



# ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



## ОЦЕНКА ДЕГРАДАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ ХЛОПРОИЗВОДНЫХ ФЕНОЛА ПРОМЫШЛЕННЫХ ЭКОТОПОВ Г. УФЫ

**Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В.\*,  
Ясаков Т.Р., Коробов В.В.**

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального  
исследовательского центра РАН, Уфа (Россия)

\*E-mail: [puzzle111@yandex.ru](mailto:puzzle111@yandex.ru)

Исследована способность восьми природных изолятов двух экотопов раздельно использовать 2,5-дихлорфенол (2,5-ДХФ) и 2,4,6-трихлорфенол (2,4,6-ТХФ) в качестве единственного источника углерода и энергии. Так как из восьми штаммов пять использовали 2,4,6-ТХФ и только один – 2,5-ДХФ, вероятно большее значение в плане токсичности субстрата имеет положение хлор-заместителя в 5-ой позиции, а не общее его количество. Ни один из исследованных штаммов не оказал антагонистического влияния на другие культуры, что говорит о возможности их совместного применения в технологиях ремедиации окружающей среды от загрязнителей хлорароматической природы.

*Ключевые слова:* 2,5-дихлорфенол ♦ 2,4,6-трихлорфенол ♦ бактерии-деструкторы биodeградация ♦ антагонизм

## ESTIMATION OF DEGRADATION POTENTIAL OF THE BACTERIAL DEGRADERS OF CHLORINE DERIVATIVES OF PHENOL OF THE INDUSTRIAL ECOTOPES IN UFA

**Zhurenko E.I., Zharikova N.V.\*,  
Yasakov T.R., Korobov V.V.**

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of  
the Russian Academy of Sciences, Ufa (Russia)

\*E-mail: [puzzle111@yandex.ru](mailto:puzzle111@yandex.ru)

The ability of eight natural isolates of the two ecotopes to separately use 2,5-dichlorophenol (2,5-DCP) and 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP) as the sole source of carbon and energy were studied. Probably the chlorine substituent at the 5th position concerning the toxicity of the substrate is more important than its total amount because from the eight strains five used 2,4,6-TCP and only one used 2,5-DCP. No one of the studied strains did not show an antagonistic effect on other cultures. This indicates to the possibility of their combined use in technologies for the remediation of the environment from pollutants of a chloroaromatic nature.

*Keywords:* 2,4-dichlorophenol, ♦ 2,4,6-trichlorophenol, ♦ degrader strain, ♦ biodegradation ♦ antagonism

*Поступила в редакцию: 22.03.2021*

[DOI: 10.31163/2618-964X-2021-4-1-56-59](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2021-4-1-56-59)

## ВВЕДЕНИЕ

Хлорфенолы – это синтетические органические соединения, получаемые в крупных промышленных и коммерческих масштабах путем хлорирования фенола или гидролиза хлорбензолов. Соединения этой группы образуются как побочные продукты при хлорировании питьевой воды, в процессе коксования, во время отбеливания при производстве бумаги, а также в качестве интермедиатов на некоторых стадиях производства хлорфеноксисукусных кислот. Смеси хлорфенолов, благодаря их фунгицидным и бактерицидным свойствам, использовались в качестве антисептиков, пропиток для дерева и кожи и химикатов для защиты растений. В настоящее время из-за их неблагоприятного воздействия на окружающую среду во многих странах наложены ограничения, как на использование, так и на производство хлорфенолов.

Хлорофенолы могут также образовываться в результате естественных реакций в почвах и поверхностных водах при хлорировании гуминовой кислоты и фенолов хлорпероксидазами некоторых бактерий и грибов. Другими природными источниками

хлорфенолов в окружающей среде являются процессы неполного биоразложения пестицидов и гербицидов. Микробное разложение гербицидов, особенно 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4,5-Т) и пестицидов, образует многочисленные хлорфенолы как промежуточных продукты.

