



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



ШТАММ *PSEUDOMONAS* SP. DD4 ДЛЯ ДЕКТРУКЦИИ ГАЛОГЕНСОДЕРЖАЩИХ ПАВ И ГЕРБИЦИДОВ

Шарипов Д.А., Четвериков С.П.*

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

*E-mail: chelab007@yandex.ru

В работе описаны свойства штамма, выделенного из естественной популяции почвенных микроорганизмов, подвергавшихся воздействию нефтехимического производства, способного к деструкции фторсодержащих ПАВ и некоторых галогенированных гербицидов. В модельной системе изучена динамика роста штамма бактерий DD4 и показано, что культура активно накапливает биомассу при использовании в качестве источника углерода и энергии фторсодержащего пенообразователя типа AFFF и действующих веществ гербицидов Октапон, Чисталан, Флоракс. Основываясь на полученных данных, штамм бактерий DD4 может найти применение в технологиях ремедиации территорий с нарушенным экологическим статусом, образовавшихся при использовании фторсодержащих средств для тушения пожаров и нерегламентированном применении химических средств защиты растений. По результатам оценки культурально-морфологических, физиолого-биохимических признаков и последовательности гена 16S РНК штамм DD4 идентифицирован как представитель рода *Pseudomonas*.

Ключевые слова: фторсодержащие пенообразователи ♦ галогенсодержащие гербициды ♦ *Pseudomonas* ♦ биодеструкция

STRAIN *PSEUDOMONAS* SP. DD4 FOR THE DESTRUCTION OF HALOGEN- CONTAINING SURFACTANTS AND HERBICIDES

Sharipov D.A., Chetverikov S.P.*

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

*E-mail: chelab007@yandex.ru

The paper describes the properties of a strain isolated from a natural population of soil microorganisms exposed to petrochemical production, capable of destroying fluorinated surfactants and some halogenated herbicides. In the model system, the growth dynamics of the DD4 bacterial strain was studied and it was shown that the culture actively accumulates biomass when using a fluorine-containing foaming agent such as a foaming agent and active substances of the herbicides Octapon, Chistalan, and Florax as a source of carbon and energy. Based on the data obtained, the DD4 bacterial strain can be used in remediation technologies for territories with a disturbed ecological status, formed when using fluoride-containing fire extinguishing agents and unregulated use of chemical plant protection products. According to the results of cultural-morphological, physiological-biochemical characteristics and the sequence of the 16S RNA DD4 gene, the strain was identified as a representative of the genus *Pseudomonas*.

Keywords: fluorinated foaming agents ♦ halogen-containing herbicides ♦ *Pseudomonas* ♦ biodegradation

Поступила в редакцию: 01.04.2021

DOI: [10.31163/2618-964X-2021-4-1-60-67](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2021-4-1-60-67)

ВВЕДЕНИЕ

Проблема очистки наземных и водных экосистем, загрязненных токсичными, устойчивыми к разложению веществами неприродного происхождения, является одной из важнейших задач современной экобиотехнологии.

Галогенированные поллютанты находятся во главе списка стойких органических загрязнителей, в котором особое место занимают перфторкарбоновые кислоты (в частности, перфтороктановая сульфоновая (ПФОС) и перфтороктановая кислоты (ПФОК), которые внесены в Приложение В Стокгольмской конвенции по стойким органическим загрязняющим веществам [Report of ..., 2009], обладающие свойствами поверхностно-активных веществ (ПАВ). Одна из основных сфер их использования - пенообразователи эффективных препаратов для оперативного тушения пожаров при горении нефтепродуктов и других видов легковоспламеняющихся жидкостей типа AFFF (Aqua Film Foming Foam).

Исследования показывают, что эти ПАВ представляют значительную угрозу для окружающей среды и здоровья человека из-за их широкого распространения, необычайной стойкости, тенденции к биоаккумуляции и потенциальных токсикологических эффектов [Quinones et al., 2009; Espana et al., 2015; Tsuda et al., 2016]. ПФОС была обнаружена в повышенных концентрациях в поверхностных и подземных водах, в питьевой воде, вблизи аэропортов, мест подготовки пожарных в ряде стран [Moody, Field, 1999; Castiglioni et al., 2015].

