



Научная статья

УДК 579.63

DOI: 10.52957/2782-1900-2024-5-4-43-50

ОЦЕНКА БИОДЕСТРУКЦИИ АРОМАТИЧЕСКИХ НИТРОСОЕДИНЕНИЙ И ФЕНОЛА В ПРОМЫШЛЕННЫХ СТОКАХ МИКРОМИЦЕТАМИ

П. Н. Бондарь

Полина Николаевна Бондарь, кандидат биологических наук, доцент

Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика М.Ф. Решетнева, Красноярск, Россия
polina8484@mail.ru

Ключевые слова: биодеструкция, ароматические нитросоединения, фенолы, грибы рода *Trichoderma*, сточные воды, утилизация, культивирование

Аннотация. В работе проанализированы результаты эксперимента микробиологической утилизации моонитротолуола и фенола в концентрациях 20, 50 и 70 мг/л штаммами грибов рода *Trichoderma*. Выявлено, что все исследуемые штаммы способны расти в присутствии моонитротолуола в качестве единственного источника азотного питания и фенола в качестве единственного источника углерода и энергии, но обладают различной чувствительностью к изменению их концентрации среде. Установлено, что исследуемые штаммы способны подвергать деструкции моонитротолуол и фенол в жидкой среде. Максимальная эффективность биодеструкции моонитротолуола составила 66% с применением штамма *Trichoderma koningii* «ТСЛ-06», фенола – 95% с применением штамма *Trichoderma harzianum* «М99/5». На основании результатов отобраны перспективные штаммы для биодеструкции моонитротолуола и фенола при поверхностном и глубинном методах культивирования, а также в целях создания биопрепарата на основе грибов рода *Trichoderma* в иммерсионной биотехнологической системе.

Для цитирования:

Бондарь П.Н. Оценка биодеструкции ароматических нитросоединений и фенола в промышленных стоках микромицетами // От химии к технологии шаг за шагом. 2024. Т. 5, вып. 4. С. 43-50
URL: <https://chemintech.ru/ru/nauka/issue/5563/view>

Введение

Ароматические соединения в настоящее время продолжают занимать определяющее место в химической промышленности. Объем производства этих соединений составляет до нескольких тысяч тонн в год [1].

Ароматические моонитросоединения широко используются в различных отраслях химической промышленности, но главным образом в производстве аминов. Высокая реакционная способность ароматических нитросоединений и аминов позволяет применять их не только для синтеза синтетических красителей, но и в



производстве полиуретанов, ускорителей вулканизации, антиоксидантов для резинотехнических изделий, химических средств защиты растений, фармацевтических препаратов и т.д. Некоторые ароматические нитросоединения используются как душистые вещества [2].

Очистку сточных вод, содержащих, в том числе моонитротолуолы, осуществляют, как правило, двумя методами: химическим и адсорбционным. Химический метод включает восстановление нитрогруппы железными стружками в среде электролита и последующую нейтрализацию кислоты известью. Для разрушения образующихся при этом аминов необходима биологическая очистка. Адсорбционный метод активированным углем позволяет очистить сточные воды, содержащие моонитротолуол до 500 мг/л, до концентрации его 30 мг/л. В процессе адсорбции возникает необходимость нейтрализации кислот известью и десорбции отработавшего угля. Концентрация МНТ в сточных водах, приводящая к гибели рыбы в водоемах, составляет 15-20 мг/л [1, 2]. В связи с этим деградация нитроароматических соединений является актуальной проблемой.

Фенол и его производные активно используются практически во всех областях промышленности: в производстве лаков и красок, синтетических смол, пластификаторов, поверхностно-активных и дубильных веществ, ядохимикатов, стабилизаторов и антисептиков. Вследствие интенсивного использования фенолов фенольные соединения постоянно присутствуют в сточных водах многих предприятий химического профиля, а также коксо- и нефтехимии, целлюлозной и деревообрабатывающей промышленности [4, 5].

