

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.04 Биотехнологии в решении экологических проблем

Направление подготовки: 05.04.06 Экология и природопользование

Профиль образовательной программы: Экологический мониторинг и безопасность
окружающей среды

Форма обучения: заочная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций	3
1.1 Лекция № 1 Биологическая очистка и дезодорация газовоздушных выбросов. Биодеструкция растительных полимеров и материалов. Разложение целлюлозы. Биodeградация лигнина.....	3
1.2 Лекция № 2 Биodeградация синтетических полимерных материалов и использование биodeградируемых пластиков. Биологическое разложение нефти и нефтепродуктов в природных средах.....	9
2. Методические указания по проведению лабораторных работ.....	30
1.1 Лабораторная работа №1. Изучение бактериальной микрофлоры активного ила. Сопутствующие организмы: водоросли, грибы, простейшие, коловратки, черви, низшие ракообразные	30
1.2 Лабораторная работа № 2 Превращения микроорганизмами соединений углерода, азота и других элементов.....	30
1.3 Лабораторная работа № 3 Биоконверсия отходов сельского хозяйства	31
1.4 Лабораторная работа № 4 Приемы активизации процессов биоконверсии отходов..	31
3. Методические материалы по проведению практических занятий (не предусмотрено РУП).....	32
4. Методические материалы по проведению семинарских занятий (не предусмотрено РУП).....	32

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1. 1 Лекция № 1 (2 часа).

Биологическая очистка и дезодорация газовоздушных выбросов. Биодеструкция растительных полимеров и материалов. Разложение целлюлозы. Биodeградация лигнина.

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Классификация методов дезодорации отходящих газов с помощью микроорганизмов
2. Принципы работы биофильтров
3. Дезорирующая биофилтрация
4. Механизм микробиологической утилизации углеродсодержащих растительных полимеров.

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

Большая доля химических и биологических загрязнений поступает в атмосферу с отходящим воздухом и газовоздушными выбросами промышленных предприятий, с животноводческих ферм, птицефабрик, мусороперерабатывающих заводов, полигонов. Неприятно пахнущие вещества переносятся из воздуха в воду (процесс абсорбции). Вместе с ними из отходящего воздуха в воду переходит также и O_2 . Загрязнения окисляются микрофлорой в жидкой фазе, при этом вода освобождается от одорирующих веществ (процесс регенерации).

Для удаления NH_3 , H_2S , SO_2 , осуществляемого автотрофными микроорганизмами (нитрификаторами, сероокисляющими и тиобактериями), требуется поступление в систему углекислого газа, который используется микроорганизмами в качестве источника углерода. Углекислый газ может быть подведен с очищаемым газом (объемная доля CO_2 в подаваемом газе не менее 1%), с орошающей водой (в виде растворенной углекислоты или карбонатов с содержанием карбонатов >10 мг/л в жидкой фазе), с носителем, например при использовании мрамора, доломита, или образовываться при разложении гетеротрофами органических веществ, присутствующих в газовой среде.

Для поддержания активности гетеротрофов, участвующих в окислении органических загрязнений, можно использовать органические носители, на которых иммобилизованы микроорганизмы в системах биоочистки, или вводить дополнительные источники углерода. При этом содержание аммонийного азота в жидкой фазе зоны биоочистки должно быть не ниже 1 мг/л, фосфатов – не ниже 0,01 мг/л. Эти источники минерального питания подаются с орошающей водой либо могут содержаться в используемых природных или синтетических носителях. При необходимости в орошающую воду вводят кислоты и щелочи для поддержания в зоне биоочистки необходимого pH.

Методы микробиологической дезодорации газов подразделяются на методы с использованием твердой фазы – **биофильтры** и жидкой фазы – **биосорберы**.

2. Наиболее простой вариант микробиологической очистки отходящего воздуха реализуется, если процессы абсорбции и регенерации связаны друг с другом по времени и месту. По этому принципу работают биофильтры.

В биофильтре загрязненные газы продуваются через слой биоактивной, сорбирующей, умеренно увлажненной насадки (носитель микроорганизмов). Материал насадки должен обеспечивать низкую потерю давления при высокой удельной поверхности кон-

такта газ-жидкость-биопленка удерживать большое число клеток живых микроорганизмов, быть устойчивым к механическим, химическим и биологическим воздействиям, не забиваться избытком биомассы в течение эксплуатационного срока работы, быть доступным и недорогим. В качестве материалов-носителей используются органические субстанции: торф, дерн, хворост, кора деревьев, древесная щепа, компост, активированный уголь. Преимущество таких носителей в том, что они содержат много необходимых для питания микроорганизмов веществ. Эти носители более пригодны для удаления органических загрязнений с помощью гетеротрофных микроорганизмов. Природный носитель служит им источником органического углерода и необходимых для роста веществ. В качестве носителя также могут быть использованы неорганические материалы: керамика, цеолит, гравий, крупнозернистый песок и другие, а также пластмассы. Они подходят для окисления загрязнений автотрофной микрофлорой: нитрификаторами, серо- и тиобактериями. Высота слоя носителя, форма и размер частиц должны быть такими, чтобы не допускать отложений частиц пыли и лишь небольшую потерю давления. В наиболее распространенных конструкциях биофильтров высота фильтрующего слоя не превышает 1–1,5 м. Избыток воды в биофильтре нежелателен. Материал-носитель должен быть только увлажненным.

Биофильтры применяются в основном при невысоких концентрациях загрязняющих веществ в газовом потоке со станций очистки сточных вод, в газовоздушных выбросах пищевой, химической, фармацевтической промышленности, животноводческих комплексов и т. д. Такие установки получили наибольшее распространение в странах Западной Европы, США и Японии.

3. Наиболее простой вариант дезодорирующей биофильтрации – продувка газов через почвенный слой (рисунок), при которой загрязненный газ направляют в распределительные каналы под фильтрующим слоем почвы и дренажного материала (зола, шлак). Газ, проходящий через почвенный слой, очищается почвенной микрофлорой. При использовании почвенного метода дезодорации при допустимых нагрузках на фильтрующую поверхность 30–60 м³/(м²·ч) при расходе газа 1000 м³/мин требуется 1000–2000 м² земельных площадей. Применение почвенного метода ограничивает необходимость отчуждения больших количеств земельных площадей, зависимость от погодных условий и сезонов года (дожди, засуха, заморозки). Другой пример – биофильтр с насыпным слоем компоста. Газ проходит через распределительный короб и пористые керамические трубы под слоем компоста. Избыток воды, поступающей в компостную кучу с очищаемым газом или с атмосферными осадками, отводится через дренажную трубу. Увлажнение компоста обеспечивается распылением воды над верхней поверхностью фильтрующего слоя. Метод с насыпным слоем компоста применяется на заводах по переработке отходов в компост, на животноводческих фермах, в кормозаготовительных цехах и других сельскохозяйственных предприятиях. При его использовании необходимо обеспечивать равномерное и оптимальное увлажнение всей массы компоста. При недостаточном увлажнении материал фильтрующего слоя пересыхает, в результате чего нарушается равномерное прохождение газа через фильтрующий слой и падает активность микроорганизмов. Избыточное увлажнение приводит к образованию анаэробных зон с высоким сопротивлением набегающему потоку (т. е. линейной скорости) газа. В результате снижается эффективность очистки. В анаэробных зонах образуются летучие продукты метаболизма, которые придают выходящему из биофильтра воздуху неприятный запах. Со временем фильтрующие свойства компоста ухудшаются из-за неравномерности протекания микробиологических процессов

и нарастания избытка биомассы в компостной массе. Поэтому через определенные промежутки времени компост заменяют или обновляют, чтобы обеспечить необходимую эффективность очистки при заданной производительности биофильтра. Продолжительность эксплуатации биофильтра без замены материала фильтрующего слоя может составлять несколько лет. В табл. 2.2 приведены некоторые параметры работы биофильтров с насыпным слоем компоста. В биофильтрах закрытого типа очистка более интенсивная и не зависит от погодных условий. Такие биофильтры могут работать в режиме «сухого» реактора и «мокрого» реактора с орошением водой. Может использоваться комбинация различных биофильтров. Пример такой комбинации – двухступенчатая биофильтрационная установка «Энсо-Биокс», включающая мокрый и сухой биореакторы. В мокром реакторе очищается загрязненный конденсат с помощью отдувки газом. Отдуваемый газ очищается в сухом биореакторе.

Большое распространение получили малогабаритные закрытые биофильтры, не требующие ухода и обслуживания, с высокой пропускной способностью по отходящим газам. Такие малогабаритные установки можно монтировать на крыше предприятия (например, на скотном дворе) и собирать из отдельных блоков.

С помощью биологической дезодорации можно удалять неприятные запахи легче, эффективнее и с меньшими затратами, чем традиционными физическими и химическими методами дезодорации. Биологические методы отличаются простотой и надежностью. Капитальные затраты на их сооружение составляют 12–30 долл. за 1 м³/ч реакторного пространства. Эксплуатационные затраты на очистку при использовании метода биодезодорации составляют 0,2–1,0 долл. за 1000 м³ газа, что ниже в 1,5 раза по сравнению с другими методами. При биодезодорации не требуются повышенные температуры и давления, не образуются оксиды серы и азота, свободный хлор, отсутствует опасность образования диоксинов, в отличие, в частности, от термических и каталитических методов очистки. Единственными побочными продуктами являются избыточная биомасса и отработанный носитель, срок службы которого существенно выше, чем при адсорбционной очистке, благодаря протеканию биологических процессов, регенерирующих носитель. Однако биофильтры не удаляют биостойкие загрязнения, могут быть чувствительны к пиковым выбросам загрязнений и резким изменениям в их составе. В них не должны применяться материалы и режимы очистки, способные вызвать образование вторичных запахов.

4. Биодеструкция проводится с целью минерализации, уменьшения массы или избирательного разложения определенных компонентов отходов. Большую долю в составе твердых отходов составляют полимеры природного происхождения, многие из которых весьма стойки к биологическому воздействию. Биодеструкция природного полимера лигнина и лигнинсодержащих материалов – важная проблема для целлюлозно-бумажной и деревообрабатывающей промышленности. Минерализация целлюлозосодержащих материалов имеет значение при решении задач компактизации отходов, например радиоактивных, при биологической очистке сточных вод. Гидролиз целлюлозосодержащих материалов важен для создания сырьевой базы для получения биотоплива.

В разложении, минерализации природных растительных полимеров участвуют аэробные и анаэробные микроорганизмы-гидролитики, которые синтезируют ферменты, расщепляющие биополимеры до простых сахаров или жирных кислот. Продукты гидролиза могут поступать в клетки гидролитиков и сопутствующих микроорганизмов и метабо-

лизироваться до CO_2 и H_2O . Микроорганизмы- деструкторы природных высокомолекулярных соединений способны разлагать не только природные полимеры и связанные с ними загрязнения, например в составе твердых отходов, но и синтетические полимерные материалы, попадающие в окружающую среду в большом количестве. Разложение растительных остатков, древесины в природе происходит в ходе сукцессии с колонизацией лигноцеллюлозных остатков сапрофитными грибами, которые метаболизируют легкоусваиваемые соединения (сахара и др.), последующим преимущественным развитием грибов, разлагающих целлюлозу; развитием и доминированием деструкторов лигнина на заключительном этапе. Наиболее активные деструкторы древесины – грибы белой и бурой гнили.