Высокий спрос на повышение продуктивности сельского хозяйства сопровождается широкомасштабным использованием пестицидов, не менее 35% из которых приходится на гербициды [Aktar et al., 2009], в большей массе галогенсодержащие. Применение гербицидов ведет к распространению устойчивых к ним сорных растений и, соответственно, увеличению их дозы для обработки [Zargar, 2019] с вытекающим негативным влиянием на плодородие почвы, их накоплением в ней, загрязнением окружающей среды.

Таким образом, токсичность и способность к накоплению фторсодержащих ПАВ и галогенированных гербицидов в объектах окружающей среды ведет к исследованию возможности минимизации их отрицательного воздействия путем микробной деградации. Ранее нами было показано, что некоторые бактерии рода *Pseudomonas* способны к биоразложению как перфторорганических кислот [Четвериков и др., 2017], так и галогенированных гербицидов [Четвериков и др., 2019].

Цель настоящей работы – изучение свойств и выявление перспектив нового природного штамма бактерий в качестве деструктора фторсодержащих пенообразователей и ряда галогенированных гербицидов.

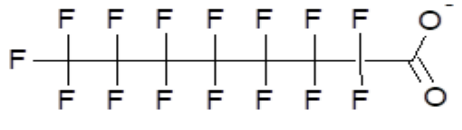
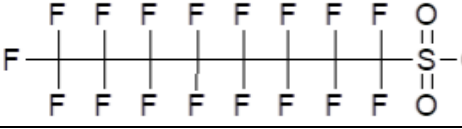
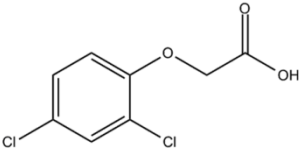
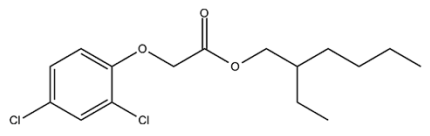
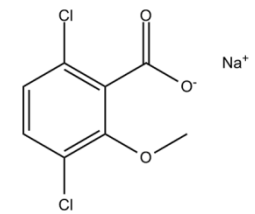
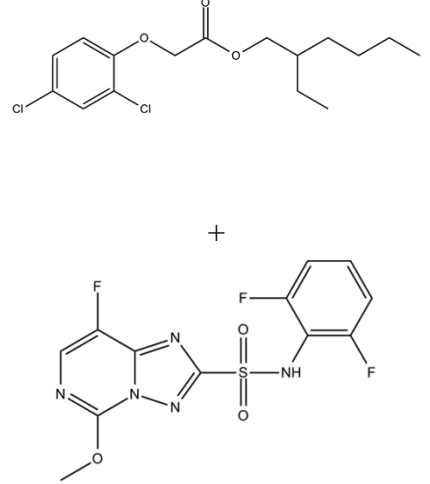
ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований был штамм DD4, выделенный из образца почвы с территории промышленного предприятия (Республика Башкортостан, Россия).

Динамику роста изучали в периодической культуре на синтетической среде Раймонда [Raymond, 1999] с фторсодержащим пенообразователем типа AFFF (1,0 г/л) и с галогенсодержащими гербицидами на основе 2,4-Д (Октапон, 10 мл/л; Флоракс, 2,5 мл/л; Чисталан, 5 мл/л) (действующие вещества представлены в таблице) в качестве единственного источника углерода и энергии при 26°C и 160 об./мин. Концентрация гербицидов в среде соответствовала их максимальному допустимому содержанию в используемых для опрыскивания рабочих растворах. Рост штамма оценивали по оптической плотности (ОП₅₉₀) клеточной суспензии на спектрофотометре СФ-56 (Россия).

Характеристику чистой культуры проводили на основании культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков [Gerhardt et al., 1981; Хоулт, Криг, 1997]. Выделение тотальной ДНК проводили по методике, описанной в работе [Wilson, 2001]. Амплификацию фрагмента гена 16S рНК осуществляли с использованием бактериальных праймеров 27F (5' AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG 3') и 1492R (5' ACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT 3') на амплификаторе «My Cycler» («Bio-Rad Laboratories», США). Выделение и очистку продуктов ПЦР проводили из легкоплавкой агарозы с применением набора реактивов «Wizard PCR Preps» («Promega», США), согласно рекомендациям производителя. Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов гена 16S рНК осуществляли с помощью набора реактивов «Big Dye Terminator v.3.1» («Applied Biosystems Inc.», США) на автоматическом секвенаторе «ABI PRIZM 3730» («Applied Biosystems, Inc.», США) согласно прилагаемым инструкциям производителя.