Мировое производство фенольных соединений составляет около 50000 т/год. По характеру действия фенол относится к токсическим соединениям. Предельно допустимая концентрация (ПДК) фенола в воде составляет 0,001 мг/л [6].

В настоящий момент наиболее успешная стратегия борьбы с загрязнениями – использование способности живых организмов осуществлять ассимиляцию и разложение ксенобиотиков [7].

В качестве перспективного способа утилизации таких ароматических соединений как моонитротолуол и фенол в сточных водах признан метод биологической деструкции при помощи высокоэффективных штаммов микроорганизмов-деструкторов. Преимущество использования биологических методов деструкции состоит в том, что микроорганизмы обезвреживают токсичные вещества, не оказывая отрицательного влияния на экосистему и не вызывают появления новых загрязняющих агентов в окружающей среде.

Большинство описанных в литературе микроорганизмов-деструкторов ароматических соединений относятся к различным штаммам бактерий, однако широкое применение грибов рода *Trichoderma* в составе как активного ила, так и биопленки, а также их способность утилизировать широкий набор углеродных субстратов, технологичность, сравнительно высокая скорость роста и низкая токсичность в отношении растений и животных, предполагают возможность использования данных микроорганизмов для биодеструкции ароматических соединений [8-12]. Во многих работах было показано, что грибы рода *Trichoderma* могут быть весьма устойчивы к токсичным промышленным загрязнениям окружающей среды, а также способны



совместно с другими штаммами-деструкторами в виде консорциума повышать эффективность биоразложения ксенобиотиков [13-15].

В работе И.П. Соляниковой [16] с соавторами показана способность штаммов-деструкторов различных ароматических соединений утилизировать нитротолуол в концентрации до 70 мг/л. Данная максимальная концентрация была принята и в настоящей работе.

Целью работы является исследование влияния различных концентраций моонитротолуола и фенола на рост грибов рода *Trichoderma* и подбор активных штаммов для биологической деструкции данных токсикантов при поверхностном и глубинном культивировании.

Экспериментальная часть

Для проведения исследований были отобраны 5 моноспоровых штаммов грибов рода *Trichoderma*, выделенных из почв различных лесорастительных зон Средней Сибири и Республики Тыва, обладающих стабильными культурально-морфологическими признаками и проявившими внеклеточную фенолоксидазную активность: *Trichoderma asperellum* «Mg-6», *Trichoderma asperellum* «ТН-11», *Trichoderma harzianum* «М99/5», *Trichoderma koningii* «ТСГ», *Trichoderma koningii* «ТСЛ-06».

В качестве исследуемых объектов использовали сточные воды, содержащие моонитротолуол и фенол в концентрациях 20, 50 и 70 мг/л.

Для исследования влияния моонитротолуола и фенола использовалась питательная среда Чапека следующего состава, (г/л): глюкоза – 30,0; NaNO_3 – 2,0; MgSO_4 – 0,5; KCl – 0,5; K_2HPO_4 – 1,0; FeSO_4 – 0,01; агар – 20,0, содержащая моонитротолуол в концентрациях 20, 50 и 70 мг/л вместо азотсодержащего соединения, либо содержащая фенол в концентрациях 20, 50 и 70 мг/л вместо глюкозы. Среду автоклавировали при 0,5 атм. в течение 30 минут. Культивирование осуществляли в термостате при 25–27°C. В качестве контроля использовали культуру, выращенную на среде Чапека без добавления моонитротолуола и фенола.

Концентрацию моонитротолуола в среде до и после культивирования определяли хроматографическим методом с помощью жидкостного хроматографа «Миличром-2» [1].