Разложение целлюлозы – наиболее распространенного растительного полимера – происходит в результате симбиотического взаимодействия различных микроорганизмов и их сложных целлюлолитических систем. В аэробных условиях значительная роль принадлежит грибам, из них наиболее активные биодеструкторы – грибы родов *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Fusarium* и др. Из бактерий в разложении целлюлозы активно участвуют микобактерии и таксономически близкие к ним группы. Целлюлолитические ферменты представляют собой сложный внеклеточный ферментативный комплекс, в который входят следующие ферменты: эндоглюканаза (1,4-D-глюкан-4-глюканогидролаза), способная неупорядоченно гидролизовать в целлюлозе и-глюканах -1,4-связи; в реакционной среде помимо целлоолигосахаридов возможно образование глюкозы и целлотриоз; целлобиогидролаза (1,4- -D-глюканцеллобиогидролаза), отщепляющая целлобиозу с нередуцирующих концов целлоолигосахаридов; глюкозидаза(-D-глюкозэндоглюкогидролаза, целлобиаза), отщепляющая концевые нередуцирующие остатки-D-глюкозы с освобождением глюкозы. Фермент может гидролизовать D-глюкозиды и целлобиозу; экзо-1,4-глюкозидаза(1,4--D-глюканглюкогидролаза), гидролизующая 1,4-связи в 1,4--D-глюканах, последовательно отщепляя глюкозные остатки. Образующиеся целлобиоза и глюкоза подавляют синтез целлюлолитических ферментов. Природными ингибиторами целлюлаз являются фенольные соединения и танины. Механизм гидролиза или способ действия ферментов на целлюлозу и целлюлозные комплексы принципиально одинаков, независимо от их происхождения. Гидролизу целлюлозы предшествует адсорбция целлюлолитических ферментов на лигноцеллюлозном субстрате. Адсорбируемость ферментов зависит как от субстрата, так и от вида микроорганизмов. Этим обусловлены основные различия в скорости гидролиза целлюлозы целлюлолитическими комплексами. Наиболее адсорбируемые ферменты грибов *Trichoderma viride* и *Trichoderma reesei*, которые в качестве промышленных препаратов используют для гидролиза целлюлозосодержащего сырья. На скорость ферментативного гидролиза лигноцеллюлозы влияют удельная поверхность и степень аморфности целлюлозы. Чем выше степень аморфности целлюлозы (ниже степень кристалличности), тем больше скорость действия ферментов. Скорость ферментативного гидролиза пропорциональна удельной поверхности аморфной части. Степень полимеризации и средний размер частиц исходной кристаллической целлюлозы не влияют на эффективность ее ферментативного гидролиза. Степень аморфности целлюлозы можно повысить предварительной обработкой сырья механическими, физико-химическими и химическими методами. Деструкция целлюлозы возможна и в результате окислительных биокаталитических реакций, протекающих с участием пероксида водорода. Эти реакции имеют большое значение при разрушении лигнина грибами белой гни-

ли *Phanerochaete chrysosporium* и др. Аналогичные окислительные реакции выявлены и у других микроорганизмов, разлагающих целлюлозу: *Polyporus adustus*, *Trichoderma viride*, *Myrothecium verrucaria*. В анаэробных условиях ферментативный гидролиз целлюлозы чаще всего осуществляется мезофильными и термофильными клостридиями. Продукты гидролиза сбраживаются до масляной кислоты, этанола, уксусной кислоты, водорода, CO₂ и других низкомолекулярных соединений, которые метанообразующими бактериями трансформируются до метана. Смешанные культуры микроорганизмов разлагают целлюлозу быстрее, чем монокультуры, что обусловлено ассимиляцией накапливаемых продуктов разложения и устранением их ингибирующего действия, а также образованием факторов роста или синергизмом ферментных систем симбионтов, например гемицеллюлаз целлюлолитического организма и систем сбраживания пентоз микроорганизма-симбионта. Биодegradация другого растительного полимера – лигнина происходит в результате окислительного процесса, осуществляемого в первую очередь грибами бурой, мягкой и белой гнили. Если распадаются преимущественно целлюлоза и гемицеллюлозы, а лигнин клеточной стенки растений не разложен или разложен незначительно, древесина приобретает буроватую окраску. Красные, бурые деструктивные гнили, вызываемые, березовой губкой *Piptoporus betulinus* и другими грибами, сопровождаются распадом древесины как бы на кубики. Эти грибы относят к возбудителям бурой гнили. Грибы бурой гнили (*Coniophora puteana*, *Trichoderma viridei* др.) обладают мощным комплексом гидролитических ферментов, расщепляющим полисахариды древесины и лишь незначительно затрагивающим лигнин. Эти грибы до начала деполимеризации целлюлозы окисляют легкоусваиваемые сахара с образованием пероксида водорода, который участвует в расщеплении кристаллической целлюлозы. Лигнин подвергается только деметилированию. Ферментные системы разрыва ароматических колец и усвоения образующихся продуктов окисления у грибов бурой гнили отсутствуют. Грибы мягкой гнили (аскомицеты и дейтеромицеты *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* и др.) используют в основном углеводы древесины и участвуют в реакциях деметоксилирования и дегидроксилирования лигнина. Грибы белой гнили сначала разрушают лигнин, образуя преимущественно белые (коррозионные) гнили. Большинство этих грибов – высшие базидиомицеты, например плоский трутовик (*Ganoderma applanatum*), отдельные виды *Fomes* (настоящие трутовики), опята (*Armillariella*), разноцветная кожистая губка (*Trametes versicolor*), *Phanerochaete chrysosporium* (*Sporotrichum pulverulentum*), вешенка устричная (*Pleurotus ostreatus*), *Polyporus versicolor*, *Poria subacida*, *Panus conchatus* и др. Грибы белой гнили – единственная группа микроорганизмов, разлагающих все компоненты растительной массы, что обусловлено синтезом ими большого набора гидролитических и окислительных ферментов, а также высокой проникающей способностью мицелия в субстрат. Вначале грибы белой гнили разрушают лигноуглеводный комплекс, а затем разлагают лигнин и целлюлозу. Грибы белой гнили деполимеризуют полисахариды до простых сахаров, в результате утилизации которых получают дополнительную энергию для расщепления более стойкого лигнина. При окислении ими сахаров может также образовываться H₂O₂, участвующий в деструкции растительных полимеров. Из биодеструкторов лигнина помимо грибов белой гнили выделяют грибы, разлагающие лесную подстилку, в частности грибы базидиомицеты *Agaricus bisporus* (шампиньон), *Coprinus comatus* (копринус), *Stropharia* (строфария) и др. Частично разлагают лигнин и прокариоты: актиномицеты р. *Streptomyces*, бактерии родов *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Nocardia*,

Pseudomonas. Эти микроорганизмы играют важную роль в деградации лигнина в нейтральных и щелочных почвах, в которых лигнинолитические грибы не могут конкурировать с ними. Актиномицеты участвуют в деметилировании ароматических колец молекулы лигнина, окислении боковых цепей и расщеплении эфирных связей. Они переводят лигнин в растворимое состояние, но полностью его не минерализуют. Бактерии минерализуют лигнин в процессах соокисления, кометаболизма, в частности в присутствии глюкозы. Анаэробные микроорганизмы не разрушают лигнин, но анаэробные бактерии рода *Clostridium* способны трансформировать алифатическую часть лигнина.

Для разрыва полимерных цепей и деструкции ароматических остатков чистого лигнина, выделенного из древесины, требуются высокие энергетические затраты, поэтому большинство грибов осуществляют его деструкцию только при наличии дополнительного источника углерода и энергии: целлюлозы, гемицеллюлозы, сахаров или низкомолекулярных промежуточных продуктов их метаболизма. Лигнин разрушается одновременно с утилизацией полисахаридов, ингибирует ферментативное расщепление целлюлозы.

В почве природный лигнин разлагается лигнолитическими микроорганизмами за несколько лет, частично минерализуясь, частично участвуя в образовании почвенных гуминовых и фульвокислот. В оптимальных условиях некоторые смешанные культуры микроорганизмов расщепляют лигнин на 40–55% через 15–20 сут. В аэротенке при очистке сточных вод, образующихся в производстве древесно-волоконистых плит, лигнин распадается в течение 3–5 сут. Грибы, разлагающие лигнин, могут деполимеризовать и гуминовые вещества. Вместе с тем промышленный лигнин, например лигносульфонат, труднее поддается биodeградации. Свойство микроорганизмов деструктировать лигноуглеводную матрицу, разлагать фенолы и лигнин до CO₂ можно использовать в целлюлозно-бумажном производстве с целью замены энергоемких механического и химического процессов делигнификации на биологический для получения высококачественных сортов бумаги, а также при производстве легко перевариваемых кормов для жвачных животных. Немаловажно и то, что грибы могут участвовать в разложении многих ксенобиотиков. Эту способность можно использовать при переработке и обезвреживании загрязненных растительных отходов. Ускоренное разложение пожнивных растительных остатков при внесении биодеструкторов может использоваться при предпосевной подготовке пашни.

Наибольший практический интерес представляют грибы белой гнили, избирательно (до 98%) делигнифицирующие древесину. Однако микробиологическая делигнификация – весьма длительный и недостаточно изученный процесс. Лигнин и полисахариды препятствуют проникновению лигнолитических и целлюлолитических ферментов в растительный субстрат и его модификации.

Биодоступность растительных полимеров и материалов зависит от их физико-химических и структурных свойств, поэтому, воздействуя на субстрат механическими, физическими и химическими методами, можно увеличить скорость биоконверсии и биодеструкции. Из механических методов применяют измельчение, из физических – нагревание при повышенном давлении, воздействие ионизирующими излучениями, из химических – разбавленные минеральные кислоты и щелочи при повышенных давлении и температуре, предобработку окислителями: озоном, пероксидом водорода. Используют и предобработку сырья ферментными препаратами, полученными на основе целлюлолитических грибов. В России для этой цели предложены препарат «Целловиридин» различной степени очистки, мультиэнзимные композиции из нескольких ферментных препаратов, обеспечиваю-

щие требуемое расщепление природных полимеров. Комплексный процесс, сочетающий последовательно химическую или иную обработку субстрата и биотехнологическую стадию, может быть эффективным для модификации и биодеструкции лигноцеллюлозных материалов. Для проведения биодеструкции и биоделигнификации растительных материалов можно использовать методы твердофазной и жидкофазной ферментации в периодических и проточных условиях. Важно обеспечить доступ кислорода в ферментируемую среду, оптимальную концентрацию азота, наличие дополнительных субстратов, способствующих индукции целлюлолитических и лигнолитических ферментов, необходимое состояние и оптимальные условия подготовки посевного материала. Высокие концентрации минерального азота могут подавлять лигнолитическую активность, в частности гриба *Phanerochaete chrysosporium*. Известны также грибы, лигнолитическая активность которых не ингибируется, а повышается при высоких концентрациях азота в среде. Перемешивание субстрата улучшает аэрацию, но в то же время может тормозить деструкцию из-за разрушения мицелия грибов. Совместное культивирование различных микроорганизмов часто обеспечивает более активную делигнификацию лигноцеллюлозных субстратов. Смешанные культуры могут представлять собой природные ассоциации, проявляющие одновременно целлюлолитическую и азотфиксирующую активность (пример: ассоциации азотфиксирующей бактерии *Clostridium butyricum* с грибами *Trichoderma harzianum* или *Penicillium corylophilum*, осуществляющие деструкцию соломы). Для совершенствования биологического процесса делигнификации и получения бумаги и очищенного целлюлозосодержащего сырья микробиологическим методом большое значение имеет поиск мутантов или создание генетически модифицированных микроорганизмов, потребляющих исключительно лигнин и лишенных целлюлолитической активности.

1.2 Лекция № 2 (2 часа)

Биодеградация синтетических полимерных материалов и использование биодеградируемых пластиков. Биологическое разложение нефти и нефтепродуктов в природных средах.

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Пути деградации синтетических полимерных материалов
2. Возможности создания биоразлагаемых полимерных материалов как основа биопластиков
3. Механизмы биодеградации углеводов нефти
4. Препараты, созданные на основе нефтеокисляющих микроорганизмов.

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

Пластики относятся к материалам, которые в составе различных твердых отходов в большом количестве попадают в окружающую среду. Доля синтетических полимерных материалов в общей массе отходов в настоящее время составляет около 5–6%. Легкость и прочность, высокая способность противостоять воздействию внешних факторов, долговременность использования, нерастворимость в воде, нетоксичность – все это обусловило их широкое распространение. В то же время стойкость пластиков, попавших в отходы, содержание в них добавок, многие из которых весьма токсичны, оборачиваются серьезной экологической проблемой.

В природной среде биодеструкции подвергаются практически все полимерные материалы, однако для большинства из них скорость разрушения чрезвычайно низка. Она зависит от природы полимера, а также вида пластификатора и наполнителя, используемых при изготовлении изделий. В естественных условиях полимеры, по структуре подобные природным (производные целлюлозы, хитина, модифицированный крахмал, полисахариды пуллулан и курдлан, полилактид, полигидроксibuтират, полигликолактид и др.), относительно легко разлагаются и минерализуются микроорганизмами. Часть продуктов разложения таких полимеров вступает в реакции гумификации, образования связанных остатков с почвенным и другим природным веществом.

