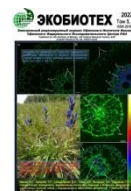




ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПРИРОДНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ДЕСТРУКТОРОВ ФЕНОЛА И ЕГО ХЛОПРОИЗВОДНЫХ В ПРОМЫШЛЕННЫХ ЭКОТОПАХ Г. УФЫ

Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В.*

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

*E-mail: puzzle111@yandex.ru

Проанализирована способность 20 природных изолятов трех промышленных экотопов отдельно использовать фенол, 2,4- и 2,5-дихлорфенолы (2,4-ДХФ и 2,5-ДХФ), 2,4,6-трихлорфенол (2,4,6-ТХФ), а также 4-хлорфеноксиуксусную, 2,4-дихлорфеноксиуксусную и 2,4,5-трихлорфеноксиуксусную (4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т) кислоты в качестве единственного источника углерода и энергии. Самым доступным субстратом, который могли использовать все выделенные изоляты, оказался фенол. При использовании хлорфеноксиуксусных кислот наблюдалось снижение активности по отношению к 2,4,5-Т по сравнению с 4-ХФУК и 2,4-Д: 18 штаммов могли использовать 4-ХФУК и 2,4-Д, а 16 – 2,4,5-Т. Далее по порядку увеличения степени сложности субстрата следовали 2,4,6-ТХФ, 2,4-ДХФ и 2,5-ДХФ, их могли утилизировать, соответственно, 11, 7 и 2 штамма. Так как дихлорфенолы являются более сложными субстратами для исследованных культур по сравнению с 2,4,6-ТХФ, следовательно, положение хлорзаместителей имеет большее значение, чем их количество. Сравнение способности штаммов к росту на 2,4-ДХФ и 2,4,6-ТХФ позволяет сделать вывод о важности пространственной структуры молекулы субстрата, так как наличие хлора в 6-й позиции облегчает утилизацию хлорированного субстрата. Первичный скрининг показал, что исследуемые штаммы разделились на 4 группы: 12 культур принадлежали к подклассу *гамма*-протеобактерий; 3 – к бациллярной линии грамположительных бактерий, 2 – к подклассу *бета*-протеобактерий; 3 – к актиномицетам. Больше всего среди деструкторов фенола и его хлорированных производных оказалось псевдомонад – четыре штамма, а также по три культуры принадлежали к представителям родов *Bacillus* и *Raoultella*.

Ключевые слова: фенол ♦ 2,4-дихлорфенол ♦ 2,5-дихлорфенол ♦ 2,4,6-трихлорфенол ♦ 4-хлорфеноксиуксусная кислота ♦ 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота ♦ 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота ♦ бактерии-деструкторы

TAXONOMIC DIVERSITY OF NATURAL BACTERIAL DEGRADERS OF PHENOL AND ITS CHLORINE DERIVATIVES IN INDUSTRIAL ENVIRONMENT OF THE UFA CITY

Korobov V.V., Zhurenko E.I., Zharikova N.V.*

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

*E-mail: puzzle111@yandex.ru

The ability of 20 natural isolates of three industrial ecotopes to separately use phenol, 2,4-, 2,5-dichlorophenols (2,4-DCP, 2,5-DCP), 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP), 4-chlorophenoxyacetic, 2,4-dichlorophenoxyacetic and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic (4-CPA, 2,4-D and 2,4,5-T) acids as the sole source of carbon and energy was analyzed. The most available substrate that could be used by all isolated isolates was phenol. When using chlorophenoxyacetic acids, there was a decrease in activity against 2,4,5-T compared with 4-CPA and 2,4-D: 18 strains could use 4-CPA and 2,4-D, and 16 - 2,4,5-T. 2,4,6-TCP, 2,4-DCP, and 2,5-DCP followed in order of increasing substrate complexity; they could be utilized by 11, 7, and 2 strains, respectively. Since dichlorophenols are more complex substrates for the studied cultures compared to 2,4,6-TCP, therefore, the position of chlorine substituents is more important than its number. Comparison of the ability of strains to grow on 2,4-DCP and 2,4,6-TCP allows us to conclude that the spatial structure of the substrate molecule is important, since the presence of chlorine in the 6th position facilitates the utilization of the chlorinated substrate. Primary screening showed that the studied strains were divided into 4 groups: 12 cultures belonged to the *gamma* subclass of Proteobacteria; 3 – to the bacillary line of gram-positive bacteria, 2 – to the *beta* subclass of proteobacteria; 3 – to actinomycetes. *Pseudomonas* were the most numerous among the degraders of phenol and its chlorinated derivatives – four strains, as well as three cultures each belonged to representatives of the genera *Bacillus* and *Raoultella*.