Таблица. Действующие вещества фторсодержащих ПАВ пенообразователей и галогенсодержащих гербицидов

Фторсодержащие ПАВ пенообразователей	ПФОК		
	ПФОС		
Галогенсодержащие гербициды	Октапон	2,4-Д (2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота)	
	Чисталан	2,4-Д (2-этилгексилловый эфир)	
		Дикамба (натриевая соль 3,6-дихлор-2-метоксибензойной кислоты)	
Флоракс	2,4-Д (2-этилгексилловый эфир) + Флорасулам		

Поиск гомологичных последовательностей осуществляли при использовании баз данных EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>).

Данные были выражены в виде средних значений, рассчитанных с использованием MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сложность, дороговизна и экологические последствия разрушения перфторорганических кислот физическими и химическими методами подразумевают исследование возможности их биодеструкции для минимизации отрицательного воздействия на окружающую среду. Но сообщения по биоминерализации этих соединений, т.е. включению микроорганизмами в обмен веществ и энергии, использованию в качестве единственного источника углерода, встречаются крайне редко [Huang, Jaffe, 2019; Четвериков, Логинов, 2019], хотя другие фторорганические соединения, более простые по структуре, такие как фторанилин, фторацетат, фторбензол, перфторбифенилы, перфторгексилсульфонат – биodeградебельны [Carvalho et al., 2005; Hughes et al., 2011; Wang et al., 2011; Davis et al., 2012; Amorim et al., 2013].

Исследуемый штамм DD4 был способен к росту в минеральных средах, содержащих в качестве единственного источника углерода как фторсодержащий пенообразователь типа AFFF, так и его основные компоненты – перфторкарбоновые кислоты (рис. 1). Наибольший показатель оптической плотности культуральной жидкости приходился на 4 сут роста при культивировании на ПФОК (0,84 ОЕ) и на 5 сут – на ПФОС (0,80 ОЕ). Такая задержка в росте, вероятно, связана с более долгой адаптацией к серосодержащему субстрату, что подтверждает полученные нами ранее данные для штамма *Ensifer adhaerens* M1 при деструкции ПФОС и ПФОК [Четвериков, Логинов, 2019]. В среде с пенообразователем максимальное значение оптической плотности было ниже (0,49 ОЕ) и наблюдали его уже на 3 сут культивирования. Это связано с тем, что концентрат пенообразователя как коммерческий продукт содержит только до 6% фторированных ПАВ, и, вероятно, доступные для исследуемого штамма другие специализированные добавки (в большинстве случаев это коммерческая тайна производителя) типа углеводородных ПАВ.