Непосредственно полимерные смолы, составляющие основу пластика, имеют различную биостойкость в зависимости от химической структуры макромолекулы, длины полимерной цепи, наличия и природы боковых разветвлений и групп, степени кристалличности полимера. Их биоустойчивость повышается по мере роста длины цепи и разветвленности макромолекул. Так, высокомолекулярный полиэтилен не поддается биодеструкции, а низкомолекулярный с $M < 25000$ разрушается под воздействием грибов. Степень разветвленности влияет на стойкость больше, чем молекулярная масса полимера. При прочих равных условиях карбоцепные полимеры являются менее биостойкими, чем гетероцепные, алифатические быстрее разлагаются, чем ароматические, насыщенные – чем ненасыщенные, аморфные – чем кристаллические, гидрофильные – чем гидрофобные, низкоплавкие – чем высокоплавкие, нерегулярные – чем регулярные.

Второй важный компонент пластиков после полимерных смол – пластификаторы. Это наименее стойкие компоненты. Как правило, пластификаторами служат сложные эфиры адипиновой, аконитовой, лауриновой, олеиновой, себаценовой, фталевой и других органических кислот, а также фосфорной кислоты, глицерин, сорбит. Содержание пластификатора может составлять 30–50% от массы пластика, поэтому от биостойкости пластификатора в большой мере зависит и биостойкость всего материала. Пластификаторы, в состав которых входит фосфорная или фталевая кислота, обладают наибольшей стойкостью к воздействию микроорганизмов. Наименьшая устойчивость у эфиров себаценовой и других алифатических кислот.

Кроме полимерных смол и пластификаторов в состав пластиков входят наполнители, стабилизаторы, красители. Наполнители из природных материалов – бумага, волокна, ткани, древесная мука микробиологически нестойки. Скорость биодеструкции полимерных материалов в значительной степени зависит также от пространственной доступности макромолекул биологическим агентам, что определяется гидрофильно-гидрофобными свойствами поверхности материалов, их надмолекулярной организацией и макроструктурой, а также природой реагента. Поперечные связи между макромолекулами и короткие боковые цепочки могут быть стерическим препятствием для атакующих их молекул. Полимерные материалы с пространственно сшитой матрицей наиболее устойчивы. Набухание материала, предобработка его с целью увеличения свободной поверхности, набухаемости и уменьшения стерических препятствий для диффузии ферментов и низкомолекулярных активных частиц в объем матрицы полимера повышают его биодоступность.

Способность полимеров к биодеструкции обычно определяют по стандартной методике, в которой деструкция оценивается ростом микроорганизмов по пятибалльной шкале (наиболее устойчивые пластики – оценка 0 баллов, наименее устойчивые – 4 балла).

Из общего количества 30–40% всех пластиков используется для изготовления упаковочных материалов, бутылок и других жестких контейнеров, а также в качестве покрытия и изоляции. К пластикам, выпускаемым в наибольшем объеме, относятся полиэтилен, полистирол, поливинилхлорид и полипропилен. Они составляют примерно 2/3 в общей массе всех пластиков и относятся к наиболее биостойким. Особенно устойчив полистирол, время разрушения которого в почве составляет десятки лет.

Другие группы пластиков – полиамиды (в том числе нейлоновые и капроновые пластики), полиакрилаты, поликарбонаты, полиформальдегидные смолы, фенопласты также довольно устойчивы к микробиологическому воздействию. Скорость биодеструкции этих материалов сопоставима со скоростью биологического распада лигнина и гуминовых веществ.

К относительно биодоступным относятся полиэфиры (полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, политетраметиленгликоль), полиуретаны и пластифицированный поливинилхлорид (ПВХ), силикон, модифицированный полиэтилентерефталат (ПЭТФ), полибутилсукцинат, поликапролактон. Легко деградируют под действием ферментов полигидроксиалканоаты, полимеры молочной и гликолевой кислот (полилактиды и полигликолактиды), полимеры, содержащие аминогруппы, -полиглутаматы другие полиаминокислоты, ацетат целлюлозы, карбоксиметилцеллюлоза, поливиниловый спирт.

Биодеструкция изделий из синтетических полимеров может быть вызвана микроорганизмами различных систематических групп, относящихся к грибам и бактериям. Однако чаще всего в разрушении пластиков принимают участие смешанные ассоциации микроорганизмов, характеризующихся широким разнообразием.

Несовершенные микроскопические грибы (родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Fusarium*) относятся к наиболее активным разрушителям пластиков, вызывающим различные повреждения и их деструкцию. Эти грибы используют в стандартных тестах на биоустойчивость. Повреждения пластиков происходят в результате разрастания грибов на поверхности материала, проникновения мицелия в его толщу через микротрещины, а также вследствие агрессивного воздействия ферментов и метаболитов грибов (органических кислот) на отдельные компоненты пластиков.

Среди гетеротрофных бактерий наибольшую активность при биодеградациии проявляют стрептомицеты, микобактерии, нокардии, псевдомонады и бациллы (особенно при деструкции полиамидов). Способность всех этих микроорганизмов разрушать полимерные материалы связывают с большим разнообразием ферментов и метаболитов, секретируемых ими в окружающую среду. В результате действия внеклеточных ферментов и метаболитов полимерный материал переводится в растворимое состояние, образуются низкомолекулярные продукты распада, которые доступны микроорганизмам в качестве источников энергии и питания. Биодеструкция полимеров может ускоряться под воздействием окисленных форм ионов Fe и Mn и хемолитотрофных микроорганизмов (железоокисляющих, марганцеокисляющих бактерий), генерирующих окисленные формы ионов в присутствии кислорода.

Важную роль в разрушении пластиков играет их способность адсорбировать микробные клетки. Микроорганизмы прикрепляются к поверхности твердых субстратов в результате действия физико-химических сил (неспецифическая адгезия) и биологических процессов (специфическая, «активная» адгезия). Как правило, чем выше способность микроорганизмов к адгезии, тем выше их деструктивное воздействие. Прикрепившиеся клетки

выделяют ферменты, действующие только в непосредственной близости от клеточной оболочки, поэтому повреждение пластика в данном случае происходит при непосредственном контакте микроорганизмов с ними.

Разрушение материалов под действием ферментов наступает вследствие различных реакций – окисления, восстановления, декарбоксилирования, этерификации, гидролиза и т. д. Активное разрушающее действие оказывают ферменты – гидролазы (эстеразы, протеиназы), лиазы и особенно оксидоредуктазы. Образование эстераз свойственно многим микроорганизмам. Эстеразы катализируют гидролитический разрыв эфирных, сложноэфирных, кислотноангидридных связей. С разрыва эфирной связи начинается разрушение пластификаторов. Образующаяся свободная кислота хорошо используется многими микроорганизмами в качестве источника углерода.

Биодеградация поли- -оксибутирата(поли--гидроксибутирата,ПОБ) начинается с разрыва эфирных связей и образования олигомерных фрагментов и растворимой молекулы-гидроксимасляной кислоты. Растворимые продукты разложения адсорбируются через стенки клеток и метаболизируются. Это отличает ПОБ от многих биодеструктурируемых полимеров. Способность к биодеградации и биосовместимость являются основной предпосылкой применения данного полимера в медицине в качестве протезов, шовных нитей, носителей лекарственных препаратов, пролонгирующих их действие. Способностью разлагаться под действием эстераз также обладают сегментированные полиэфируретаны. В то же время эти полимеры устойчивы к действию коллагеназ и оксидаз.

Хотя основное действие протеиназ – расщепление белков по месту пептидных связей, однако некоторые из них обладают достаточно широкой субстратной специфичностью и способны атаковать полимерные материалы, содержащие амидные и эфирные связи: мочевиноформальдегидные полимеры, акриламидные, полиамиды (капрон, нейлон) и полиуретаны (поролон). Среди секретируемых ферментов этой группы наиболее распространены протеазы трех классов – сериновые, металло- и кислые протеазы. Их оптимум pH лежит в щелочной (pH 8,0–11,0), нейтральной (pH 6,0–7,8) или кислой (pH 2,5–3,5) среде соответственно. Поэтому биодеградация протеиназами сильно зависит от pH среды и ее компонентов (фосфатных, карбонатных, бикарбонатных ионов и др.). Ферменты класса лиаз катализируют негидролитическое расщепление веществ с образованием двойной связи (или присоединение групп по месту двойных связей). При этом могут разрываться связи C–C, C–O, C–N, C–Cl и отщепляться H₂O, CO₂, NH₃, HCl и другие небольшие молекулы. Ферменты этого класса характеризуются высокой специфичностью и избирательностью по отношению к субстрату. Они играют определенную роль, например, в разрушении галлоидсодержащих материалов.

Из оксидоредуктаз особую роль в разрушении пластика играют оксигеназы, оксидазы и пероксидазы. Они действуют на функциональные группы: C–C–, =CH–OH, =C=O, –CH=CH–, =CH–NH₂, –CH=N–. Мицелиальные грибы, разрушающие пластики, выделяют в среду лакказу, тирозиназу, каталазу, пероксидазы, активные кислородные радикалы, т. е. их действие на пластики во многом подобно действию окислительных ферментативных систем у целлюлолитических и лигнолитических организмов. Аналогичное действие характерно для нейтрофилов и макрофагов при атаке на полимерные материалы, имплантированные в организм животных и человека.

Один из основных механизмов разрушающего действия на полимеры низкомолекулярных метаболитов мицелиальных грибов и бактерий – кислотный катализ различных

реакций расщепления под действием органических кислот. Полиэтилен и полипропилен, полистирол, фенопласты и фурановые смолы наиболее устойчивы к действию органических кислот. Менее стойки поливинилхлорид, полиметилакрилат и полиамидные смолы. Полиуретаны не устойчивы к щавелевой кислоте, а эпоксидные смолы относительно неустойчивы к молочной кислоте. Присутствие в пластмассах органических наполнителей, являющихся, как правило, хорошим питательным материалом для плесневых грибов, способствует активному образованию ими органических кислот и тем самым усиливает разрушение пластиков. Водорастворимые аналоги материала полимера могут ускорить его деструкцию, активируя необходимые ферменты подготовительного метаболизма и разлагая устойчивые макромолекулы в режиме кометаболизма с более доступными аналогами. Так, биодеструкция высокостойкого катионообменника на основе пространственно сшитого сополимера стирола и дивинилбензола становится возможной лишь в режиме кометаболизма при потреблении водорастворимого материала, полученного путем обработки этого же ионита реактивом Фентона ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$).

Использование пластмасс, способных быстро разлагаться в природных условиях после определенного срока службы, – один из путей уменьшения антропогенного воздействия на окружающую среду. Полимеры с регулируемым сроком службы, как правило, относятся к фото- и (или) биоразрушаемым, которые разлагаются в природных условиях под действием света, тепла, воздуха и микроорганизмов, включаясь таким образом в биологический цикл. Неферментативный гидролиз, окислительная каталитическая деструкция, фотохимическая деструкция, механодеструкция и механоактивация – все эти процессы, ответственные за небиологические пути разрушения пластиков в природе, улучшают биодоступность и биоразрушаемость полимерного материала. Скорости абиотических процессов, например, фотохимической деструкции, протекающей в природных условиях, зачастую лимитируют суммарную скорость разложения пластика.

Полимер, как правило, считается легкоразлагаемым, если вся его масса разлагается в почве или воде за 6 месяцев. Такие материалы все более широко применяются в бытовых целях для изготовления различных форм (бутыли, контейнеры, коробки и пр.), упаковочных емкостей и пленок разового действия, для изготовления нитей, нетканых материалов, мешков, одноразовых салфеток и предметов личной гигиены, столовых приборов; в сельском хозяйстве: в виде пленок для мульчирования, упаковки для удобрений и семенного материала, для прививок в садоводстве, инкапсулирования семян с целью сокращения сроков созревания и повышения урожайности сельскохозяйственных культур, в качестве защитного покрытия корней при посадке деревьев, для изготовления сеновязального шпагата, способного быстро разлагаться в желудочно-кишечном тракте млекопитающих. Применение легкоразлагаемых полимеров возможно для изготовления геотекстильных материалов, укрепления биоматов, используемых для защиты грунта от поверхностной эрозии и восстановления травяного покрова. Создание из полимера с регулируемым сроком службы ирригационных установок, теплиц позволяет экономить трудовые затраты, необходимые для их демонтажа и утилизации. Биодоступные полимеры могут использоваться для нанесения цветных покрытий и рисунков на поверхности алюминиевых банок. Такие покрытия могут относительно быстро (в пределах 30–60 мин) разлагаться микроорганизмами в специально созданных условиях при обработке банок, идущих в переплавку. Биоразлагаемые материалы также нашли применение в медицине.

Мировая потребность в легкоразлагаемых пластмассах оценивается в несколько млрд долл. На их основе в настоящее время выпускается около 1 млн т различных материалов и изделий, что составляет чуть менее 1% на рынке полимеров. Наиболее быстро растущей областью использования легкоразлагаемых пластиков является производство гибкой упаковки.