Концентрацию фенола до и после культивирования проводили фотометрическим методом [17]. Метод основан на образовании оранжево-желтого комплекса фенола с пара-нитроанилином в щелочной среде. Аликвотную часть анализируемой сточной воды объемом, не превышающим 5 мл, переносили в колбу вместимостью 25 мл, добавляли 1 мл диазотированного раствора пара-нитроанилина и доводили до метки поглотительным раствором (натрий углекислый, раствор 8 г/л). Диазотированный пара-нитроанилин готовился следующим образом: навеску 0,01 г паранитроанилина растворяют в смеси 10 мл дистиллированной воды и 2,5 мл соляной кислоты. К образовавшемуся раствору прибавляют 2,5 мл раствора натрия азотистокислого и через несколько минут раствор разбавляют водой до 50 мл. Раствор готовят в день проведения анализа. Оптическую плотность определяли при длине волны $\lambda = 440$ нм в кювете с рабочей длиной $\lambda = 20$ мм, относительно холостой пробы. Все исследования проводили в трех повторностях.



Основная часть

Грибы рода *Trichoderma* обладают высокой видо- и штаммоспецифичностью, поэтому для разработки основ использования их в целях биодеструкции ароматических соединений необходимо провести скрининг по чувствительности к изменению содержания токсических компонентов в среде [18].

Для первоначальной оценки возможности роста грибов рода *Trichoderma* в присутствии различных концентраций моонитротолуола и фенола использовали поверхностное культивирование. При поверхностном методе культура растет на поверхности твердой увлажненной питательной среды в виде мицелиальной пленки, которая субстратным мицелием всасывает ингредиенты питательной среды, а воздушным мицелием формирует репродуктивные органы. Этот способ культивирования обеспечивает полный цикл развития гриба, но является более медленным процессом из-за интрагифального транспорта питательных веществ от субстратного мицелия к растущим терминальным клеткам воздушного мицелия [19]. Споры гриба наносили уколом в среду петлей в центр чашки Петри. Результаты снимали на 7 сутки.

Проведенные исследования по влиянию моонитротолуола в качестве единственного источника азотного питания на рост штаммов *Trichoderma* в условиях поверхностного культивирования показали, что они обладают различной чувствительностью к изменению его концентрации в среде. Так, при концентрации МНТ в среде 20 мг/л и 50 мг/л наибольшая продуктивность была отмечена у штаммов *Trichoderma asperellum* «М99/5» и *Trichoderma koningii* «ТСГ», а при 70 мг/л – у *Trichoderma koningii* «ТСГ».

Аналогичные результаты были получены и в случае влияния фенола как единственного источника углерода и энергии: при концентрации его в среде 20 мг/л и 50 мг/л наибольшая продуктивность была отмечена у штаммов *Trichoderma asperellum* «М99/5», *Trichoderma koningii* «ТСГ» и *Trichoderma asperellum* «ТН-11», а при 70 мг/л максимальную продуктивность так же показал штамм *Trichoderma koningii* «ТСГ».

При этом высокая концентрация и моонитротолуола, и фенола 70 мг/л ингибировала рост штаммов *Trichoderma harzianum* «Мg-6» и *Trichoderma koningii* «ТСЛ-06». Отрицательное действие высоких концентраций в случае моонитротолуола было оказано еще на рост штамма *Trichoderma asperellum* «ТН-11», в случае фенола – *Trichoderma asperellum* «М99/5».

Для оценки способности штаммов рода *Trichoderma* разлагать моонитротолуол и фенол использовали глубинное культивирование. Глубинный метод культивирования заключается в выращивании микроорганизмов в жидкой питательной среде при периодическом перемешивании, микробные клетки растут во всем объеме жидкой питательной среды и находятся во взвешенном состоянии. Этот способ обеспечивает возможность интенсивного роста мицелия, накопление продуктов обмена и высокий уровень механизации процесса, но не обеспечивает полного цикла развития мицелиальным грибам, и стадия спороношения в этих условиях у фенотипа слабо выражена или совсем не осуществляется [20]. Для этого использовали питательную среду



Чапека, без добавления агара. После стерилизации колбы с жидкой средой остужали и засеивали штаммами с помощью микробиологической петли. Результаты исследований снимали на 14 сутки.

Анализ результатов экспериментальных исследований показал, что все исследуемые штаммы рода *Trichoderma* в разной степени способны подвергать деструкции моонитротолуол и фенол, содержащиеся в среде.