Keywords: phenol ♦ 2,4-dichlorophenol ♦ 2,5-dichlorophenol ♦ 2,4,6-trichlorophenol ♦ 4-chlorophenoxyacetic acid ♦ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid ♦ 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid ♦ degrader strain

Поступила в редакцию: 28.11.2022

Цитировать | Cite as

DOI: 10.31163/2618-964X-2022-5-4-161-167

EDN: MSZUZK



ВВЕДЕНИЕ

Промышленные экотопы – это специфические образования, которые формируются на сравнительно небольшой территории под воздействием множества сочетающихся природных и антропогенных факторов. Почвенный покров таких образований представлен техногенно изменёнными зональными почвами и урбанозёмами, обладающими отличными от природных почв свойствами [Alberti and Marzluff, 2004].

Ключевым звеном, определяющим экологические функции почвы, является почвенная микробная система. Почвенная микробиота в природных экосистемах поддерживает на постоянном уровне, характерном для данного типа почвы, органическое вещество, а также различные биоактивные вещества, а именно: ферменты, витамины, ауксины, аминокислоты, токсины. Все определяющие биохимические и физиологические процессы в почве дублируются несколькими видами микроорганизмов – так называемый принцип дублирования. Благодаря этому сокращение численности в любой группе видов до определенного уровня мало влияет на общие процессы в почве. Микроорганизмы почвы осуществляют круговорот азота, фосфора, углерода, серы, железа и других важнейших элементов, тем самым обеспечивая выполнение важнейшей функции почвы – трансформацию вещества и энергии в биосфере [Nannipieri et al., 2003].

В условиях антропогенного загрязнения почвы отмечается снижение разнообразия её микробиоты, что в свою очередь затрудняет процессы самоочищения почв и провоцирует рост чужеродной микрофлоры. В связи с этим возникает проблема микробиологической безопасности, решение которой требует изучения всех аспектов жизнедеятельности микробиоты антропогенно нарушенных почв [Alberti and Marzluff, 2004; Nannipieri et al., 2003].

Таким образом, изучение микробного биоразнообразия почв промышленных экотопов актуально как для расширения представлений об участии аэробных бактерий в экологических функциях таких почв, так и в целях индикации различных промышленных загрязнений, в том числе хлорароматических соединений.

Цель работы – оценить таксономическое разнообразие природных бактериальных деструкторов фенола и его хлорпроизводных, выделенных из образцов почв промышленных экотопов г. Уфы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были использованы природные штаммы, выделенные ранее нами из образцов почв, отобранных на территории производств хлорсодержащих соединений г. Уфы, а именно: завода «Дубитель», ОАО «Ново-Уфимский НПЗ» и ОАО «Уфаоргсинтез», и обозначенных нами как экотопы I, II и III, соответственно.

Способность изучаемых штаммов к конверсии фенола и его хлорпроизводных оценивалась по наличию/отсутствию роста в минимальной солевой среде М9, отдельно содержащей в качестве единственного источника углерода фенол, 2,4-, 2,5-дихлорфенолы (2,4-ДХФ, 2,5-ДХФ), 2,4,6-трихлорфенол (2,4,6-ТХФ), 4-хлорфеноксиуксусную,

2,4-дихлорфеноксиуксусную и 2,4,5-трихлорфеноксиуксусную кислоты (4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т). Состав среды М9 (г/л): Na_2HPO_4 – 6.0; KH_2PO_4 – 3.0; NaCl – 0.5; NH_4Cl – 1.0 [Маниатис и др., 1984]. Посевной материал бактерий получали выращиванием в пробирках с 3 мл мясопептонного бульона (МПБ). Затем выросшую культуру засеивали в среду М9 в аликвотах, составляющих 0.01% от объема данной среды. В качестве источника углерода и энергии в среду отдельно вносили вышеуказанные субстраты в концентрации 100 мг/л. Изоляты инкубировались 7 суток при 28°C. Интенсивность роста штаммов оценивалась визуально по степени мутности. Эксперименты проводили в пяти повторностях.