Широкое практическое применение быстроразлагаемых полимеров возможно, если они будут удовлетворять ряду требований:

- в результате модификации полимера не должны существенно изменяться его эксплуатационные характеристики;
- добавки, вводимые в полимер, не должны быть токсичными, поскольку полимеры предназначены, в первую очередь, для изготовления тары и упаковки;
- полимеры должны обрабатываться обычными методами, не подвергаясь при этом разложению;
- необходимо, чтобы изделия, полученные из таких полимеров, могли храниться и эксплуатироваться длительное время в условиях отсутствия прямого проникновения УФ-лучей;
 - время до разрушения полимера должно быть известно и варьироваться в широких пределах;
 - продукты разложения полимеров не должны быть токсичными. Принципиально возможны три пути создания биоразлагаемых полимерных

материалов: создание биоразрушаемых пластиков на основе полимеров, синтезируемых и ассимилируемых микроорганизмами;

- введение в полимер добавок, ассимилируемых микроорганизмами; введение в полимер добавок, инициирующих абиотические, прежде всего фотохимические процессы деструкции; продукты которых становятся легкодоступными для последующего биологического разложения.

3. Существенное влияние на скорость процессов биodeградации n-алканов оказывают их физические свойства. Так, нормальные алканы с числом атомов углерода, меньше (при нормальных условиях жидкости) токсичны для большинства бактерий и утилизируются лишь ограниченным числом микроорганизмов. Их токсичность напрямую связана с относительно высокой растворимостью в воде. Если в смеси присутствуют одновременно алканы с длиной цепи больше девяти атомов углерода, токсичность более коротких n-алканов уменьшается. Возможно, это связано с уменьшением их растворимости вследствие распределения между более длинноцепочечными алканами и водной фазой. Вероятно также, что происходит их соокисление, или кометаболизм. Установлено, что при увеличении длины цепи, начиная с n-нонана, скорости роста бактериальной популяции обычно увеличиваются. Сетти с соавторами на основании кинетических данных предложили разделить углеводороды на две группы: жидкие n-алканы (n-C₁₃ - n-C₁₆) и насыщенные углеводороды, твердые при 25°C (от n-C₁₇). Последняя группа также была разделена ими на подгруппы:

I. (C₁₇ - C₂₇) - скорость биodeградации одинакова,

II. (C₂₈ - C₃₅) - скорость биodeградации уменьшается с ростом длины цепи.

Эти наблюдения объяснялись предположением, что на биodeградацию алифатических углеводородов влияют не только их физико-химические свойства - такие, как рас-

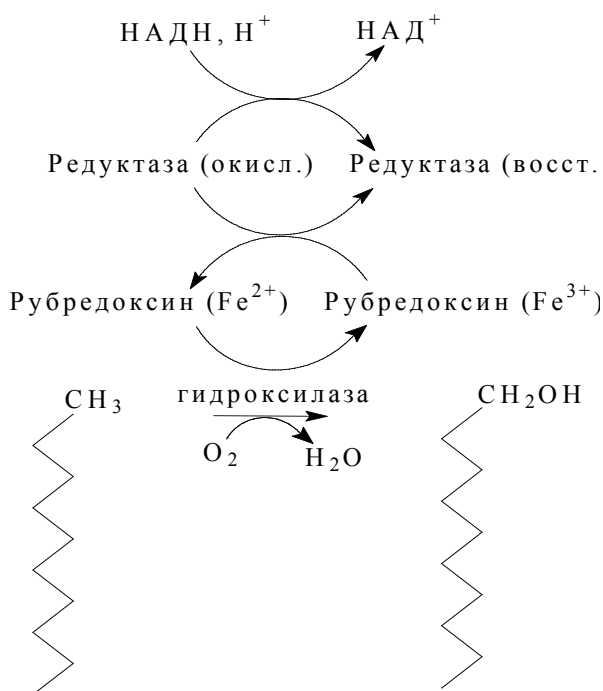
творимость в воде, способность к эмульгированию и величина поверхностного натяжения, но и биологические факторы, такие как ферментативная активность микроорганизмов, аффинность и реакционная способность субстрата.

Кроме этого, следует отметить, что биodeградация алканов может протекать по моно-, ди- и внутритерминальному путям. Так, например, Шарма с коллегами установили, что исследованные ими штаммы микроорганизмов рода *Rhodococcus* способны окислять алканы либо по моно- и дитерминальному, либо только по внутритерминальному пути. При этом при их росте на нечетных n-алканах окисление происходит только по монотерминальному пути, а при росте на четных n-алканах - только по дитерминальному.

В большинстве случаев деградация алифатических углеводородов начинается с окисления концевой метильной группы в первичную спиртовую группу. Например, у *Pseudomonas oleovorans* для этой реакции требуются три белка: рубредоксин, который представляет собой железосеропротеид, НАД-зависимая рубредоксин-оксидоредуктаза и алкан-1-гидроксилаза. Как показано на схеме 1.1, рубредоксин вначале восстанавливается рубредоксин-оксидоредуктазой. Затем окисление углеводорода катализируется монооксигеназой (гидроксилазой), которая помимо субстрата нуждается в доноре электронов (восстановленном рубредоксине). У других организмов вместо рубредоксина в качестве ко-субстрата могут функционировать другие доноры электронов (схема 1).

Схема 1

Механизм расщепления алканов аэробными микроорганизмами в аэробных условиях



Первичный спирт, образовавшийся из углеводорода, окисляется сначала до альдегида, а затем под действием НАД-зависимых дегидрогеназ до соответствующих жирных кислот, которые затем разлагаются путем β-окисления, либо используются клеткой в качестве строительного материала.

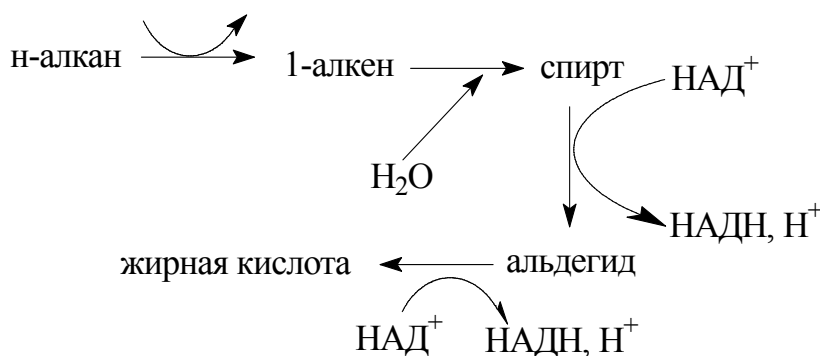
Помимо монооксигеназ у аэробных микроорганизмов в окислении алканов могут также участвовать диоксигеназы, так называемый путь Финнерти, в котором алканы окисляются до альдегидов через образование гидропероксидов, минуя стадию образования спиртов и кислородных радикалов, как это наблюдается при действии монооксигеназ.

По этому механизму может осуществляться окисление н-алканов ($C_{10} - C_{30}$) и алкенов ($C_{12}-C_{20}$).

В литературе описаны и другие механизмы биотрансформации алканов. Так, на примере штамма *Pseudomonas sp. 196Aa* показано, что аэробные микроорганизмы способны метаболизировать н-алканы в анаэробных условиях, образуя алкены (схема 2).

Схема 2

Механизм анаэробной деградации н-алканов аэробными микроорганизмами

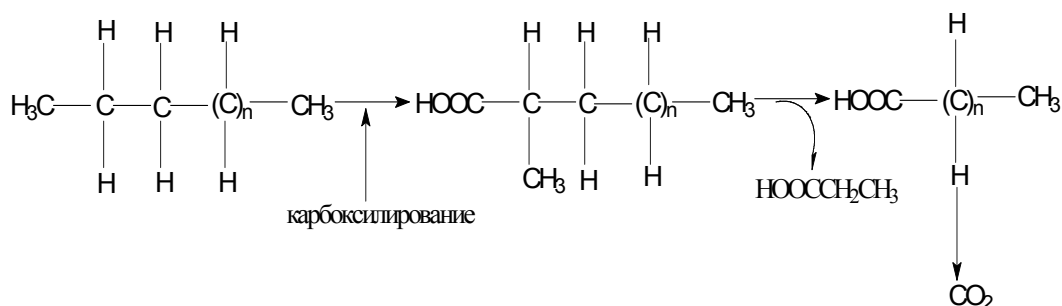


Данный процесс осуществляется НАД-зависимыми дегидрогеназами, а сильная аэрация угнетает рост данного штамма на н-алканах [17].

Анаэробные микроорганизмы также способны метаболизировать алифатические углеводороды. На схеме 3 представлен механизм биотрансформации н-алканов сульфат-редуцирующим штаммом АКО-1. Центральной стадией анаэробной деградации алканов, как и анаэробной деградации ароматических углеводородов, является карбоксилирование молекулы субстрата.

Схема 3

Механизм анаэробного окисления алканов анаэробными микроорганизмами



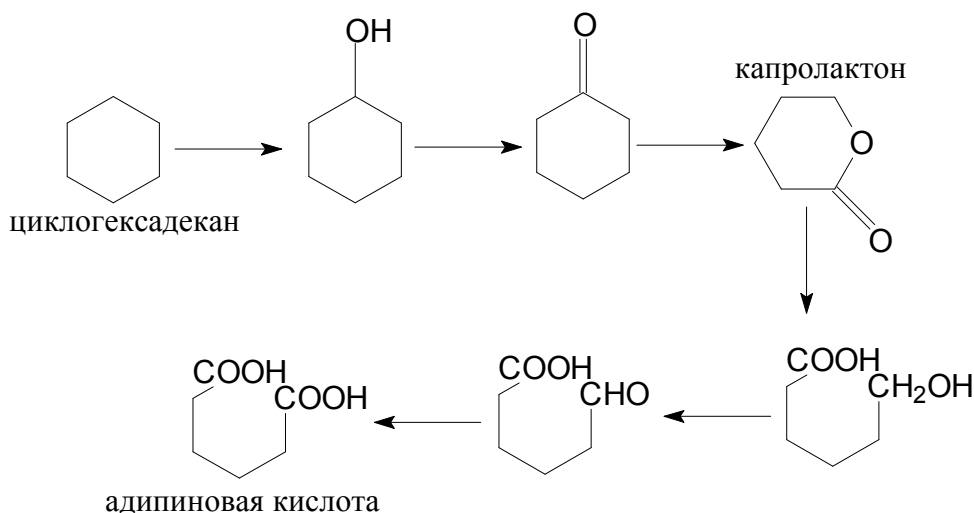
При этом донором углерода, который входит в состав образовавшейся карбоксильной группы, могут выступать различные соединения: фумарат (как установлено при деградации толуола, ксилола и алканов штаммом АКО-1), бикарбонат (как установлено при деградации нафталина и алканов штаммом НХО-3) и др. Дальнейшее разложение алканов протекает также путем β -окисления.

Интересно также рассмотреть механизм биodeградации циклоалканов. В литературе описаны штаммы, способные биodeградировать циклические алканы. К ним относятся

бактерии родов *Gordonia*, *Xanthobacter* и др. Штаммы, деградирующие циклоалканы, имеют специфические ферментные системы, отличные от ферментных систем, используемых микроорганизмами для окисления нециклических алканов. Путь, по которому протекает деградация циклоалканов, на данный момент довольно хорошо изучен и представлен на схеме 4. Дальнейшее разложение дикарбоновых кислот не представляет трудностей.