При добавлении в среду МНТ в концентрации 20 мг/л наибольшую степень деградации проявили штаммы *Trichoderma koningii* «ТСГ», *Trichoderma harzianum* «Mg-6», *Trichoderma koningii* «ТСЛ-06», которые снизили его концентрации почти вдвое – на 48%, 47%, 41,5% соответственно.

При концентрации МНТ в среде 50 мг/л наибольшее снижение его концентрации проявили штаммы *Trichoderma asperellum* «ТН-11» на 42%, *Trichoderma koningii* «ТСЛ-06» на 40,6%.

Добавление моонитротолуола в среду в концентрации 70 мг/л показало, что наибольшую степень деградации проявил штамм *Trichoderma koningii* «ТСЛ-06» – концентрация снизилась на 66%. Штаммы *Trichoderma asperellum* «ТН-11» и *Trichoderma koningii* «ТСГ» так же снизили его концентрацию на 47% и 38% соответственно (рис. 1.).

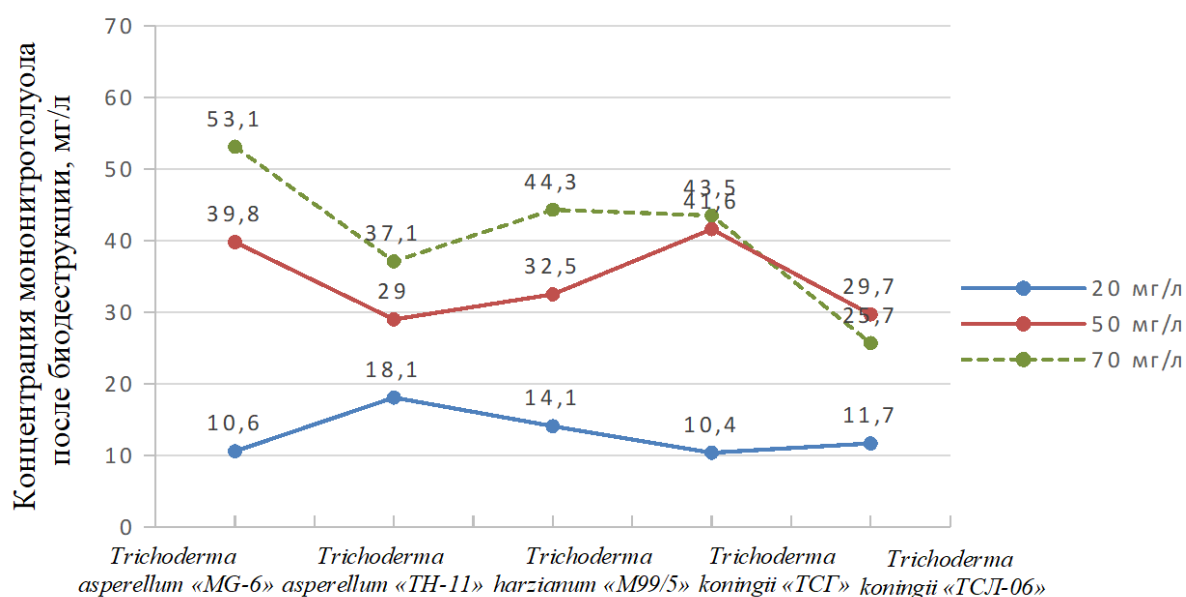


Рис. 1. Результаты биодеструкции моонитротолуола различных концентраций в среде штаммами рода *Trichoderma*

При концентрации фенола в среде 20 мг/л наибольшее снижение его концентрации проявил штамм *Trichoderma harzianum* «M99/5» – концентрация снизилась на 30%. Штаммы *Trichoderma asperellum* «Mg-6» и *Trichoderma koningii* «ТСЛ-06» снизили концентрацию на 17,5 и 15% соответственно, а штаммы *Trichoderma asperellum* «ТН-11» и *Trichoderma koningii* «ТСГ» – менее чем на 9%.

