

ПРОТАТРАНЫ – СИНТЕТИЧЕСКИЕ БИОСТИМУЛЯТОРЫ РОСТА МИКРООРГАНИЗМА-НЕФТЕДЕСТРУКТОРА *RHODOCOCCUS SP.*

А.Л. Турская¹, Ю.А. Маркова¹, С.Н. Адамович², И.А. Ушаков², Е.Н. Оборина²,
М.С. Третьякова¹, Л.А. Беловежец²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *turskaya-anna@mail.ru*

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *mir@irioch.irk.ru*

Аннотация. Синтезирован ряд биологически активных арилхалькогенилацетатов трис(2-гидроксиэтил)-аммония – "протатранов" общей формулы $ArYCH_2CO_2^- \cdot HN^+(CH_2CH_2OH)_3$ (**A**), где Ar = арил; Y = O (**1**), S (**2**), SO₂(**3**). В присутствии протатрана 4-Cl-C₆H₄SO₂CH₂CO₂⁻HN⁺(CH₂CH₂OH)₃ (**3**) изучена динамика роста нефтеокисляющего микроорганизма *Rhodococcus sp.* Показано увеличение скорости роста (до 10 раз) бактериальных клеток. Сделан вывод о возможном использовании протатранов в технологии создания эффективного биопрепарата для ремедиации почв нефтезагрязненных территорий.

Ключевые слова: нефтедеструкторы, протатраны, биостимуляторы роста, *Rhodococcus sp.*, биоремедиация

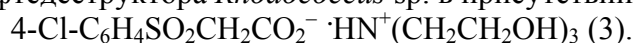
DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1397-1400

Для ускорения биодеструкции нефтяных загрязнений углеводородокисляющими микроорганизмами применяются различные стимулирующие препараты, такие как минеральные удобрения [Пунтус и др., 2015], органические удобрения [Марченко, 2011], а также поверхностно-активные вещества – сурфактанты [Hamdi et al., 2007; Каурри et al., 2011; Suja et al., 2014]. Вместе с тем, в состав ни одного из созданных и запатентованных препаратов, предназначенных для биоремедиации, не входят синтетические биостимуляторы.

В Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского реакцией биогенных гидроксиэтиламинов (триэаноламина) с биологически активными гет(арил)-халькогенилукусусными кислотами синтезирован широкий ряд химических соединений – «протатранов» (**A**), общей формулы $ArYCH_2CO_2^- \cdot HN^+(CH_2CH_2OH)_3$, где Ar=гет(арил); Y=O, S, SO, SO₂, Se.

Соединения **A** представляют собой порошки или ионные жидкости, устойчивые при хранении и хорошо растворимые в воде, спирте и других органических растворителях [Adamovich et al., 2017, 2018; Mirskova et al., 2014, 2015; Ushakov et al., 2016]. Среди протатранов **A** выявлены нетоксичные (LD₅₀ = 1300–6000 мг/кг) вещества, с антиоксидантным, иммуностропным, антиаллергенным, противораковым, анти-метастатическим, защитным, рост- и ферментстимулирующим действием. На основе протатранов и их аналогов разработаны эффективные биостимуляторы роста и развития таких микроорганизмов, как *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella typhi spermophil*, *E. coli.*, что сокращает время диагностики опасных заболеваний [Mirskova et al., 2014, 2015; Мирскова и др., 2016; Adamovich et al., 2017, 2018].

Целью данного исследования стало изучение динамики роста микроорганизма-нефтедеструктора *Rhodococcus sp.* в присутствии протатранов из ряда (**A**):



Используемый штамм *Rhodococcus* sp. был выделен из ризосферы пырея ползучего (*Elytrigia repens*) на нефтезагрязненной территории Заларинского района Иркутской области. Рядом экспериментов установлена высокая нефтеразлагающая активность этого микроорганизма за счет синтеза биосурфактантов [Третьякова и др., 2017; Беловежец и др., 2017].

Для изучения скорости роста *Rhodococcus* sp. бактерии культивировали 2 суток при 26 °С на ГМФ-агаре («НИЦФ», С.-Петербург), затем делали смыв культуры в жидкую питательную среду – забуференный физиологический раствор (ЗФР) с добавлением 20 г/л глюкозы, рН 7,0. В опытные образцы добавляли раствор биостимулятора роста, в частности (3), в конечной концентрации 1, 10, 100 мг/л. Динамику роста культуры оценивали по изменению оптической плотности бактериальной суспензии с использованием микропланшетного фотометра при длине волны 595 нм («BioRad», США), а также методом прямого посева на ГМФ-агар с последующим подсчетом выросших колоний. Оценку достоверности различий полученных значений проводили с помощью критерия Манна-Уитни при уровне значимости $p \leq 0,05$ [Балдин, 2012].