Схема 4

Механизм бактериального разложения циклоалканов на примере биodeградации циклогексана



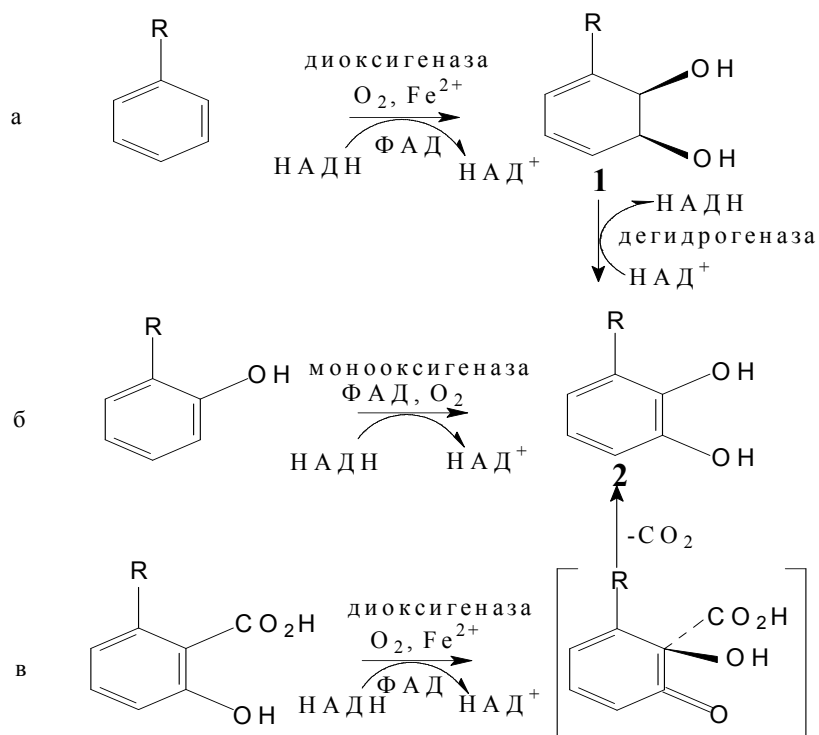
Механизмы расщепления ароматической структуры

Стабильная резонансная структура ароматических углеводородов довольно устойчива к разрыву. Для того, чтобы произошло разрушение ароматического кольца, необходимо затратить энергию, составляющую примерно 150 кДж/моль, и некоторые микроорганизмы способны осуществлять такой процесс. Существуют две основные стратегии разрушения ароматической структуры, используемые микроорганизмами. Первая используется аэробными микроорганизмами, которые окисляют ароматическое кольцо до дигидроксиароматических соединений (катехолов или гидрохинонов) с последующим окислительным раскрытием ароматического кольца. Вторая используется анаэробными микроорганизмами, способными восстанавливать ароматическое кольцо с дальнейшей дефрагментацией образовавшихся циклогексановых производных. Незамещенные ароматические соединения, такие как бензол, нафталин, бифенил преобразуются аэробными микроорганизмами в соответствующие цис-1,2-дигидродиолы (**1**) и далее в 1,2-дигидроксикатехолы (**2**), как это показано на схеме 1.5а. Этот процесс осуществляется семейством трехкомпонентных диоксигеназ, которые состоят из НАД-зависимой флавинредуктазы, электрон-транспортного белка на основе железо-серных кластеров и диоксигеназной субъединицы. Окисление дигидродиола до дигидроксикатехола осуществляется НАД-зависимыми дегидрогеназами. Диоксигеназные системы найдены в большинстве микроорганизмов, способных потреблять ароматические углеводороды: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacterium spp* и др. В зависимости от используемого субстрата диоксигеназные системы можно также разделить на несколько классов: диоксигеназы, осуществляющие расщепле-

ние бензойной кислоты, нафталина, бифенила и бензола, хлорсодержащих ароматических углеводородов и т.д. Катехолы обычно также являются продуктами ортогидроксилирования фенолов, осуществляемого ФАД-зависимыми монооксигеназами (схема 5 б). Помимо того катехолы могут образовываться при окислительном декарбоксилировании салициловой кислоты и ее производных (схема 5 в).

Схема 5

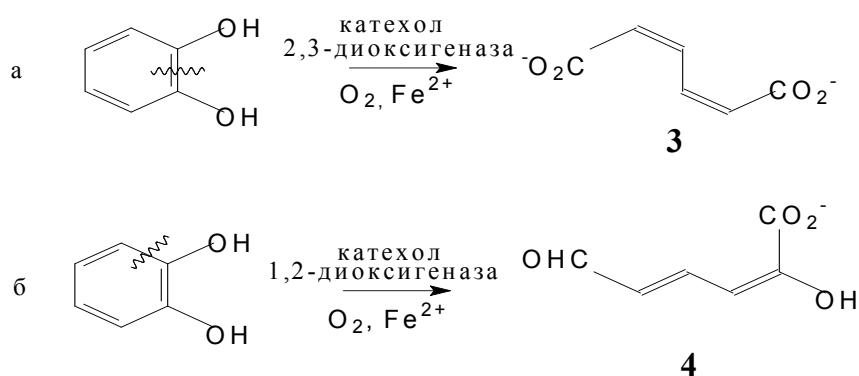
Основные пути расщепления ароматической структуры под действием различных микроорганизмов



Описаны два механизма дальнейшего расщепления ароматического кольца у образовавшихся катехолов: (1) - интрадиоловый путь (орто-раскрытие), при этом происходит образование муконовой кислоты (3) (схема 1.6а), и (2) - экстрадиоловый путь (мета-раскрытие), с образованием альдегидной производной гидроксимуконовой кислоты (4) (схема 6 б). Эти процессы катализируются железосодержащими катехол-диоксигеназами (схема 6 б).

Схема 1.6

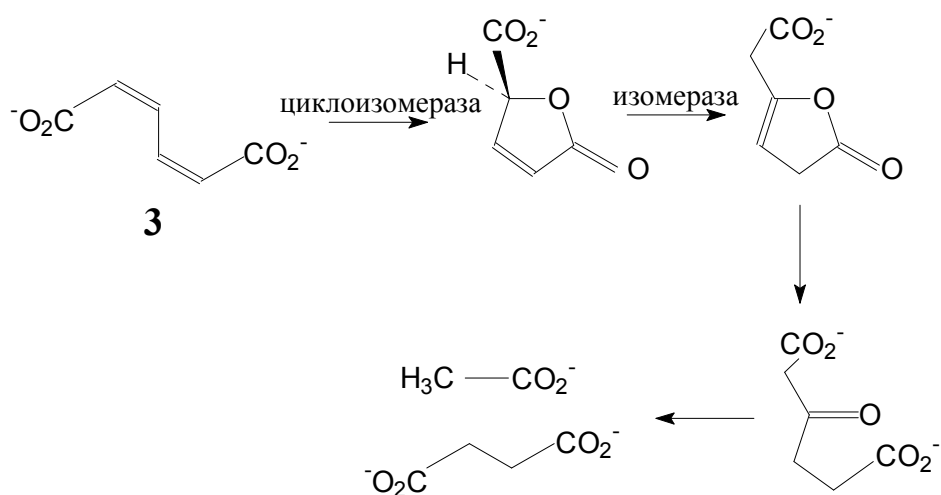
Интрадиоловый (а) и экстрадиоловый (б) пути расщепления ароматической структуры



Орто-путь расщепления катехолов, как это было изучено для штамма *Pseudomonas putida*, далее протекает согласно механизму, представленному на схеме 7.

Схема 7

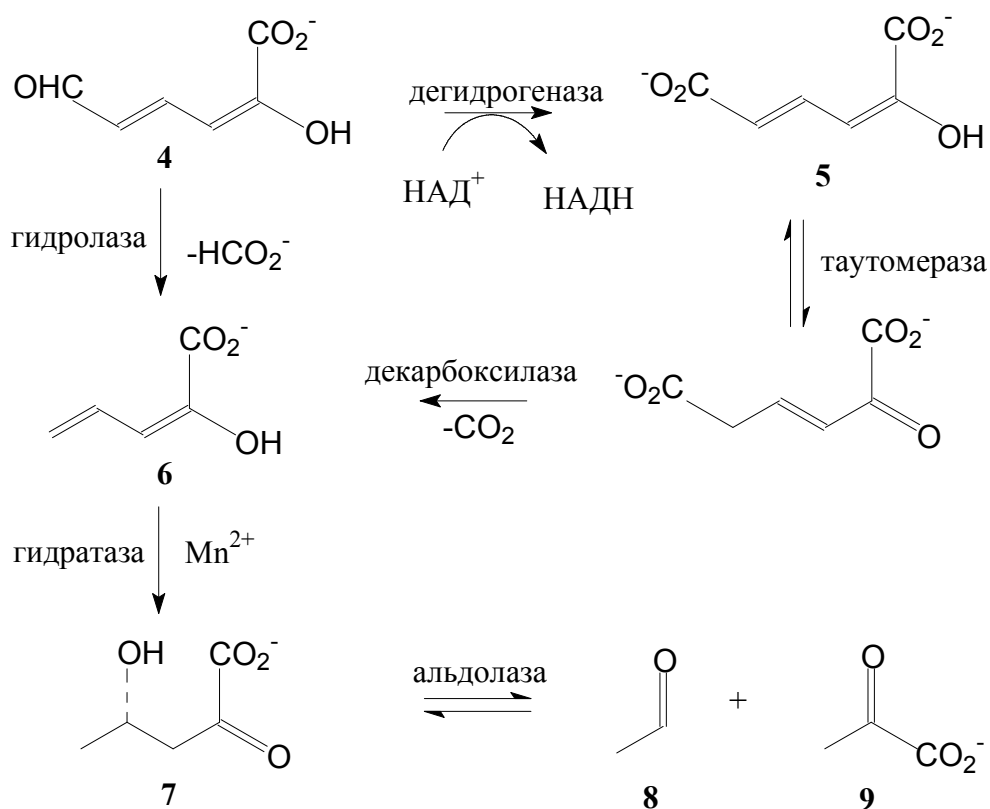
Механизм бактериального разложения муконовой кислоты штаммом *Pseudomonas putida*



Конечные продукты при этом - янтарная (сукцинат) и уксусная (ацетат) кислоты, которые далее вступают в цикл Креббса. В дальнейшем расщеплении катехолов по мета-пути (схема 1.6а) штаммом *Pseudomonas putida*, как полагают, могут быть задействованы два механизма, приводящие к одним и тем же конечным продуктам (схема 1.8).

Схема 8

Механизм бактериального разложения альдегидной производной гидроксимуконвой кислоты



Согласно первому механизму, альдегид 2-гидроксимуконической кислоты может окисляться под действием НАД-зависимой дегидрогеназы до 2-гидроксимуконической кислоты (5), которая переходит под действием таутомеразы в таутомерную форму. Далее происходит декарбоксилирование. В соответствии со вторым механизмом, гидролитическое расщепление альдегида 2-гидроксимуконической кислоты может осуществляться с образованием муравьиной и 2-гидроксипентадиеновой кислот (6). Такой путь всегда используется при биоразложении о-крезола (2-метилфенола), однако в этом случае вместо муравьиной выделяется уксусная кислота. Под действием гидратазы 2-гидроксипентадиеновая кислота далее переходит в 4-гидрокси-2-оксопентановую кислоту (7), которая под влиянием альдолазы расщепляется на ацетальдегид (8) и пируват (9).

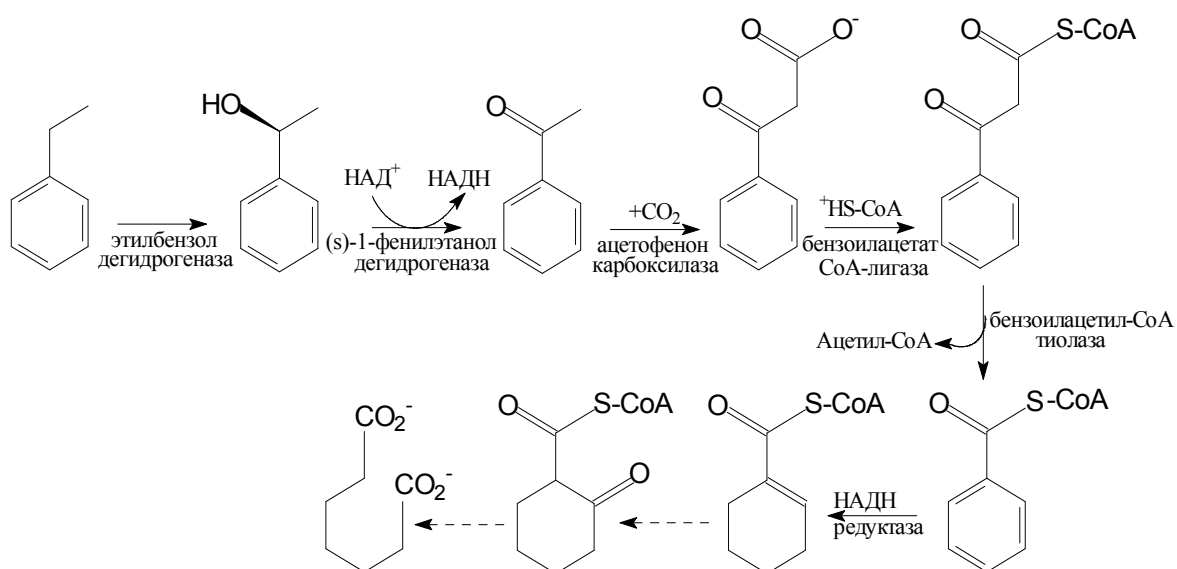
Длинные алифатические заместители ароматических соединений расщепляются в результате β -окисления до более коротких боковых фрагментов, и далее образовавшиеся интермедиаты претерпевают расщепление ароматического кольца по одному из приведенных выше механизмов.