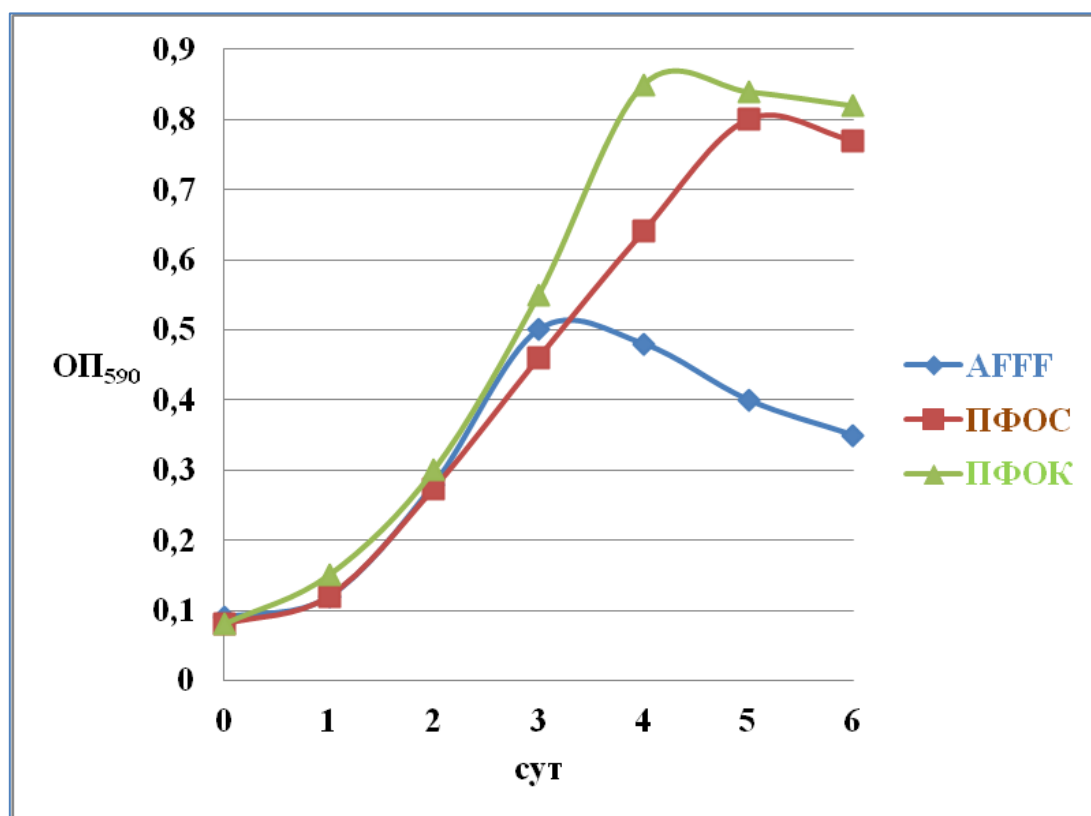


Рис. 1. Динамика роста штамма DD4 при культивировании на среде с AFFF, ПФОС и ПФОК в периодической культуре.

На сегодняшний день в результате хозяйственной деятельности в биосфере циркулирует большое число различных чужеродных для человека и животных соединений, многие из которых имеют исключительно высокую токсичность. Приоритетными из них являются хлорсодержащие органические соединения, в том числе пестициды, используемые для борьбы с болезнями и вредителями сельского хозяйства. В настоящее время для переработки пестицидов предлагаются главным образом физические и химические методы. Преимущество применения биологических методов дезактивации пестицидов объясняется тем, что микроорганизмы минерализуют пестициды и другие продукты органического синтеза в естественном цикле круговорота веществ, не оказывая отрицательного влияния на экосистему.

Исследуемый штамм DD4 также проявлял способность к росту в минеральных средах с галогенсодержащими гербицидами (рис. 2). Наилучшим субстратом из них был Флоракс, одним из действующих веществ которого является флорасулам. Флорасулам – фторсодержащий послевсходовый гербицид из семейства триазолопиримидинсульфонанилидов. Он входит в состав многих комбинированных препаратов и применяется для защиты от широколиственных сорняков пшеницы, ячменя, овса и ржи. Флорасулам хорошо растворим в воде и при определенных условиях возможно его выщелачивание в грунтовые воды. Он не является стойким в почве, но может быть стойким в водных системах. Наибольший показатель оптической плотности культуральной жидкости при росте на нем приходился на 4 сут роста (0,76 ОЕ).

