии отбирали, переносили в жидкую анаэробную среду, и, если наблюдали потребление 2-АБК, вновь рассевали на анаэробный агар. Чистоту культуры проверяли микроскопированием и высевом на мясopептонный агар (МПА) в присутствии и отсутствии кислорода. После неоднократных пересевов были получены колонии одного типа.

Выделенный штамм ASA2, является факультативным анаэробом, так как может расти на МПА в аэробных и анаэробных условиях, растет на аэробном агаре с 2-АБК в качестве единствен-

Рост *Pseudomonas* sp. ASA2 в анаэробных условиях на средах с аминокромоароматическими субстратами*

Аминокромоароматические субстраты	Акцепторы электронов	
	Нитрат	Сульфат, сульфит, тиосульфат
2-АБК	+	-
3-АБК	+	-
4-АБК	+	-
4-АСК	+	-
5-АСК	+	-

Примечание. "+" – наблюдали потребление аминокромоароматического субстрата; "-" – не наблюдали потребления аминокромоароматического субстрата.

* Концентрация дрожжевого экстракта в среде культивирования – 0.5 г/л.

ного источника углерода и энергии. Культура представляет собой короткие тонкие подвижные грамтрицательные палочки. Только при аэробном росте на МПА колонии выделяют нефлуоресцирующий сине-зеленый пигмент. По формальным микробиологическим признакам штамм ASA2 был отнесен к роду *Pseudomonas*.

Использование штаммом *Pseudomonas* sp. ASA2 аминокромоароматических субстратов было изучено в жидких анаэробных средах с различными акцепторами электронов (таблица). Нитрат вносили в концентрациях 10 и 20 мМ, сульфат, сульфит, тиосульфат – до 10 мМ. Исчезновение аминокромоароматики стимулировалось наличием в среде дрожжевого экстракта. Трансформация изомеров АБК и АСК происходила с образованием неизвестного продукта, возможно, ароматической природы (согласно данным ВЭЖХ), выделения H_2 обнаружено не было. Образование CO_2 происходило, очевидно, в результате разложения дрожжевого экстракта, а не трансформации бензольного кольца изученных изомеров аминокромоароматической и аминокромоароматической кислот. Можно предположить, что дрожжевой экстракт является источником углерода при анаэробном росте *Pseudomonas* sp. ASA2 на среде с аминокромоароматическим субстратом.

В этой работе впервые показано разложение АБК и АСК до метана одним и тем же сообществом микроорганизмов. Первичную трансформацию

аминокромоароматических соединений в этом сообществе осуществляет, возможно, одна бактерия – *Pseudomonas* sp. ASA2. Поскольку этот штамм не образует субстратов метаногенеза, то трофическая микробная цепь разложения аминокромоароматики должна содержать по меньшей мере еще один микроорганизм, преобразующий первичный продукт трансформации в ацетат, CO_2 , и, возможно, водород. В настоящее время проводится работа по изучению промежуточных компонентов цепи биодegradации аминокромоароматических соединений.

Работа поддержана грантами ИНТАС № 96-1809 и РФФИ № 01-04-49601-а. Работа О.В. Савельевой была поддержана грантом ИНТАС № 99-4039 для молодых ученых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tszech A., Schink B.* Methanogenic degradation of anthranilate (2-aminobenzoate) // *Syst. Appl. Microbiol.* 1988. V. 11. P. 9–12.
2. *Schnell S., Schink B.* Anaerobic degradation of 3-aminobenzoate by a newly isolated sulfate reducer and a methanogenic enrichment culture // *Arch. Microbiol.* 1992. V. 158. P. 328–334.
3. *Kalyuzhnyi S., Sklyar V., Mosolova T., Kucherenko I., Russkova J., Degtyarova N.* Methanogenic biodegradation of aromatic amines // *Water Sci. Technol.* 2000. V. 42. P. 363–370.
4. *Schnell S., Bak F., Pfennig N.* Anaerobic degradation of aniline and dihydroxybenzenes by newly isolated sulfate-reducing bacteria and description of *Desulfobacterium anilini* // *Arch. Microbiol.* 1989. V. 152. P. 556–563.
5. *Tszech A., Fuchs G.* Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads // *Arch. Microbiol.* 1987. V. 148. P. 213–217.
6. *Braun K., Gibson D.T.* Anaerobic degradation of 2-aminobenzoate (anthranilic acid) by denitrifying bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* 1984. V. 48. P. 102–107.
7. *Сиволодский Е.П., Ровнов Н.В., Петров Л.Н.* Механизм специфической хромогенной реакции *Klebsiella* spp. на питательной среде с 5-аминосалициловой кислотой // *Микробиология.* 1994. Т. 63. С. 489–494.
8. *Kalyuzhnyi S., Sklyar V.* Biomineralization of azo dyes and their breakdown products in anaerobic-aerobic hybrid and UASB reactors // *Water Sci. Technol.* 2000. V. 41. P. 23–30.
9. *Кочетов Г.А.* Практическое руководство по энзимологии. М.: Высш. шк., 1980. С. 208–209.