Из всех исследованных концентраций протатрана наиболее стимулирующее действие на рост *Rhodococcus* sp. оказала концентрация 10 мг/л (рисунок). Уже с первых часов культивирования показатели оптической плотности были выше по сравнению с контролем.

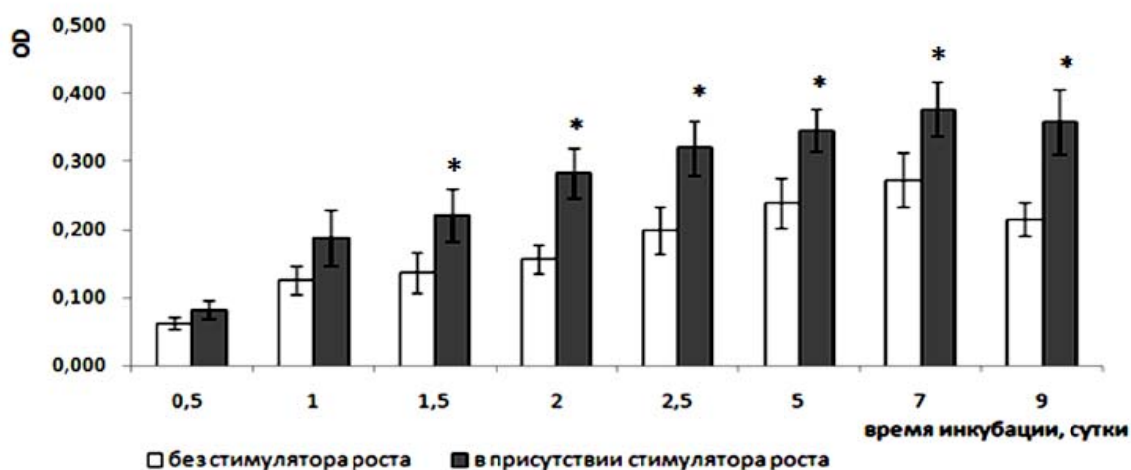


Рисунок. Динамика роста культуры *Rhodococcus* sp. в жидкой питательной среде с добавлением стимулятора роста (3) - 10 мг/л, оцениваемая по изменению оптической плотности суспензии. **Примечание:** звездочкой показаны достоверные различия показателя от контрольного (без стимулятора роста 3) при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Тот же эффект подтвердился методом прямого посева исследуемых образцов бактериальных суспензий на ГМФ-агар. На вторые сутки культивирования количество выросших колоний было практически вдвое больше по сравнению с контрольным вариантом (без добавления протатрана 3) (таблица). Через 5 суток культивирования разница в количестве выросших колоний в отсутствие стимулятора 3 (10^5 КОЕ/мл) и при добавлении стимулятора 3 (10^6 КОЕ/мл) составила 10 раз.

Таблица.

Динамика роста культуры *Rhodococcus* sp., оцениваемая методом прямого посева бактериальной суспензии на твердую питательную среду

Время, инкубации, сут	Без стимулятора роста (3), КОЕ/мл	В присутствии стимулятора роста (3), КОЕ/мл
2	$2,8 * 10^3 \pm 13$	$5,4 * 10^3 \pm 16$
3	$1,2 * 10^4 \pm 21$	$8,9 * 10^4 \pm 36$
5	$3,4 * 10^5 \pm 46$	$2,9 * 10^6 \pm 63$
7	$6,1 * 10^5 \pm 54$	$5,3 * 10^6 \pm 68$

Полученные результаты позволяют предположить, что синтезированные протатраны, в частности (3), могут применяться в качестве эффективных биостимуляторов для наращивания биомассы (до 10 раз) *Rhodococcus* sp. в технологии создания микробных биопрепаратов с целью ремедиации почв нефтезагрязненных территорий.

Литература

Балдин К.В. Общая теория статистики: Учебное пособие. – М.: Дашков и К, 2012. – 312 с.

Беловежец Л.А., Макарова Л.Е., Третьякова М.С., Маркова Ю.А., Дударева Л.В., Семенова Н.В. Возможные пути деструкции полиароматических углеводородов нефти некоторыми видами бактерий-нефтедеструкторов, выделенными из эндо- и ризосферы растений // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53. – № 1. – С. 76–81.