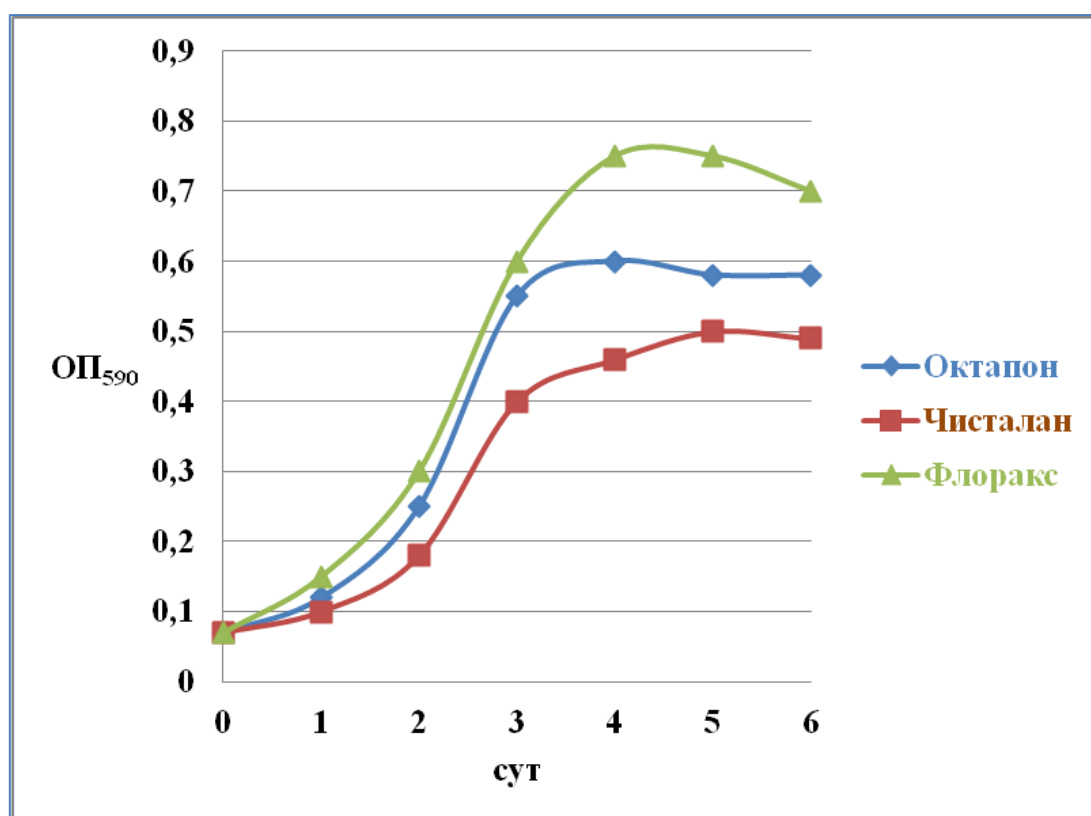


Рис. 2. Динамика роста штамма *Pseudomonas* sp. DD4 при культивировании на среде с гербицидами Октапон, Чисталан и Флоракс в периодической культуре.

Несколько худший рост исследуемого штамма наблюдали при культивировании на хлорсодержащих гербицидах Октапоне и Чисталане. Способность данного микроорганизма к их использованию, очевидно, является следствием присутствия в составе обоих гербицидов 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д). 2,4-Д была первым

представленным в 1940-х гг. на рынке коммерческим препаратом для борьбы с сорной растительностью и до сих пор остается одним из наиболее часто используемых гербицидов в мире из-за низкой стоимости, селективности, эффективности и широкого спектра подавляемых сорняков. 2,4-Д представляет собой умеренно стойкое химическое вещество с периодом полураспада от 20 до 312 сут в зависимости от условий окружающей среды [Ordaz-Guillén et al., 2014]. Из-за слабой адсорбции и высокой растворимости в воде 2,4-Д легко вымывается с полей и часто обнаруживается в поверхностных и подземных водах, что представляет существенную экологическую проблему и опасность для здоровья [Gaultier et al., 2008; Kearns et al., 2014]. Наибольший показатель оптической плотности культуральной жидкости штамма DD4 при культивировании на Октапоне составил 0,60 ОЕ на 4 сут, на Чисталане - 0,49 ОЕ на 5 сут. В дальнейшем деструкция гербицидов проходила менее активно, возможно, из-за накопления продуктов преобразования 2,4-Д. А содержащийся в препарате Чисталан дополнительный компонент Дикамба (натриевая соль 3,6-дихлор-2-метоксибензойной кислоты), не смотря на общие с 2,4-Д черты в структуре молекул, мог оказывать негативное влияние на активность бактерий, что косвенно и подтверждается более низкой скоростью их роста.

В связи с выявленными положительными свойствами и перспективой дальнейших исследований в этой области с использованием штамма DD4 он был детально описан и идентифицирован.

Клетки исследуемого штамма DD4 – граммотрицательные подвижные палочки диаметром 1.0-1.2 мкм, длиной 1.8-2.2 мкм. При выращивании на МПА образует колонии бело-кремового цвета, круглые, выпуклые диаметром 4-5 мм. Метаболизм - дыхательный, штамм каталазоположителен, синтезирует оксидазу, не обладает способностью к денитрификации, не гидролизует казеин, желатин, лецитин и крахмал, не синтезирует липолитические ферменты: не способен к росту на среде с твин-80, тест на аргининдигидролазу положителен. Оптимальная температура для роста находится в интервале 26-30°C, оптимальная величина pH 6.8-7.2. При концентрации NaCl 0-5% наблюдается интенсивный рост, при более высокой концентрации до 10% NaCl рост нет. Не использует в качестве единственного источника углерода глюкозу, сахарозу, маннит, фруктозу, сорбит, инозит, мальтозу, арабинозу, ксилозу, маннозу, галактозу, лактозу, рамнозу, мезо-инозитол, крахмал, леван, калий виннокислый. В качестве источника углерода использует сукцинат, малат, цитрат, 2-кетоглюконат, этанол, н-бутанол, пропиленгликоль, L-лейцин, L-лизин, L-валин, L-аланин, L-аргинин, L-аспарат, L-гистидин. Клетки штамма синтезируют флуоресцентный пигмент.