Ароматические соединения могут также расщепляться в анаэробных условиях. Как уже отмечалось выше, центральной стадией расщепления ароматических углеводов является стадия образования карбоксильного производного исходного субстрата. При этом донорами углерода, входящего в состав образовавшейся карбоксильной группы, могут выступать различные соединения: фумарат (при деградации толуола, ксилола), бикарбонат (при деградации этил- и пропилбензола, полиароматических углеводов) и др. Далее происходит восстановление ароматического кольца с последующей дефрагментацией образовавшихся циклогексановых производных. На схеме 1.9 на примерах этилбензола (схема 1.9а) и толуола (схема 1.9б) показано анаэробное разложение ароматической структуры с использованием бикарбоната и фумарата соответственно в качестве источников карбоксильной группы. Так, некоторые денитрифицирующие штаммы преобразуют

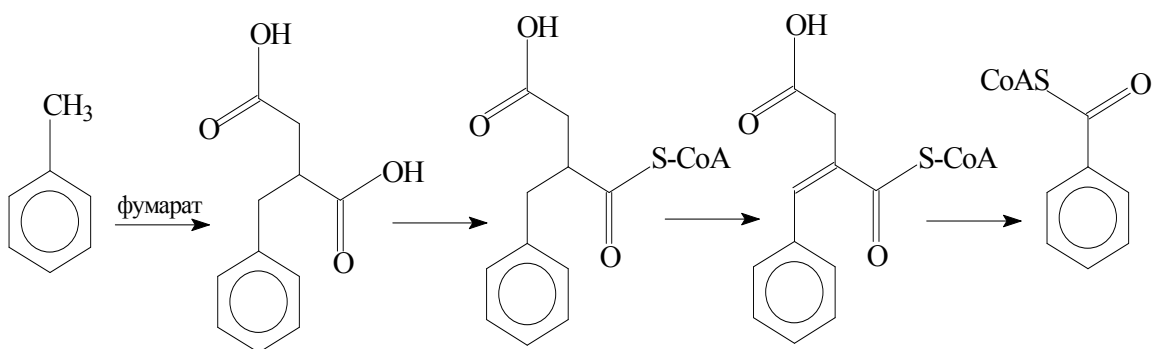
ароматические субстраты, имеющие углеводородные заместители, в бензойную кислоту и далее в бензоилкофермент-А. Бензоилкофермент-А в свою очередь восстанавливается до производных циклогексенилкофермента-А, которые впоследствии гидролитически расщепляются, а образовавшиеся продукты претерпевают β -окисление.

Схема 9

Механизм анаэробного разложения ароматических соединений на примерах этилбензола (а) и толуола (б)



а



б

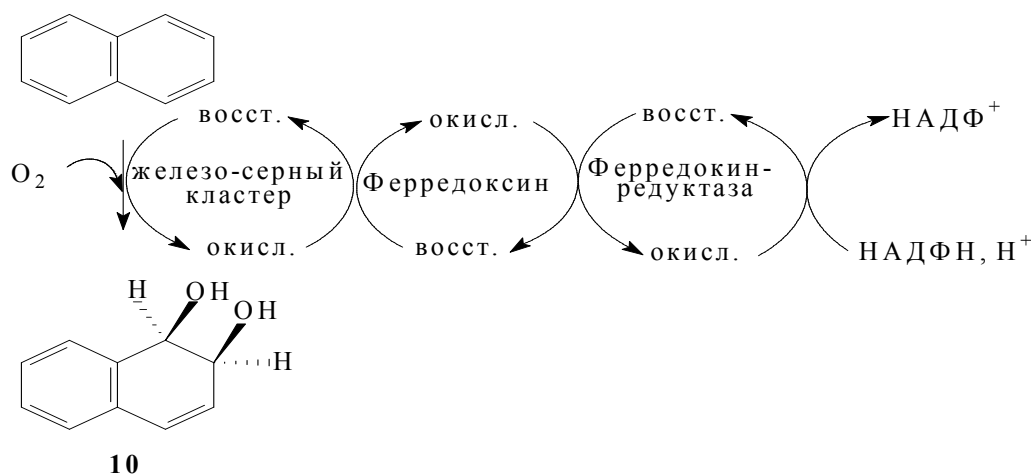
Механизмы биodeградации полиароматических углеводородов

Полиароматические углеводороды (ПАУ) - очень опасные загрязнители, что обусловлено их токсичным, канцерогенными и мутагенными свойствами, а также медленным разложением в природных условиях. Существуют фундаментальные различия в механизмах расщепления полиароматических молекул, осуществляемых микроорганизмами. Бак-

терии и некоторые зеленые водоросли окисляют ПАУ, используя оба атома молекулярного кислорода (реакция катализируется диоксигеназой), при этом получается цис – дигидродиол, который затем подвергается дегидрогенизации, образуя катехол. Некоторые грибы способны окислять ПАУ с помощью цитохрома Р450 монооксигеназ посредством включения одного из атомов молекулы кислорода в ПАУ. Самый простой ПАУ, с точки зрения химического строения, - нафталин, состоящий из двух конденсированных бензольных колец. Впервые метаболизм расщепления нафталина бактериями рода *Pseudomonas* описан еще в 1964 г. Первым шагом при бактериальном расщеплении нафталина обычно является образование цис-1,2-дигидрокси-1,2-дигидронафталина (**10**), хотя в некоторых случаях может образовываться цис-2,3-дигидрокси-2,3-дигидронафталин, под действием диоксигеназных систем, как это описано для *Bacillus thermoleovorans*. Диоксигеназы - мультикомпонентные ферменты, состоящие не менее чем из трех белков. Например, нафталиновая диоксигеназа бактерии *Pseudomonas putida* состоит из флавопротеина (ферредоксин редуктаза), ферредоксина и эндооксидазы (ISP_{МАР}). Кроме того, цис-дигидродиоловый метаболизм включает НАД-зависимую дегидрогенизацию, в результате чего получается 1,2-дигидроксинафталин (**11**). Механизм действия этих ферментных систем представлен на схеме 10.

Схема 10

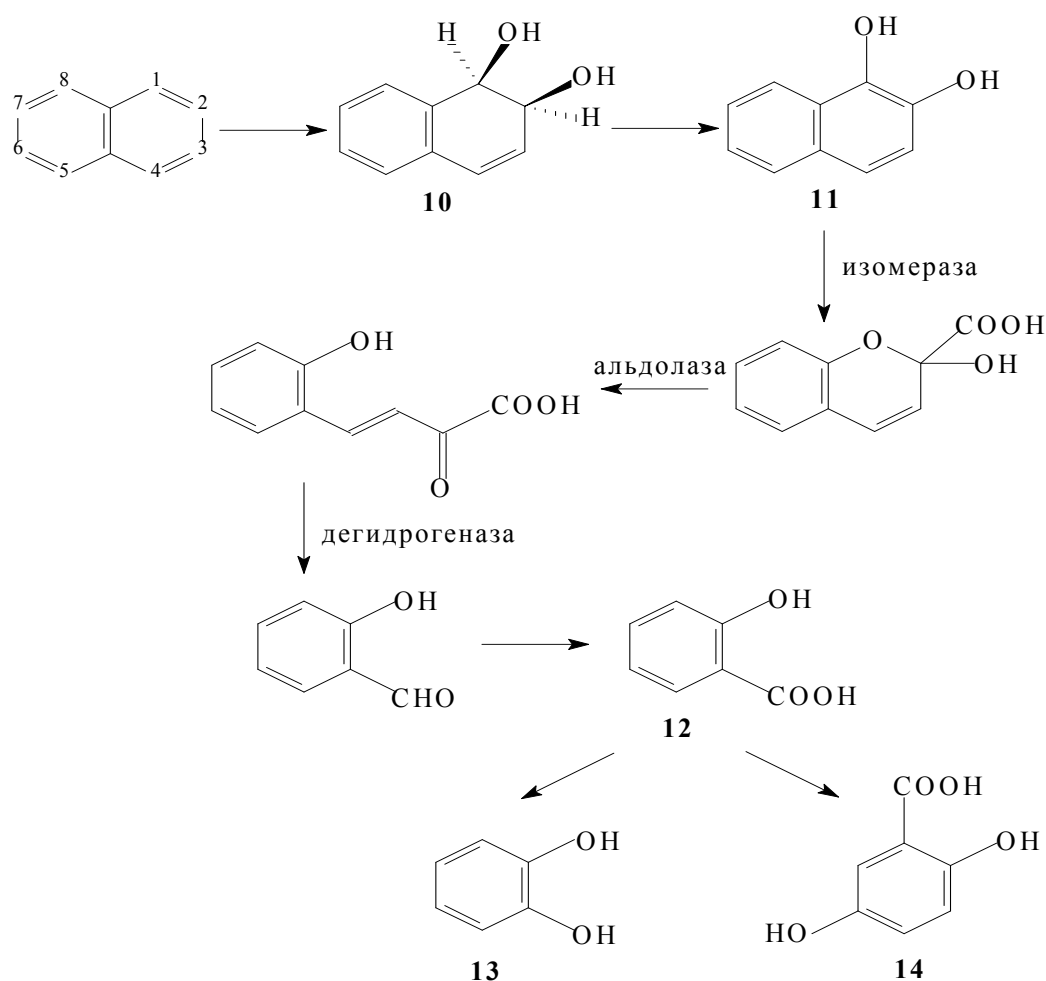
Механизм действия диоксигеназных ферментных систем на примере окисления нафталина



Следующий шаг - раскрытие ароматического кольца по мета-пути. Далее под действием изомеразы, альдолазы и дегидрогеназы образуется салициловая кислота (**12**). Для салициловой кислоты описаны два метаболических пути разложения: через образование катехола (**13**) и через образование гентизата (**14**) (схема 1.11). Для каждого из этих продуктов существует отдельный механизм биоразложения, осуществляемый различными ферментными системами, причем в случае катехола, конечными продуктами биоразложения являются ацетил- и сукцинилкофермент-А, а в случае гентизата – ацетоацетат и фумарат.

Схема 11

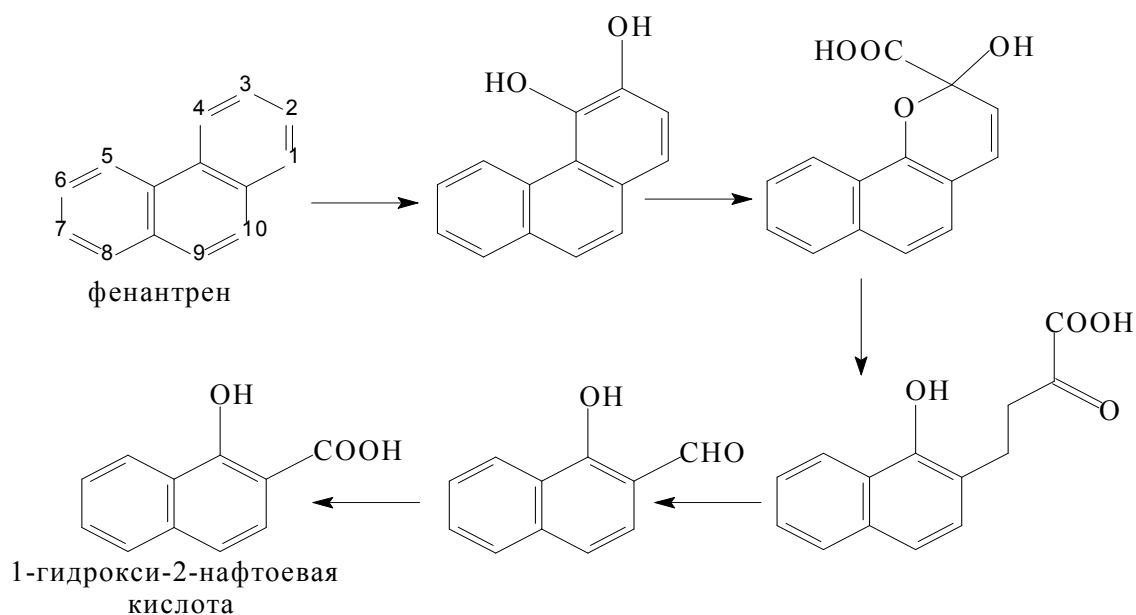
Механизм биodeградации нафталина



Механизм биodeградации фенантрена и антрацена также довольно хорошо изучен, причем ферменты, осуществляющие конверсию нафталина до салицилата, способны разлагать и антрацен до 1-гидрокси-2-нафтоевой (схема 1.12) и 2-гидрокси-3-нафтоевой кислот, соответственно. Обычно окисление фенантрена происходит по 3,4-позиции, хотя для штамма *Sphingomonas sp. strain P2* был описан другой путь биodeградации фенантрена - по 1,2-позиции.