Определение филогенетического положения штаммов проводилось на основании последовательности генов 16S рРНК. Препараты ДНК из клеток изучаемых микроорганизмов получали с применением наборов Axugen Scientific Inc. (США) и Wizard (Promega, США), следуя рекомендациям фирмы-производителя. Накопление ПЦР-продуктов проводили в амплификаторах TC 2720 (Applied biosystems, США) и MJ Mini (Bio-Rad, США) с использованием универсальной праймерной системы [Edwards et al., 1989]. Электрофоретическое фракционирование ДНК осуществляли в 1-2% агарозных гелях на приборах НПО ДНК-технология (Россия). Состав реакционной смеси для ПЦР: праймеры – по 25 пмол каждого; 10X буфер – 2.5 мкл; 2 mM dNTP – 2.5 мкл; BioTaq полимеразы («Диалат», Москва, 5Е/мкл) – 0.2 мкл; ДНК-матрица – 50 нг; H_2O – до 25 мкл. Реакцию проводили по следующей схеме: 30 циклов: 94°C – 0.5 мин; 45°C – 1 мин, 72°C – 1 мин; окончательная полимеризация – 7 мин. Размеры фрагментов ДНК определяли с маркером длин в диапазоне 100-1000 п.н. (Fermentas, Литва). Выделение и очистку продуктов ПЦР, соответствующих различным областям гена, проводили из легкоплавкой агарозы с применением набора реактивов Wizard PCR Preps Promega, США, согласно рекомендациям производителя.

Секвенирование ПЦР-амплификатов гена 16S рРНК выполняли на автоматическом секвенирующем устройстве Avant 3150 (Applied Biosystems, США) со стандартным набором реактивов в прямом и обратном направлениях согласно рекомендациям производителя. Для сравнительного анализа последовательности гена 16S рРНК привлекались ресурсы Ribosomal Database Project (RDP) и GenBank. Последовательности были выровнены с соответствующими последовательностями ближайших видов бактерий с помощью программы CLUSTAL.W. Бескорневые деревья строились с использованием метода Neighbor-Joining в программе MEGA4. Показатель bootstrap-анализа соответствовал не менее чем 1000 альтернативным деревьям. Расчет эволюционных расстояний проводился с помощью метода Maximum Composite Likelihood.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате предыдущей работы нами были выделены бактериальные штаммы-деструкторы из почв трех промышленных экотопов г. Уфы [Markusheva et al, 2004, Korobov et al, 2018]. Была исследована их активность по отношению к фенолу и его хлорпроизводным как единственным источникам углерода и энергии (табл. 1).

Таблица 1. Рост бактериальных изолятов промышленных экотопов г. Уфы на феноле и его хлорпроизводных как единственных источниках углерода и энергии

Экотоп	Штамм	субстрат						
		фенол	2,4-ДХФ	2,5-ДХФ	2,4,6-ТХФ	4-ХФУК	2,4-Д	2,4,5-Т
I	36-4CPA	+	+/-	-	-	+	+	+
	36D	+	-	-	-	+	+	+
	36DCP	+	+	+	+	+	+	+
	38D	+	+	-	+/-	+	+	+
	36P	+	-	-	+/-	+	+	+
	38P	+	-	-	-	+	+	-
	22S	+	+	-	-	+	+	+
36T	+	-	-	-	+	+	+	
II	33 4CPA	+	+/-	-	+	+	+	+
	33DCP(B)	+	-	-	-	-	-	-
	33DCP(P)	+	-	-	-	-	-	-
	33P(a)	+	-	-	+/-	+	+	+
	33P(p)	+	-	-	+	+	+	+
33T(B)	+/-	-	-	-	+	+	+	
III	34-4ch (e)	+	-	-	+	+	+	+
	34DCP	+	+/-	-	+	+	+	+
	51D	+	-	-	-	+	+	+
	NPZ-121	+	+	+	+	+	+	+
	34T(B)	+	-	-	+	+/-	+/-	-
34T(P)	+	-	-	+	+	+	+	

Примечание. «+» – наличие роста; «-» – отсутствие роста; «+/-» – рост умеренный.