Для выделенного штамма была определена последовательность (1413 п.н.) гена, кодирующего 16S рРНК. Уровень сходства последовательностей штаммов DD4 и *P. plecoglossicida* NBRC 103162 составил 99.86%, с *P. jureticum* BML3 – 99.83%, а с *P. monteilii* NBRC 103158 – 99.80%. Для установления более точного видового статуса необходимо провести определение и сравнение последовательностей генов «домашнего хозяйства».

Таким образом, в результате проведенных исследований установлена принадлежность штамма DD4 к виду *Pseudomonas*, показана его способность к росту при использовании в качестве источника углерода и энергии фторсодержащего пенообразователя типа AFFF и действующих веществ гербицидов Октапон, Дикамба, Флоракс. Основываясь на полученных данных, штамм бактерий DD4 может найти применение в технологиях ремедиации территорий с нарушенным экологическим статусом, образовавшихся

при использовании фторсодержащих средств для тушения пожаров и нерегламентированном применении химических средств защиты растений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках Гос. Задания Минборнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А19-119021390081-1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хоулт Дж., Криг Н. Определитель бактерий Берджи. 9-е Издание в 2-х томах. / Перевод с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина. – Москва: Мир, 1997.
2. Четвериков С.П., Логинов О.Н. Новый штамм *Ensifer adhaerens* M1 способен к трансформации перфторкарбоновых кислот // Микробиология. 2019. Т. 88. № 1. С. 116–119. DOI: [10.1134/S0026365618060083](https://doi.org/10.1134/S0026365618060083)
3. Четвериков С.П., Четверикова Д.В., Кенджиева А.А., Бакаева М.Д. Использование гербицидов в качестве питательного субстрата бактериями – стимуляторами роста сельскохозяйственных культур // Естественные и технические науки. 2019. № 11. С. 108–111. DOI: [10.25633/ETN.2019.11.18](https://doi.org/10.25633/ETN.2019.11.18)
4. Четвериков С.П., Шарипов Д.А., Коршунова Т.Ю., Логинов О.Н. Разложение перфтороктансульфоната штаммом *Pseudomonas plecoglossicida* 2.4-D // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. № 5. С. 477–483. DOI: [10.7868/S0555109917050026](https://doi.org/10.7868/S0555109917050026)
5. Aktar W., Sengupta D., Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards // Interdisc Toxicol 2009. 2 (1). P. 1–12. DOI: [10.2478/v10102-009-0001-7](https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7)
6. Amorim C.L., Carvalho M.F., Afonso C.M.M., Castro P.M.L. Biodegradation of fluoroanilines by the wild strain *Labrys portucalensis* // Int. Biodeter. Biodegr. 2013. V. 80. P. 10–15. DOI: [10.1016/j.ibiod.2013.02.001](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.02.001)
7. Carvalho M.F., Ferreira J.R., Pacheco C.C. et. al. Isolation and properties of a pure bacterial strain capable of fluorobenzene degradation as sole carbon and energy source // Environ. Microbiol. 2005. V. 7 (2). P. 294–298. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2004.00714.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00714.x)
8. Castiglioni S., Valsecchi S., Polesello S. et al. Sources and fate of perfluorinated compounds in the aqueous environment and in drinking water of a highly urbanized and industrialized area in Italy // Journal of hazardous materials. 2015. 282. P. 51–60. DOI: [10.1016/j.jhazmat.2014.06.007](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.06.007)
9. Davis C.K., Webb R.I., Sly L.I. et. al. Isolation and survey of novel fluoroacetate-degrading bacteria belonging to the phylum Synergistetes // FEMS Microbiology Ecology. 2012. 80 (3). P. 671–684. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2012.01338.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01338.x)
10. Espana V., Mallavarapua M., Naidu R. Treatment technologies for aqueous perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA): A critical review with an emphasis on field testing // Environmental technology & innovation. 2015.4. P. 168–181. DOI: [10.1016/j.eti.2015.06.001](https://doi.org/10.1016/j.eti.2015.06.001)
11. Gaultier J., Fahrenhorst A., Cathcart J., Goddard T. Degradation of [carboxyl-14C] 2,4-D and [ring-U-14C] 2,4-D in 114 agricultural soils as affected by soil organic carbon content // Soil Biol. Biochem. 2008. V. 40 (1). P. 217–227. DOI: [10.1016/j.soilbio.2007.08.003](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.08.003)
12. Gerhard P., Murray R.G.E., Wood W.A., Krieg N.R. Methods for general and molecular bacteriology, 2nd ed. – Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1994.