Схема 12

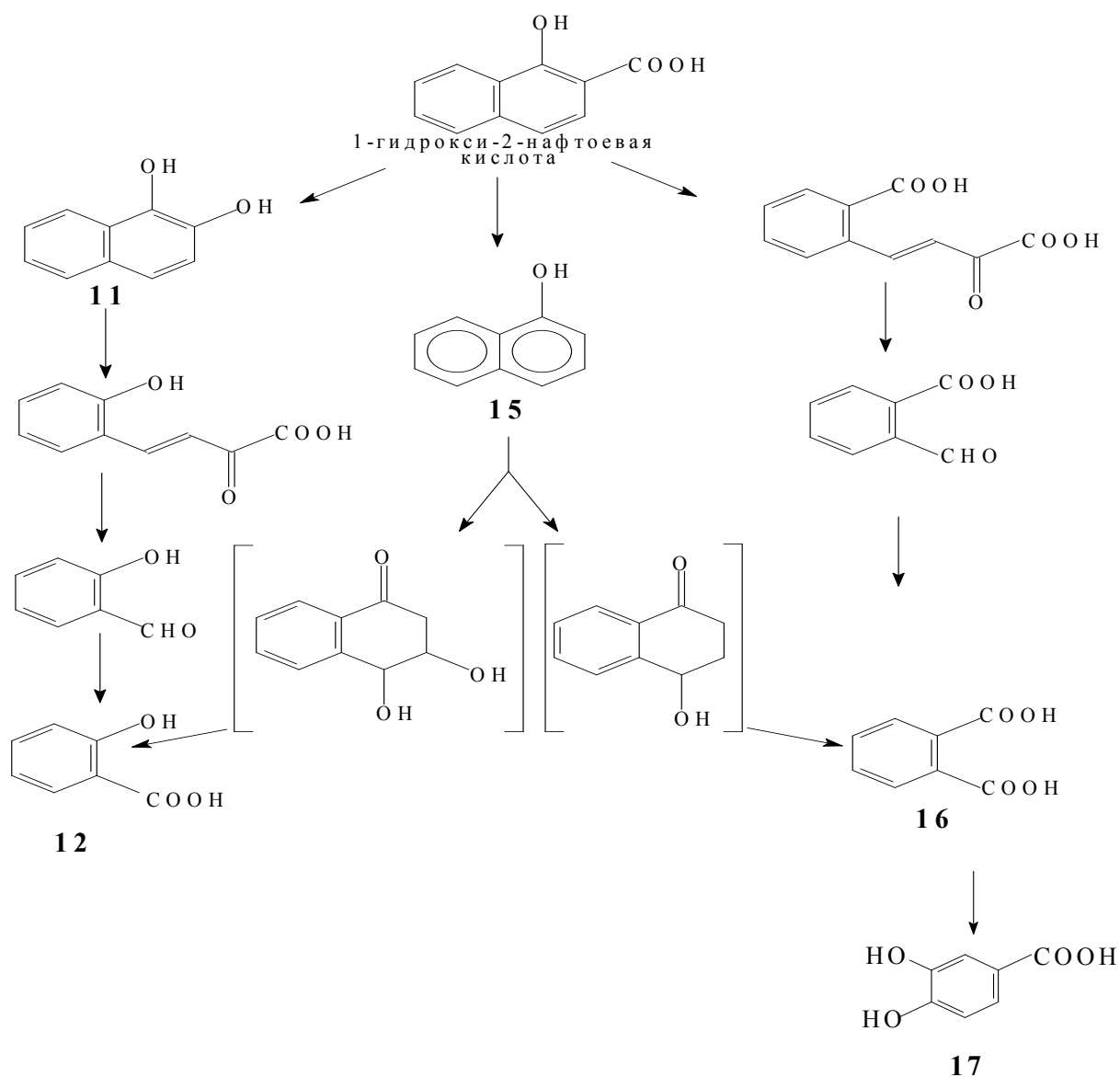
Механизм бактериального окисления фенантрена



В дальнейшем 1-гидрокси-2-нафтоевая кислота может метаболизироваться по трем различным путям. Первый - образование 1,2-дигидрокси-нафталина, который участвует в биodeградации нафталина. Второй путь так же включает стадию декарбоксилирования, но при этом образуется 1-нафтол (**15**). В дальнейшем 1-нафтол преобразуется либо в салициловую (**12**), либо во фталевую кислоту (**16**). Фталевая кислота далее переходит в протокатехат (**17**). Метаболизм салициловой кислоты описан выше. Третий путь осуществляется без стадии декарбоксилирования, а после раскрытия кольца и некоторых преобразований образуется фталевая кислота, которая в дальнейшем переходит в протокатехат (схема 13).

Схема 13

Механизм биodeградации 1-гидрокси-2-нафтоевой кислоты

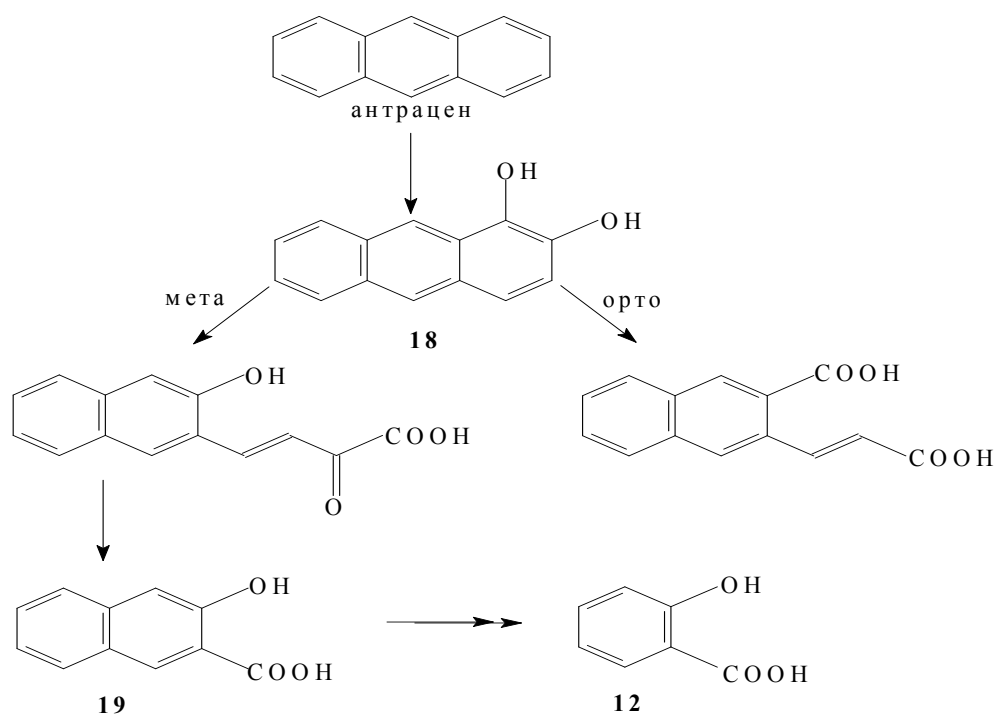


На основании вышеизложенного становится понятно, почему многие штаммы способны расти как на нафталине, так и на фенантрене в качестве единственного источника углерода, но при этом существуют штаммы, которые способны расти только на фенантрене, но не способны метаболизировать нафталин.

Образующаяся при окислении антрацена в результате мета-раскрытия ароматического кольца 1,2-дигидроксиантрацена (**18**), 2-гидрокси-3-нафтоевая кислота (**19**), конвертируется в 2,3-дигидрокси-нафталин, который в дальнейшем метаболизируется в салицилат и катехол (схема 1.14), хотя для одного из штаммов рода *Rhodococcus* было показано, что разрыв при окислении 1,2-дигидроксиантрацена может происходить и в орто-положении.

Схема 14

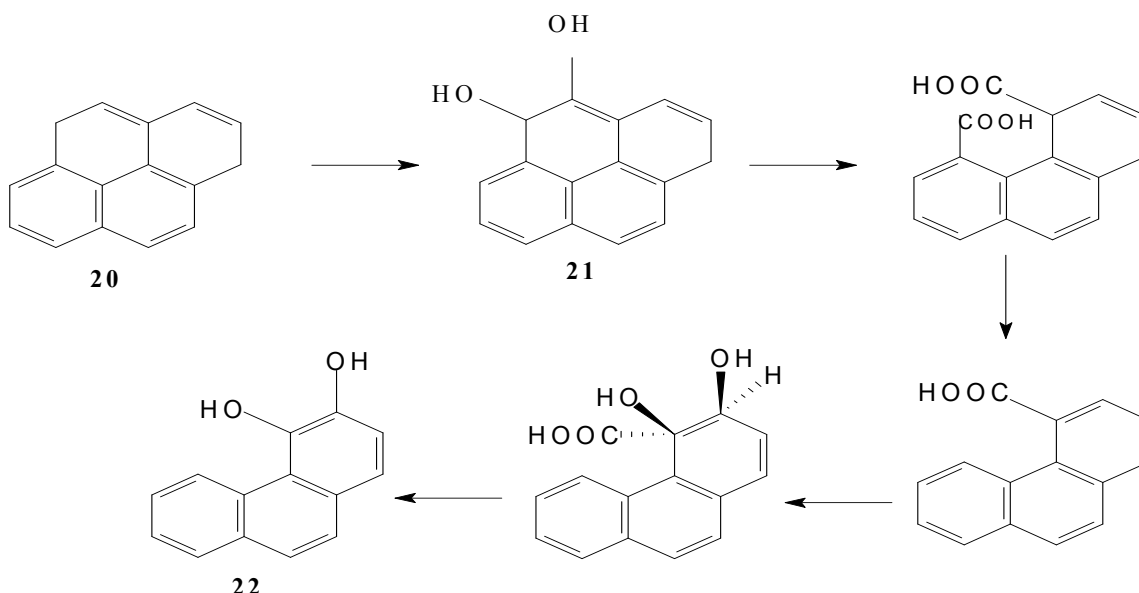
Механизм бактериального разложения антрацена



Разложение конденсированных ароматических молекул, состоящих более чем из трех ароматических колец можно рассмотреть на примере пирена (**20**). Биodeградация пирена, как и биodeградация других ароматических молекул, начинается с образования 1,2-диола (**21**) под действием диоксигеназных систем. Далее образуется 3,4-дигидроксифенантрен (**22**), механизм расщепления которого описан выше и показан на схеме 15.