При содержании фенола в среде 50 мг/л характерна наибольшая, по сравнению с другими начальными концентрациями, эффективность биодеструкции. Так, наблюдалось существенное снижение его концентрации штаммом *Trichoderma harzianum* «M99/5»



на 95,5%, штаммы *Trichoderma asperellum* «Mg-6» и *Trichoderma asperellum* «ТН-11» снизили концентрацию на 46,6 и 42% соответственно, штаммы *Trichoderma koningii* «ТСЛ-06» и *Trichoderma koningii* «ТСГ» – на 39%.

При концентрации фенола в среде 70 мг/л штаммы *Trichoderma asperellum* «ТН-11», *Trichoderma asperellum* «Mg-6» и *Trichoderma harzianum* «M99/5» снизили его концентрацию на 17,2; 14,3 и 12,9 % соответственно, штаммы *Trichoderma koningii* «ТСЛ-06» и *Trichoderma koningii* «ТСГ» – на 11,4 % (рис. 2).

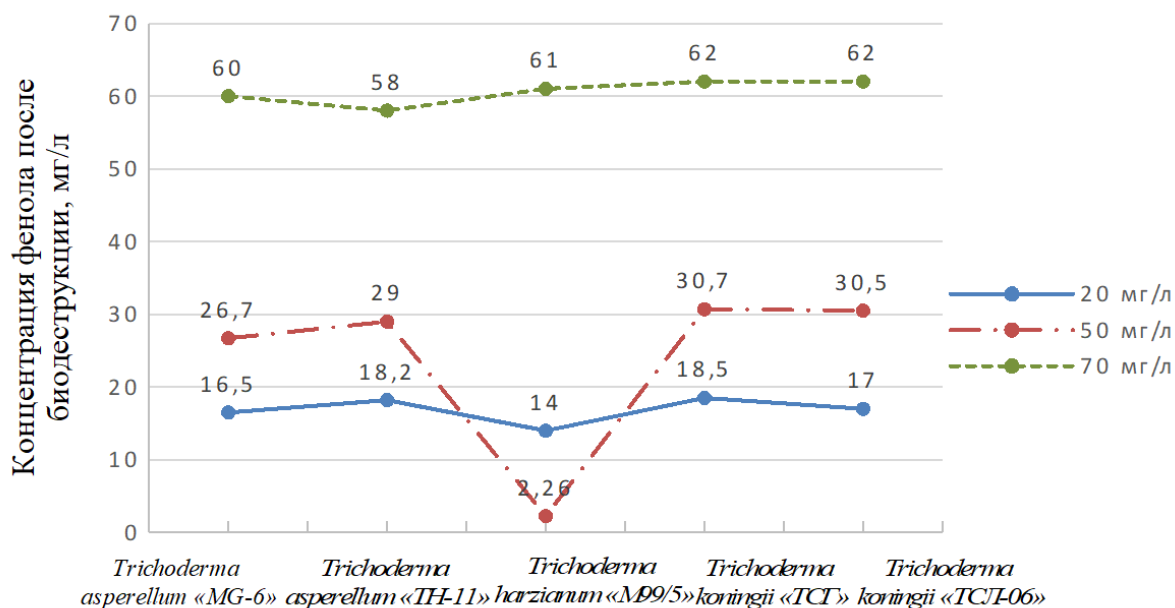


Рис. 2. Результаты биодеструкции фенола различных концентраций в среде штаммами рода *Trichoderma*

Отмечено, что при поверхностном культивировании высокие концентрации ароматических соединений (70 мг/л) оказывали токсическое действие на рост штаммов *Trichoderma harzianum* «Mg-6», *Trichoderma koningii* «ТСЛ-06», *Trichoderma asperellum* «ТН-11» и *Trichoderma asperellum* «M99/5», но при глубинном культивировании, данные штаммы проявили наибольшую деструкцию токсикантов.