Для удаления хлорфенолов используются несколько физико-химических и биологических методов, при этом полная бактериальная деградация считается экономичным и экологически чистым методом очистки окружающей среды. Были выделены и охарактеризованы ряд бактерий, которые используют хлорфенолы в качестве единственного источника углерода и энергии [Czaplicka, 2004, Agora and Bae, 2014].

Цель работы – исследование возможности совместного применения природных бактериальных изолятов промзоны г. Уфы для утилизации 2,5-ДХФ и 2,4,6-ТХФ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили природные штаммы, изолированные ранее из образцов почв промзоны г. Уфы, обозначенной как экотоп II (ОАО «Ново-Уфимский НПЗ») и экотоп III (ОАО «Уфаоргсинтез», берег р. Шугуровка).

Способность использовать 2,5-ДХФ и 2,4,6-ТХФ в качестве единственных источников углерода и энергии у исследуемых изолятов оценивалась по наличию/отсутствию роста в минимальной солевой среде М9 (г/л):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 6.0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3.0;  $\text{NaCl}$  – 0.5;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1.0 [Маниатис и др., 1984]. Ночную культуру выращивали в 3-х мл мясопептонного бульона (МПБ) при температуре 28°C. Затем биомассу (30 мкл) засеивали на среду М9, где единственным источником углерода и энергии служили 2,5-ДХФ/2,4,6-ТХФ в концентрации 100 мг/л. Инкубацию исследуемых штаммов проводили при температуре 28°C в течение 7-ми дней.

Эксперименты проводили в пяти повторностях. Статистическую обработку полученных результатов выполняли по методу Фишера-Стьюдента.

Оценка антагонистической активности изучаемых культур проводили диффузионными методами перпендикулярных штрихов и агаровых блоков. На чашку с богатой агаризованной средой МПА засеивали культуру предполагаемого продуцента и культивировали при температуре 28°C в течение 48 ч, затем перпендикулярно от края чашки к штриху выросшей культуры подсеивали штрихом суточные культуры тест-штаммов. Чашку вновь инкубировали в течение 24 ч. О наличии и степени антагонистической активности у испытуемых культур судили по присутствию/отсутствию зоны ингибирования роста тест-штамма на границе со штрихом продуцента. Второй метод заключался в том, что изучаемую на антагонистическую активность культуру засеивали на поверхность МПА среды. После формирования газона пробочным сверлом вырезали агаровые блоки, которые переносили на другую чашку Петри со свежей тест-культурой в предварительно сделанные тем же сверлом лунки. В случае чувствительности тест-культуры к антибактериальному веществу продуцента вокруг агаровых блоков наблюдались зоны отсутствия роста.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для исследования способности утилизировать 2,5-ДХФ и 2,4,6-ТХФ бактериальные изоляты экотопов II и III выращивали на минимальной среде М9, отдельно содержащей вышеуказанные субстраты (табл. 1).

**Таблица 1. Рост бактериальных изолятов на 2,5-ДХФ и 2,4,6-ТХФ как единственных источников углерода и энергии**

Экотоп	№	Штамм	Рост на 2,5-ДХФ	Рост на 2,4,6-ТХФ
II	1.	33D	–	–
	2.	33-4ch	–	+
	3.	33P	–	+
	4.	33T(B)	–	–
	5.	33DCP(B)	+	+
III	6.	34DCP	–	+
	7.	34T(B)	–	+
	8.	34-4ch(e)	–	+

Примечание: «+» - наличие роста; «–» - отсутствие роста

На 5-е сутки из восьми штаммов обоих экотопов на минимальной среде с 2,5-ДХФ, как единственным источником питательных веществ, вырос только один – 33DCP(B). На среде с 2,4,6-ТХФ хорошо росли культуры 33-4ch, 33DCP(B) и 33P (экотоп II) и все три штамма экотопа III.

Необходимо отметить, что бактериальные культуры 33-4ch и 34T(B) ранее показали себя как эффективные деструкторы 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты [Жарикова и др., 2006, Коробов и др., 2019].