Схема 15

Механизм биodeградации пирена

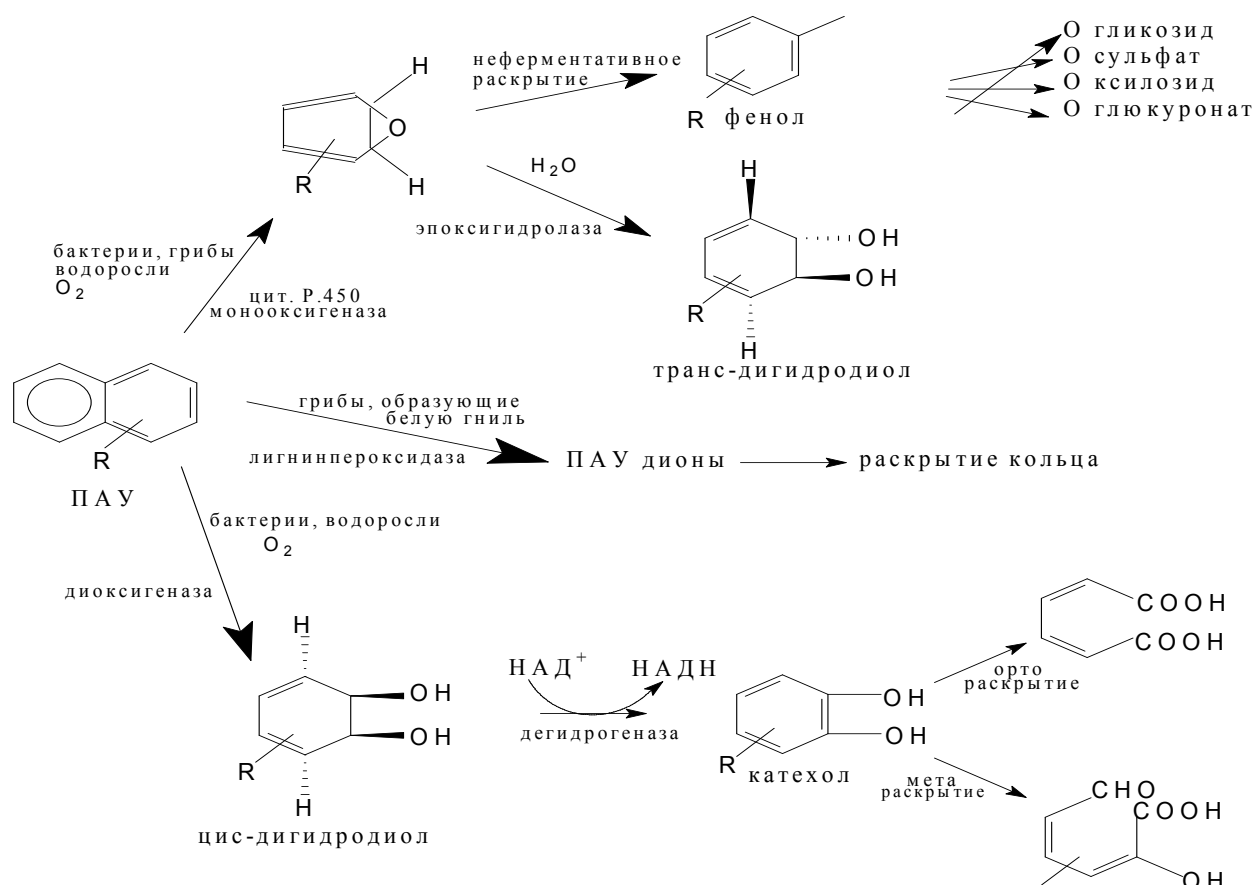


Следует отметить, что микроорганизмы способны использовать в качестве единственного источника углерода и энергии только те ПАУ, которые имеют в своем составе не более четырех конденсированных ароматических колец. ПАУ, имеющие пять и более конденсированных колец, могут быть деградированы только в случае присутствия в системе других субстратов.

В отличие от бактерий грибы окисляют ПАУ с помощью цитохрома Р450 монооксигеназ посредством включения одного из атомов молекулы кислорода в ПАУ с образованием ареноксида; второй атом при этом идет на образование молекулы воды. Монооксигеназы также являются мультикомпонентными системами. Обычно они иммобилизованы на мембране и имеют широкую субстратную специфичность. Многие ареноксины - нестабильные соединения и могут переходить или в транс-дигидродиол с помощью эпоксид-гидролазы, или в отсутствие ферментов в соответствующие фенолы, которые далее могут конъюгировать с глюкозой, сульфатом, ксилозой или глюкуроновой кислотой (схема 16).

Схема 16

Основные пути микробного метаболизма полиароматических углеводородов



4. Препараты на основе нефтеокисляющих микроорганизмов

Подобно тому, как происходит под воздействием микроорганизмов самоочищение водоемов от попавших туда нефтеотходов, происходит в естественных условиях и самоочищение почвы. Однако этот процесс идет гораздо медленнее. Фирмой «Лео Консульт» (Германия) разработан метод интенсивной биологической очистки загрязненной нефтепродуктами почвы, песка, глины и т.п. (Биосистем Эрде). По этому методу условия для жизни адаптированных микроорганизмов оптимизируют таким образом, что удаление углеводородов из почвы осуществляется за 12-24 месяца. Особое внимание при этом уделяется виду, влагосодержанию и гидрологии почвы, содержанию в ней питательных веществ и микроэлементов, определению вида вредных веществ (качественный состав) и их количества, а также определению pH и наличия биологических ядов и веществ, которые замедляют, блокируют ННН в них нефтепродуктов более 1%.

Таблица

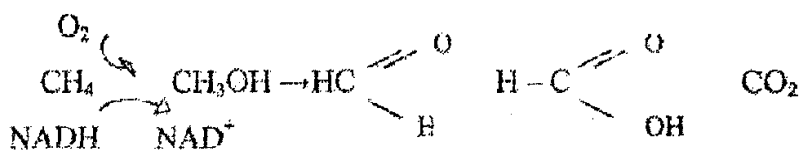
Способ	Стоимость обезвреживания марки за 1 кг
Термическое обезвреживание	250-420
Свалка для ПО (Германия)	225-350
Свалка для ПО (Бельгия)	175-250
Биосистем Эрде	135-220

В Тюмени (ЗапСибНИГНИ) разработан комплекс, технических решений по ликвидации загрязнений нефтепродуктами почвы. Основным средством для осуществления процесса обезвреживания является сухой бактериальный препарат «Путидойл», полученный на основе природного штамма углеводородокисляющих бактерий *Ps. putida* 36. Процесс основан на действии самих вносимых с препаратом микроорганизмов за счет дополнительной подкормки в виде минеральных солей - источников азота и фосфора. Бактериальный штамм, являющийся основой биопрепарата, обладает высоко выраженной окисляющей активностью в отношении углеводородов нефти прямой, разветвленной и циклической структур, вызывая в них необратимые процессы деградации до остаточных продуктов, относящихся к экологически нейтральным соединениям. Препарат представляет собой мелкодисперсный светлый порошок, влажностью менее 10% с концентрацией бактериальных клеток не ниже 10^{11} в грамме сухого вещества. Расфасовка осуществляется в полиэтиленовые пакеты вместимостью 1 и 10 кг. Гарантийный срок хранения один год при температуре 20°C. Объектами применения являются: загрязненные земли, нефте-содержащие осадки сточных вод, технологические резервуары, танки речных и морских судов, полотно железных дорог, территории нефтебаз-складов ГСМ. Технология применения заключается в приготовлении азотно-фосфорной подкормки, рабочей суспензии и обработки ими нефтезагрязненных участков воды и почвы. Препарат способен очищать воду с загрязненностью до 25 г/л и почву с загрязненностью до 10 кг/м³. С его помощью можно обезвреживать до 20 компонентов сырой нефти, включая асфальтено-смолистые фракции. При этом снижается содержание бензопирена в остаточных продуктах распада нефти в 10 раз. Препарат жизнедеятелен при температурах окружающей среды от +70°C до -50°C, сохраняет окислительную активность в высушенном состоянии, устойчив к действию химических веществ, загрязняющих воды и почвы. Он активен только в кислородной среде и погибает в анаэробных условиях, что исключает заражение им земных недр. Его применение повышает выход биомассы в 4 раза по сравнению с естественными условиями существования среды до нефтяного загрязнения, способствуя удобрению почвы и повышению кормовых ресурсов для обитателей водоемов. Применение «Путидойла» на местности, загрязненной в пропорции 10 кг нефти на 1 м² почвы, позволяет через 2,5 месяца возобновить ее растительный покров.

Разработано еще несколько биопрепаратов на основе нефтеокисляющих микроорганизмов. Так, в полевом эксперименте на одном из нефтепромыслов Татарстана испытывалась возможность использования микробиологических процессов для очистки чернозема от нефтяного загрязнения двумя вариантами. В одном варианте нефтяное загрязнение ликвидировали методом активизации аборигенной почвенной микрофлоры. В другом - использовали промышленный (фракции C₉-C₁₆). Низкомолекулярные жидкие парафины C₅-C₈ обычно не используются, т.к. они способны растворять клеточные мембраны, вследствие чего клетки гибнут. Пример: метан и додекан. Метан окисляется с помощью метаномоноксиеназы. Этот фермент включает атом кислорода в углеводород, в результате чего образуется спирт-метанол. В реакции также принимает участие NADH, который отдает восстановительные эквиваленты другому атому кислорода. При этом образуется H₂O и NAD⁺.



Образующийся метанол последовательно окисляется до CO_2 в реакциях, катализируемых дегидрогеназами:



Так, на основе активного нефтеокисляющего штамма *Rhodococcus erythropolis* AC-1339D и добавок в виде белково-витаминных концентратов разработан биопрепарат «Родотрин». Он может быть выпущен в виде сухого порошка, содержащего в 1 грамме абсолютно сухого веса не менее 0,5 млрд. клеток бактерий и в виде водной суспензии до 8-10% биомассы. Биопрепарат обладает широким спектром окислительной активности: деградирует легкие и тяжелые углеводороды, асфальто-смолистые фракции, а также жидкие битумы, трансформируя их в экологически безвредные вещества. [4] Штамм-деструктор способен расти на среде с содержанием NaCl до 3,0 -3,5 % масс., при значении pH 4-8, температуре от 15-45°C. Биопрепарат способен очищать воду с загрязненностью нефтепродуктами до 30 г/л и почву до 13-15% масс. и безвреден для человека и животных (свидетельство о депонировании штамма №27 ВКМ от 17.06.1991 год).

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1 Лабораторная работа № 1 (2 часа).

Тема: «Изучение бактериальной микрофлоры активного ила. Сопутствующие организмы: водоросли, грибы, простейшие, колонирующие, черви, низшие ракообразные».

2.1.1 Цель работы: рассмотреть отличительные морфологические признаки основных групп микроорганизмов, встречающихся в илах очистных сооружений

2.1.2 Задачи : выявить основные закономерности жизнедеятельности биоценозов активного ила.

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Набор демонстрационного оборудования (мультимедиа проектор, экран, ноутбук, средства звуковоспроизведения) и учебно-наглядные пособия.

2.1.4 Описание (ход) работы: законспектировать основные закономерности жизнедеятельности биоценозов активного ила. Подготовить доклады.

2.2 Лабораторная работа № 2 (2 часа).

Тема: «Превращения микроорганизмами соединений углерода, азота и других элементов»

2.2.1 Цель работы: изучить способность почвенных микроорганизмов утилизировать органические субстраты

2.2.2 Задачи : изучить методики выделения аборигенных микромицетов из почвы, определить качественно способность к образованию гидролитических ферментов при росте на различных субстратах.

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Набор демонстрационного оборудования (мультимедиа проектор, экран, ноутбук, средства звуковоспроизведения) и учебно-наглядные пособия.

2.2.4 Описание (ход) работы:

Законспектировать методики выделения аборигенных микромицетов из почвы, определить качественно способность к образованию гидролитических ферментов при росте на различных субстратах.

2.3 Лабораторная работа № 3 (2 часов).

Тема: «Биоконверсия отходов сельского хозяйства»

2.3.1 Цель работы: знакомство с биотехнологией ферментов

2.3.2 Задачи :

1. Знакомство с источниками ферментов; с ферментами животного и растительного происхождения
2. Изучение основных технологических этапов производства ферментных препаратов.
3. Знакомство с комплексными ферментными препаратами (МЭК); с иммобилизованными ферментами и их носителями.
4. Рассмотрение вопроса о способах иммобилизации.
5. Знакомство с процессами микрокапсулирования; двойного эмульгирования; включения в волокна; включения в липосомы.

2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Набор демонстрационного оборудования (мультимедиа проектор, экран, ноутбук, средства звуковоспроизведения) и учебно-наглядные пособия.

2.3.4 Описание (ход) работы:

Знакомство с источниками ферментов; с ферментами животного и растительного происхождения; изучение основных технологических этапов производства ферментных препаратов; знакомство с комплексными ферментными препаратами (МЭК); с иммобилизованными ферментами и их носителями; рассмотрение вопроса о способах иммобилизации; краткий конспект, работа в группах, заполнение схем и таблиц

2.4 Лабораторная работа № 4 (2 часов).

Тема: «»Приемы активизации процессов биоконверсии отходов».

2.4.1 Цель работы: использование специализированных препаратов для биоутилизации отходов

2.4.2 Задачи: освоить методику получения аборигенных деструкторов

2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Набор демонстрационного оборудования (мультимедиа проектор, экран, ноутбук, средства звуковоспроизведения) и учебно-наглядные пособия.

2.4.4 Описание (ход) работы: краткий конспект по методике получения аборигенных де-структоров, работа в группах, заполнение схем и таблиц

**3. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ
ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ не предусмотрено РУП**

**4. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ
ПО ПРОВЕДЕНИЮ СЕМИНАРСКИХ ЗАНЯТИЙ не предусмотрено РУП**