13. Huang S., Jaffé P.R. Defluorination of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) by *Acidimicrobium* sp. strain A6 // *Environmental Science & Technology*. 2019. V. 53 (19). P. 11410–11419. DOI: [10.1021/acs.est.9b04047](https://doi.org/10.1021/acs.est.9b04047)
14. Hughes D., Clark B.R., Murphy C.D. Biodegradation of polyfluorinated biphenyl in bacteria // *Biodegradation*. 2011. V. 22 (4). P. 741–749. DOI: [10.1007/s10532-010-9411-7](https://doi.org/10.1007/s10532-010-9411-7)
15. Kearns J.P., Wellborn L.S., Summers R.S., Knappe D.R.U. 2,4-D adsorption to biochars: Effect of preparation conditions on equilibrium adsorption capacity and comparison with commercial activated carbon literature data // *Water Research*. 2014. V. 62. P. 20–28. DOI: [10.1016/j.watres.2014.05.023](https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.023)
16. Moody C.A., Field J.A. Determination of Perfluorocarboxylates in Groundwater Impacted by Fire Fighting Activity // *Environmental Science and Technology*. 1999. V. 33 (16). P. 2800–2806. DOI: [10.1021/es981355](https://doi.org/10.1021/es981355)
17. Ordaz-Guillén Y., Galíndez-Mayer C.J., Ruiz-Ordaz N. et. al. Evaluating the degradation of the herbicides picloram and 2,4-D in a compartmentalized reactive biobarrier with internal liquid recirculation // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2014. V. 21 (14). P. 8765–8773. DOI: [10.1007/s11356-014-2809-8](https://doi.org/10.1007/s11356-014-2809-8)
18. Quinones O., Snyder S. Occurrence of perfluoroalkyl carboxylates and sulfonates in drinking water utilities and related waters from the United States // *Environmental science and technology*. 2009. V. 43 (24). P. 9089–9095. DOI: [10.1021/es9024707](https://doi.org/10.1021/es9024707)
19. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons, (Volume 2). // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 1999 V. 22 (4-5), P. 206–215. DOI: [10.1038/sj.jim.2900633](https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900633)
20. Report of the Conference of the Parties of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants on the work of its fourth meeting, 4-8 May // UNEP/POPS/COP.4/38. Geneva: Stockholm Convention Secretariat, 2009. P. 66–69. [<http://chm.pops.int/Portals/0/Repository/COP4/UNEP-POPS-COP.4-38.English.PDF>]
21. Tsuda S. Differential toxicity between perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) // *Journal of toxicology sciences*. 2016. 41 (Special). P. 27–36. DOI: [10.2131/jts.41.SP27](https://doi.org/10.2131/jts.41.SP27)
22. Wang N., Liu J., Buck R.C., Korzeniowski S.H., Wolstenholme B.W., Folsom P.W., Sulecki L.M. 6:2 Fluorotelomer sulfonate aerobic biotransformation in activated sludge of waste water treatment plants // *Chemosphere*. 2011. V. 82 (6). P. 853–858. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2010.11.003](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.003)
23. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // *Current Protocols in Molecular Biology* 2001. V. 56 (1) P. 2.4.1-2.4.5. DOI: [10.1002/0471142727.mb0204s56](https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56)
24. Zargar M., Bayat M., Lyashko M., Chauhan B. Postemergence herbicide applications impact Canada thistle control and spring wheat yields // *Agronomy journal*. 2019. V. 111 (6). P. 2874–2880. DOI: [10.2134/agronj2019.02.0125](https://doi.org/10.2134/agronj2019.02.0125)