Из всех исследуемых микромицетов штамм *Trichoderma koningii* «ТСГ» проявил наибольшую устойчивость к моонитротолуолу и фенолу в среде, снижения его продуктивности в условиях поверхностного культивирования не наблюдалось при всех концентрациях. Данный штамм оказался единственным способным расти и развиваться в присутствии высокой концентрации 70 мг/л исследуемых химических веществ, однако при глубинном культивировании штамм был менее эффективен.

Выводы и рекомендации

По результатам исследований можно сделать вывод, что грибы рода *Trichoderma* способны расти в присутствии таких токсичных промышленных загрязнений, как моонитротолуол и фенол, но обладают различной чувствительностью к изменению их концентрации среде. Наибольшая продуктивность была отмечена при содержании



ксенобиотиков в пределах 20-50 мг/л. Единственным устойчивым к высокому содержанию загрязнителей в среде оказался штамм *Trichoderma koningii* «ТСГ».

В целях очистки сточных вод, содержащих мононитротолуол и фенол, в условиях поверхностного культивирования для загрязнений до 70 мг/л можно рекомендовать штамм *Trichoderma koningii* «ТСГ», до 50 мг/л – штаммы *Trichoderma asperellum* «ТН-11» и *Trichoderma harzianum* «М99/5».

Грибы рода *Trichoderma* способны подвергать деструкции мононитротолуол и фенол в водах. В условиях глубинного культивирования разложение мононитротолуола под действием микромицетов проходило более интенсивно при высокой его концентрации в среде 70 мг/л, максимальная эффективность составила 66% (штамм *Trichoderma koningii* «ТСЛ-06»). Максимальная деструкция фенола была при содержании его 50 мг/л и составила 95% (штамм *Trichoderma harzianum* «М99/5»).

В целях создания биопрепарата на основе микромицетов для очистки промышленных стоков от мононитротолуола при совмещении поверхностного и глубинного принципов культивирования в одной иммерсионной биотехнологической системе можно рекомендовать штаммы *Trichoderma koningii* «ТСГ» и *Trichoderma koningii* «ТСЛ-06»; для очистки фенольных вод – *Trichoderma koningii* «ТСГ» и *Trichoderma harzianum* «М99/5».

Список источников

1. **Збарский В. Л., Жилин В. Ф.** Толуол и его нитропроизводные. 2-е изд., перераб. и существ. доп. - М.: URSS, 2019. 344 с.
2. **Сугак Н. Ю.** Способы уничтожения взрывчатых материалов. Химическое разложение взрывчатых веществ в кислотной и щелочной средах: учебное пособие. Бийск: Изд-во Алт. гос. тех. ун-та. 2007. 63 с.
3. **Путис С. М., Илюшин М. А.** Химическая технология энергонасыщенных веществ. Нитрование ароматических углеводородов: учебное пособие для вузов. Санкт Петербург: Лань. 2022. 92 с.
4. **Коробов В. В., Жарикова Н. В., Анисимова Л. Г., Ясаков Т. Р., Журенко, Е. Ю., Кусова И. В., Мркушева Т. В.** *Bacillus subtilis* В-1742Д – деструктор фенола и 2,4-дихлорфенола // *Известия уфимского научного центра РАН. Биология, биохимия и генетика*. 2011. № 3-4. С. 52-56. URL: http://journal.ufaras.ru/wp-content/uploads/2022/02/izvestiya_3-4_2011.pdf (дата обращения 08.09.2024).
5. **Maukonen J.** Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review // *J. Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2003. V. 52, 1. 6. P. 327–356.
6. **Носулич В. Е., Быков А. Г., Кувичкина Т. Н., Макаренко А. А., Решетилов А. Н.** Микроорганизмы с фенолодеградирующими свойствами из очистных сооружений // *Известия ТулГУ. Естественные науки*. 2018. Вып. 3, С. 98-103. URL: https://tidings.tsu.tula.ru/tidings/index.php?id=search_a (дата обращения 08.09.2024).
7. **Хасаева Ф. М.** Аспекты микробных технологий применительно к охране объектов окружающей среды. В кн: Социально-экономические и экологические аспекты развития Прикаспийского региона // *Материалы Международной научно-практической конференции*. Нальчик. 2019. С. 582-585.
8. **Коробов В. В., Журенко Е. Ю., Жарикова Н. В., Ясаков Т. Р.** Очистка фенолсодержащих сточных вод с применением штамма *Serratia marcescens* МТ9 // *Экология и промышленность России*. 2022. Т. 26. № 2. С. 39-43. DOI: <https://doi.org/10.18412/1816-0395-2022-2-39-43>
9. **Хиляс В. И. Сафиуллина Л. Ф., Родионов А. А., Зиганшин А. М.** Биодegradация 2,4,6 – тринитротолуола гемиаскомицетными дрожжами в условиях непрерывного режима культивирования // *Ученые записки Казанского университета. Естественные науки*. 2010. Т. 152, кн. 4. 179-189 с. URL: https://kpfu.ru/portal/docs/F_1622022005/152_4_est_16.pdf (дата обращения 01.09.2024).



