

М. Н. ПОГЛАЗОВА, Г. Е. ФЕДОСЕЕВА, А. Я. ХЕСИНА,
член-корреспондент АН СССР М. Н. МЕЙСЕЛЬ,
действительный член АМН СССР Л. М. ШАБАД

О МЕТАБОЛИЗМЕ БЕНЗ(А)ПИРЕНА МИКРОФЛОРОЙ РАЗЛИЧНЫХ ПОЧВ И ОТДЕЛЬНЫМИ ВИДАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Было показано, что многие микроорганизмы обладают способностью химически видоизменять полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), в частности бенз(а)пирен (БП) — канцерогенный углеводород, широко распространенный в окружающей человека среде. Эти процессы происходят не только при культивировании на лабораторных средах (в опытах на мясопептонном бульоне), но и непосредственно в почве, где процессы метаболизма идут весьма активно (процент окисленного бактериями БП доходит до 85%)⁽¹⁻⁷⁾. Здесь мы ставили перед собой две задачи: 1) выяснить способность собственной микрофлоры почвы Москвы и Московской обл., в разной степени загрязненной ПАУ, разрушать БП; 2) установить, насколько способность метаболизировать ПАУ в условиях почвы распространена у различных видов микроорганизмов и как их активность зависит от микроусловий почвы, в которой они функционируют.

Для решения первой задачи были отобраны пробы почвы с территорий Клязьменского водохранилища (зона отдыха, почва мало загрязнена ПАУ и богата перегноем), больницы Московского областного научно-исследовательского клинического института им. М. Ф. Владимирского (МОНИКИ) (центр Москвы, район старой застройки, относительно большие загрязнения почвы выбросами промышленности и автотранспорта) и нефтеперерабатывающего завода «Нефтегаз» (район сильного и длительного загрязнения почвы продуктами нефтепереработки и ПАУ).

По одному грамму влажной почвы было внесено в 10 мл среды (мясопептонный бульон), в которую был введен БП в концентрации 5 мкг/мл. Культивирование вели на качалке в термостатированном помещении (29°) в течение шести суток, после чего проводили экстракцию БП *n*-октаном в отношении 4:1 на качалке в течение суток. Параллельно ставили контрольные опыты (среда + почва с нулевым сроком культивирования). Количество БП в октановом экстракте определяли спектрально-флуоресцентным методом по квазилинейчатым спектрам люминесценции (эффект Шпольского)⁽⁸⁾ в *n*-октане при температуре кипения жидкого азота (77° К). Однако, если в наших предыдущих экспериментах мы использовали метод добавок⁽⁸⁾, то в настоящей работе наряду с ним был применен метод внутреннего стандарта⁽¹⁰⁾. В качестве стандарта был использован 1,12-бензперилен в концентрации в 10 раз выше, чем БП. Измерялось отношение интенсивности линии БП (403,0 мμ) к линии стандарта (419,5 мμ), и по заранее составленному графику определялась концентрация БП в растворе. Этот метод ускорял проведение анализов. Хотя область применения метода внутреннего стандарта без предварительного хроматографирования более ограничена, чем при методе добавок, однако специальное исследование показало, что в данном эксперименте применение этого метода допустимо; расхождение результатов при измерении обоими методами не превышало ±5%, т. е. укладывалось в ошибку эксперимента.

Каждый опыт имел три повторности. Результаты исследования (средние значения) приведены в табл. 1. Специальное исследование показало, что внесение одного грамма почвы не влияет (в пределах ошибки измерения ±5%) на концентрацию БП в культуральной среде (для всех опытов

она оказалась равной заданной в мясопептонном бульоне 5 $\mu\text{г/мл}$). Из табл. 1 следует, что микроорганизмы каждой почвы за время культиви-

Таблица 1
Разрушение бенз(а)пирена собственной микрофлорой различных почв

Место отбора почвы	Исходное количество БП, $\mu\text{г/мл}$	Количество БП после 5 суток культивирования, $\mu\text{г/мл}$	Дефицит БП, %
Территория Клязьменского водохранилища	5	4	20
Территория больницы МОНИКИ	5	3	40
Территория завода «Нефтегаз»	5	3	40

рования разрушали значительное количество БП (от 20 до 40%). Наименее активной оказалась микрофлора почвы, отобранной с Клязьменского водохранилища, т. е. наименее загрязненной ПАУ.

Микробиологический анализ исследованных почв показал, что наиболее богато представлена микрофлора почвы Клязьменского водохранилища. Из этой почвы нам удалось выделить около 30 различ-

ных видов бактерий и 10 различных видов грибов. В то же время в почвах, взятых с территорий больницы МОНИКИ и нефтеперерабатывающего завода, было выделено от 15 до 20 различных видов бактерий и от 2 до 5 видов грибов. Несмотря на большое видовое разнообразие микроорганизмов клязьменская микрофлора оказалась менее активной в отношении БП.

Решение второй задачи осуществляли следующим образом: 10-граммовую навеску сухой почвы (те же образцы) подвергали предварительной стерилизации, после чего в нее вносили суспензию микроорганизмов в мясопептонном бульоне. В опыт были взяты три вида бактерий — *Vac. sphaericus*, выделенная нами из почвы с территории завода «Нефтегаз», *Vac. megaterium mutilate* и *Pseudomonas-146*. Все эти культуры проявили ранее способность достаточно активно метаболизировать ПАУ, и в частности БП (1-6). Каждый опыт повторяли троекратно. Контролем служила 10-граммовая навеска стерилизованной почвы, в которую не вносились микроорганизмы. Экстракция БП из почвы производилась в аппарате Сокслета горячим перегнанным бензолом (200—300 мл) в течение 6 час. Экстракт подвергался спектрально-флуоресцентному количественному анализу. Результаты исследования приведены в табл. 2. Так как в связи с неоднородностью почвы каждая навеска могла существенно отличаться от другой по содержанию БП в табл. 2 нами приведены значения вариации.