Все 20 выделенных штаммов росли на феноле. Активность по отношению к 2,4- и 2,5-ДХФ, а также к 2,4,6-ТХФ идентифицирована у семи, двух и одиннадцати бактериальных изолятов, соответственно. На хлорфеноксиуксусных кислотах 4-ХФУК и 2,4-Д росли 18, а на 2,4,5-Т – 16 штаммов. Затем из клеток бактерий были получены препараты ДНК, на основании секвенирования гена 16S рРНК которых, изучено филогенетическое положение 20 штаммов-деструкторов (табл. 2).

Таблица 2. Филогенетическое положение штаммов-деструкторов фенола и его хлорпроизводных промышленных экотопов г. Уфы

Экотоп	Обозначение штамма	Родовая принадлежность
I (ОАО "Дубитель")	36-4cpa	<i>Citrobacter</i>
	36D	<i>Raoultella</i>
	36DCP	<i>Pseudomonas</i>
	38D	<i>Cellulosimicrobium</i>
	36P	<i>Achromobacter</i>
	38P	<i>Enterobacter</i>
	22S	<i>Serratia</i>
II (ОАО «Ново-Уфимский НПЗ»)	36T	<i>Raoultella</i>
	33-4CPA	<i>Raoultella</i>
	33DCP(B)	<i>Bacillus</i>
	33DCP(P)	<i>Xanthomonas</i>
	33P(a)	<i>Achromobacter</i>
III (ОАО «Уфаоргсинтез», берег р. Шугуровка)	33P(p)	<i>Pseudomonas</i>
	33T(B)	<i>Bacillus</i>
	34-4ch (e)	<i>Enterobacter</i>
	34DCP	<i>Pseudomonas</i>
	51D	<i>Gordonia</i>
	NPZ-121	<i>Cellulosimicrobium</i>
	34T(B)	<i>Bacillus</i>
	34T(P)	<i>Pseudomonas</i>

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате работы была проанализирована способность природных изолятов экотопов I, II и III отдельно использовать фенол, 2,4-ДХФ, 2,5-ДХФ, 2,4,6-ТХФ, а также 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т в качестве единственного источника углерода и энергии. Исходя из полученных данных, самым доступным субстратом, который могли использовать все выделенные изоляты, как и ожидалось, оказался фенол. Как известно, отсутствие хлор-заместителей в молекуле ароматического субстрата облегчает его конверсию микроорганизмами.

Хороший потенциал роста проявили указанные культуры при использовании хлорфеноксикислот как единственных источников углерода и энергии. Наблюдалось некоторое снижение активности у изучаемых культур по отношению к субстрату имевшему три хлор-заместителя в молекуле, а именно: 18 штаммов могли использовать как 4-ХФУК, так и 2,4-Д, и только 16 – 2,4,5-Т.

По литературным данным 2,4,5-Т считается более сложным субстратом для бактерий, чем менее хлорированные феноксикислоты. Известно более сотни бактериальных штаммов-деструкторов 2,4-Д, относящихся к различным филогенетическим группам, в то время как конверсию 2,4,5-Т осуществляют немногие исследованные штаммы, относящиеся к более узкой таксономической группе [см. ссылки обзоров: Жарикова и др., 2017, Zharikova et al., 2018].

Далее по увеличению степени сложности субстрата, для исследованных изолятов следовали 2,4,6-ТХФ, 2,4-ДХФ и 2,5-ДХФ, по отношению к которым проявили активность 11, 7 и 2 штамма, соответственно.

По литературным данным 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-й, 4-й и 5-й позициях [Czaplicka, 2004]. Так как дихлорфенолы оказались более сложными субстратами для исследованных культур по сравнению с 2,4,6-ТХФ, следовательно, положение хлор-заместителей имеет большее значение, чем его количество. В то же время сравнение способности штаммов к росту на 2,4-ДХФ и 2,4,6-ТХФ позволяет сделать вывод о важности пространственной структуры молекулы субстрата, так как наличие хлора в 6-й позиции облегчает утилизацию хлорированного субстрата.