Для предварительного изучения межбактериальных взаимодействий вышеуказанных культур двух экотопов использовали метод перпендикулярных штрихов. Поскольку данный метод имеет недостаток – продуцент антибиотического вещества и тест-организм выращивают на одной среде, которая не всегда одинаково благоприятна как для продуцента и образования им антибиотика, так и для роста тест-организма, поэтому для более объективной оценки антагонистических взаимодействий исследуемых штаммов дополнительно применяли метод агаровых блоков. Результаты работы представлены в таблице 2.

**Таблица 2. Межбактериальные взаимодействия культур экотопов II и экотопа III**

Продуцент Тест-организм	33T(B)	33DCP(B)	33D	33-4ch	33P	34DCP	34T	34-4ch(e)
33T(B)	+	+	+	+	+	+	+	+
33DCP(B)	+	+	+	+	+	+	+	+
33D	+	+	+	+	+	+	+	+
33-4ch	+	+	+	+	+	+	+	+
33P	+	+	+	+	+	+	+	+
34DCP	+	+	+	+	+	+	+	+
34T(B)	+	+	+	+	+	+	+	+
34-4ch(e)	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание: «+» – наличие роста тест-организма

## ОБСУЖДЕНИЕ

В результате работы была исследована способность природных изолятов экотопов II и III раздельно использовать 2,5-ДХФ и 2,4,6-ТХФ в качестве единственного источника углерода и энергии.

Из восьми штаммов обоих экотопов только один 33ДСР(В) был способен использовать 2,5-ДХФ, в то время как 2,4,6-ТХФ утилизировали два штамма экотопа II и все три штамма экотопа III.

Токсичность хлорированных фенолов зависит от двух факторов: количества атомов хлора в молекуле субстрата и от их положения. Известно, что трудность в утилизации субстрата бактериями увеличивается при наличии хлор-заместителя в 3-, 4- и 5-ой позициях [Czaplicka, 2004]. Так как только одна наша культура была способна использовать 2,5-ДХФ против шести штаммов, утилизирующих 2,4,6-ТХФ, то можно предположить, что для деструктора большее значение в плане токсичности субстрата имело положение хлор-заместителя в 5-ой позиции, а не общее его количество. Подобный результат был получен нами ранее при изучении деградационного потенциала экотопов I и VI [Жарикова и др, 2020].

В результате проведенного изучения межбактериального взаимодействия изолятов обоих экотопов было установлено, что ни один из исследованных штаммов не проявляет антагонистического воздействия по отношению к другим. Таким образом, все восемь штаммов экотопов II и III можно использовать совместно в технологиях ремедиации окружающей среды от загрязнителей хлорароматической природы.

## ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098-9 с использованием оборудования центра коллективного пользования УФИЦ РАН «Агидель».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Коробов В.В., Журенко Е.Ю. Биоразнообразие бактериальных деструкторов 2,5-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола почв промзоны г. Уфы // Экобиотех. 2020. Т. 3. № 4. С. 712–715. DOI: [10.31163/2618-964X-2020-3-4-712-715](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-4-712-715)
2. Жарикова Н.В., Маркушева Т.В., Галкин Е.Г. и др. *Raoultella planticola* – новый штамм-деструктор 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 3. С. 292–297. DOI: [10.1134/S0003683806030069](https://doi.org/10.1134/S0003683806030069)
3. Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В. и др. Использование нового штамма-деструктора *Vacillus mobilis* 34Т для очистки почвы от 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2019. Т. 74. № 3. С. 195–199. DOI: [10.3103/S0096392519030064](https://doi.org/10.3103/S0096392519030064)
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Пер. с англ. М.: Мир. 1984. 480 с.
5. Arora P.K., Bae H. Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives // Microb. Cell. Fact. 2014. V. 13. Article 31. DOI: [10.1186/1475-2859-13-31](https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-31)
6. Czaplicka M. Sources and transformations of chlorophenols in the natural environment // Sci. Total. Environ. 2004 V. 322. № 1–3. P. 21–39. DOI: [10.1016/J.SCITOTENV.2003.09.015](https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2003.09.015)