10. **Kulkarni M., Chaudhari A.** Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: An overview // *J. Environmental Management*. 2007. Vol.85 (2). P. 496-512.
11. **Marvin-Sikkema F. D., de Bont J. A. M.** Degradation of nitroaromatic compounds by microorganisms // *Applied Microbiology and Biotechnol.* 1994. Vol. 42. P. 499–507.
12. **Zhang M., Liu G.-h., Song K.** [et al.] Biological treatment of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) red water by immobilized anaerobic–aerobic microbial filters // *Chem. Eng. J.* 2015. Vol. 259. P. 876–884.
13. **Самарская Ю.В., Абдрахманова А.С.** Применение консорциума бактерий и грибов при очистке сточных вод нефтеперерабатывающего комплекса // *VII Международная научно-практическая конференция «Безопасность городской среды»*. Омск. 2019. С. 36-40.
14. **Кособринова С.А., Янукевич А.А., Шулькин Л.Л.** Биоремедиация загрязненных водных сред, проблематика и состояние вопроса // *Актуальные проблемы науки и техники*. 2020. С. 16-22.
15. **Жарикова Н. В., Галимзянова Н. Ф., Журенко Е. Ю., Ясаков Т. Р., Коробов В. В., Сагитова А. И., Маркушева Т. В.** Анализ взаимоотношений бактериальных штаммов-деструкторов ксенобиотиков и микромицетов рода *Trichoderma* // *Известия уфимского научного центра РАН. Биология, биохимия и генетика*. 2014. № 1. С. 72-75. URL: http://journal.ufaras.ru/wp-content/uploads/2022/01/izvestiya_1_2014.pdf (дата обращения 08.08.2024).
16. **Соляникова И. П., Баскунов Б. П., Бабошин М. А., Саралов А. И., Головлёва Л. А.** Детоксикация бактериями тринитротолуола в высоких концентрациях // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2012. Т. 48. № 1. С. 27-34. URL: https://www.fbras.ru/wp-content/uploads/2017/07/48_n1_annotation.pdf (дата обращения 08.08.2024).
17. **Большова, Т.А.,** Брыкина Г. Д., Гармаш А. В.; под ред. Ю.А. Золотова. Основы аналитической химии: учеб. для вузов, в 2 кн. – М.: Высш. шк. 2002.
18. **Садыкова В.С.** Экология грибов *Trichoderma* (Pers: Fr) бассейна реки Енисей, их биологические свойства и практическое применение: автореф. дис. доктора биол. наук. 03.02.12. М. 2012. 46 с.
19. **Pérez-Guerra, N. A. Torrado-Agrasar, C. López-Macias and L. Pastrana.** Main characteristics and applications of solid substrate fermentation // *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 2003. Vol. 2. No 3. P. 343–350.
20. **Verma M. Satinder K. Brar, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli, J.R. Valero.** Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control // *Biochemical Engineering Journal*. 2007. Vol. 37. P. 1–20.

Поступила в редакцию 05.09.2024

Одобрена после рецензирования 19.09.2024

Принята к опубликованию 23.09.2024