Марченко М.Ю. Биоремедиация нефтезагрязненных почв // Башкирский химический журнал. – 2011. – Т. 18, № 4. – С. 191–197.

Мирскова А.Н., Адамович С.Н., Мирсков Р.Ф. Протатраны – эффективные биостимуляторы для сельского хозяйства, биотехнологии и микробиологии // Химия в интересах устойчивого развития. – 2016. – Т. 24. – № 6. – С. 713–729.

Пунтус И.Ф., Рязанова Л.П., Звонарев А.Н., Фунтикова Т.В., Кулаковская Т.В. Роль минеральных фосфорных соединений в процессе биodeградации нафталина бактериями *Pseudomonas putida* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51, № 2. – С. 198–205.

Третьякова М.С., Беловежец Л.А., Маркова Ю.А., Макарова Л.Е. Углеводородокисляющие микроорганизмы, выделенные из эндо- и ризосферы растений // Актуальная биотехнология. – 2017. – № 2 (21). – С. 134–135.

Adamovich S.N., Mirskova A.N., Kolesnikova O.P. Antitumor agent. – 2017. – Patent RU 2623034.

Adamovich S.N., Mirskova A.N., Mirskov R.G. Method for obtaining of 1-R-indole-3-yl-sulfanylacetates of (2-hydroxyethyl) ammonium. – 2018. – Patent RU 2642778.

Adamovich S.N., Ushakov I.A., Vashchenko A.V. Novel guanidinium salts of biologically active (het)arylchalcogenylacetic acids // Mendeleev Comm. – 2017. – V. 27. – P. 88–89.

Hamdi H., Benzarti S., Manusadžianas L., Aoyama I., Jedidi N. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions // Soil Biology and Biochemistry. – 2007. – V. 39, No. 8. – P. 1926–1935.

Kauppi S., Sinkkonen A., Romantschuk M. Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: comparison of biostimulation and bioaugmentation // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2011. – V. 65, No. 2. – P. 359–368.

Mirskova A.N., Adamovich S.N., Mirskov R.G., Kolesnikova O.P., Schilde U. Immunoactive ionic liquids based on 2-hydroxyethylamines and 1-R-indol-3-ylsulfanylacetic

acids. Crystal and molecular structure of immunodepressant tris-(2-hydroxyethyl) ammonium indol-3-yl-sulfanylacetate // *Open Chem.* – 2015. – V. 13. – P. 149–155.

Mirskova A.N., Adamovich S.N., Mirskov R.G., Voronkov M.G. Pharmacologically active salts and ionic liquids based on 2-hydroxyethylamines, arylchalcogenylacetic acids, and essential metals // *Russ. Chem. Bull.* – 2014. – V. 63. – P. 1869–1883.

Suja F., Rahim F., Taha M.R., Hambali N., Razali M.R., Khalid A. Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations// *International Biodeterioration & Biodegradation.* – 2014. – V. 90. – P. 115–122.

Ushakov I.A., Voronov V.K., Adamovich S.N., Mirskov R.G., Mirskova A.N. The NMR study of biologically active metallated alkanol ammonium ionic liquids // *J Mol. Struct.* – 2016. – V. 1103. – P. 125–131.

PROTATHRANES – SYNTHETIC GROWTH BIOSTIMULATORS OF MICROORGANISM-OIL DESTRUCTOR *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS*

A.L. Turskaya¹, Yu.A. Markova¹, S.N. Adamovich², I.A. Ushakov², E.N. Oborina², M.S. Tretyakova¹, L.A. Belovezhets²

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, turskaya-anna@mail.ru

²A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, mir@irioch.irk.ru

Abstract. A number of biologically active arylchalcogenylacetates of tris (2-hydroxyethyl) - ammonium – "protatrans" of the general formula $\text{ArYCH}_2\text{CO}_2^-$ was synthesized. $\text{HN}^+(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$ (A), where Ar=aryl; Y=O (1), S (2), SO_2 (3). In the presence of protatran 4-Cl-C₆H₄SO₂CH₂CO₂⁻. $\text{HN}^+(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$ (3) studied the growth dynamics of the oil-oxidizing microorganism *Rhodococcus* sp. An increase in the growth rate (up to 10 times) of bacterial cells is shown. A conclusion is made about the possible use of protatrans in the technology of creating an effective biopreparation for the remediation of soils in oil-polluted areas.

Keywords: oil destructors, protatrans, growth stimulators, *Rhodococcus* sp., bioremediation