Проведенный эксперимент показал, что все взятые нами в опыт культуры микроорганизмов активно метаболизируют БП во всех исследованных образцах почвы (70—85% от исходного количества за довольно короткий срок при 10-суточном культивировании). Разрушение БП в почве идет значительно более активно, чем при культивировании на лабораторных средах. Сопоставление с результатами ранее проведенного длительного вегетационного опыта (7) показало, что отобранные отдельные, наиболее активные, штаммы способны окислять ПАУ в почве быстрее, и с большей эффективностью, чем собственная микрофлора почвы в целом (3-5). Результаты проведенного эксперимента оказались очень близкими к результатам опытов, проведенных ранее с культурой *Vac. sphaericus* на почве, отобранной с территории нефтеперерабатывающего завода (2-5). Во всех наших исследованиях, проведенных с большими интервалами во времени, процент метаболизированного БП в почве завода «Нефтегаз» был одинаковым (70—80%), хотя исходное содержание БП в почвах сильно различалось (20 и 130 мг/кг в предыдущих опытах (8) и 1 мг/кг в настоящем эксперименте). Этот результат подтверждает ранее обнаруженную нами закономерность о независимости относительной метаболизирующей активности культуры от концентрации ПАУ в среде в широком диапазоне концентраций. Несмотря на то, что абсолютные количества БП в

Таблица 2

Разрушение бенз(а)пирена в почвах некоторыми микроорганизмами

	Исходное количество БП в 10 г почвы, $\mu\text{г}$	Количество БП в 10 г почвы после 5-суточного культивирования, $\mu\text{г}$	Дефицит БП, %
Территория Клязьменского водохранилища			
<i>Bac. sphaericus</i>		$0,007 \pm 0,0005$	48
<i>Bac. megaterium mutilate</i>	$0,0135 \pm 0,0015$	$0,0055 \pm 0,0015$	59
<i>Pseudomonas-146</i>		$0,006 \pm 0,0001$	55
Территория больницы МОНИКИ			
<i>Bac. sphaericus</i>		$0,9 \pm 0,2$	82
<i>Bac. megaterium mutilate</i>	$5,15 \pm 0,55$	$1,3 \pm 0,1$	75
<i>Pseudomonas-146</i>		$0,7 \pm 0,1$	86
Территория завода «Нефтегаз»			
<i>Bac. sphaericus</i>		$2,4 \pm 1,0$	76
<i>Bac. megaterium mutilate</i>	$10,0 \pm 2,0$	$2,0 \pm 1,0$	80
<i>Pseudomonas-146</i>		$2,0 \pm 1,2$	80

почве с территории Клязьменского водохранилища ниже, чем в двух других пробах (территория МОНИКИ и завода «Нефтегаз»), относительные количества метаболизированного БП также оказались значительно более низкими. Этот результат нельзя объяснить только различием видового состава собственной микрофлоры, так как на всех почвах функционировали одни и те же культуры микроорганизмов. По-видимому, в условиях почвы, содержащей большие количества ароматических соединений, создаются более выгодные условия для усиления процессов метаболизма, однако механизм этого явления (возможно, индукция) подлежит выяснению.

Нашими предыдущими и настоящими исследованиями показано, что бактериальные организмы с большей или меньшей способностью способны метаболизировать ПАУ в культуральной среде. Эта способность значительно усиливается при приближении культивирования к естественным условиям. В тех случаях, когда культуральной средой является почва, количество метаболизированного БП доходит до 85%, в то время как на лабораторных средах не превышает 40% даже для наиболее активных из исследованных нами культур. Эти процессы более интенсивно идут в природе с помощью собственной почвенной микрофлоры, при этом процент разрушения одними и теми же культурами наиболее высокий в почвах, загрязненных в значительных количествах ПАУ.

Отдельные виды бактерий, отобранные нами как наиболее активные, проявляют более высокую способность к метаболизму при развитии этих культур на стерильной почве, чем естественная микрофлора почвы в целом.

Институт микробиологии Академии наук СССР

Поступило

Институт экспериментальной и клинической онкологии
Академии медицинских наук СССР

16 II 1971

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. Б. Петрикевич, Г. Е. Данильцева, М. Н. Мейсель, ДАН, 59, № 2 (1964). ² М. Н. Поглазова, Г. Е. Федосеева и др., ДАН, 169, № 5, 1174 (1966). ³ М. Н. Поглазова, Г. Е. Федосеева и др., ДАН, 176, № 5, 1165 (1967). ⁴ М. Н. Поглазова, Г. Е. Федосеева и др., ДАН, 179, № 6, 1460 (1968). ⁵ Г. Е. Федосеева, А. Я. Хесина и др., ДАН, 183, № 1, 208 (1968). ⁶ А. Я. Хесина, Н. П. Щербак и др., Бюлл. эксп. биол. и мед., 10, 70 (1968). ⁷ Г. Е. Федосеева, А. Я. Хесина, Журн. прикл. спектроскоп., 9, 2, 282 (1968). ⁸ Э. В. Шпольский, А. А. Ильина, Л. А. Климова, ДАН, 87, 935 (1952). ⁹ Р. И. Персонов, ЖАХ, 17, 506 (1962).