Первичный скрининг по базе данных GenBank показал, что исследуемые штаммы разделились на 4 группы, согласно их принадлежности к основным филогенетическим подразделениям бактерий. Больше всего культур – 12 из 20, принадлежали к подклассу *гамма*-протеобактерий. Остальные штаммы были отнесены к трем другим группам, а именно: к бациллярной линии грамположительных бактерий – 3, к подклассу *бета*-протеобактерий – 2, и к актиноцистам – 3.

Следует отметить, что родовой состав исследованных бактериальных культур также оказался весьма разнообразным. Больше всего среди деструкторов фенола и его хлорированных производных оказалось псевдомонад – четыре штамма, а также по три культуры принадлежали к представителям родов *Bacillus* и *Raoultella*. Бактерии родов *Bacillus* и *Raoultella* хорошо известны в качестве деструкторов различных хлорароматических соединений и часто обуславливают детоксикацию почвы от этих ксенобиотиков, что делает их присутствие в почвах техногенных экотопов закономерным.

Представители рода *Raoultella* (ранее *Klebsiella*) среди деструкторов ксенобиотиков встречаются гораздо реже.

Актиномицеты, к которым принадлежат три исследованных штамма – это особая группа микроорганизмов, также хорошо известная своей способностью выживать в почвах, загрязненных ксенобиотиками, в том числе хлорароматической природы. Защитные механизмы, обуславливающие «живучесть» актиномицетов, включают в себя: окислительно-восстановительные ферменты, обезвреживающие токсичный субстрат; эффлюкстраспортную систему клеточной стенки, распознающую и удаляющую проникшие вредные вещества; супероксиддисмутазу, устраняющую токсичные кислородные радикалы; сидерофоры и подобные меланину пигменты, связывающие вредные вещества (например, ионы тяжелых металлов), тем самым уменьшая их доступную концентрацию в среде [Онака, 2009].

Таким образом, не смотря на некоторую обедненность почвы промышленных экотопов, наблюдается таксономическое разнообразие бактериальных деструкторов фенола и его хлорпроизводных. Превалирование в образцах представителей родов *Pseudomonas* и *Bacillus*, а также актиномицетов, закономерно, так как эти бактерии обладают богатым ферментативным аппаратом и генетической пластичностью, в связи с чем проявляют активность в отношении различных ксенобиотиков и часто обнаруживаются в загрязненных местообитаниях.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-03-2021-607 по теме №122031100163-4 с использованием оборудования центра коллективного пользования УФИЦ РАН «Агидель»

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Журенко Е.Ю. и др. Бактериальные гены инициации деградации 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, кодирующие α -кетоглутаратзависимую диоксигеназную активность // Успехи современной биологии. 2017. Т. 137 (5). С. 514–528. DOI: 10.7868/S0042132417050076
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
3. Alberti M., Marzluff J.M. Ecological resilience in urban ecosystems: Linking urban patterns to human and ecological functions // Urban Ecosystems. 2004. V. 7 (3). P. 241–265. DOI: 10.1023/B:UECO.0000044038.90173.c6
4. 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
5. Edwards U., Rogall T., Bloeker H. et al. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes, characterization of gene coding for 16S ribosomal RNA // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. P. 7843–7853. DOI: 10.1093/nar/17.19.7843
6. Korobov V.V., Zhurenko E.Y., Galkin E.G. et al. *Cellulosimicrobium* sp. strain npz-121, a degrader of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid // Microbiology. 2018. Т. 87 (1). P. 147–150. DOI: 10.1134/S0026261718010101
7. Markusheva T.V., Zhurenko E.Yu., Korobov V.V. et al. Identification and characterization of a plasmid in strain *Aeromonas hydrophila* IBRB-36 4cpa carrying genes for catabolism of chlorophenoxyacetic acids // Russian Journal of Genetics. 2004. Т. 40 (11). P. 1210–1214. DOI: 10.1023/B:RUGE.0000048662.23804.41

8. Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T. et al. Microbial diversity and soil functions // *European Journal of Soil Science*. 2003. V. 54 (4). P. 655–670. DOI: [10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x](https://doi.org/10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x)
9. Onaka, H. Biosynthesis of indolocarbazole and goadsporin, two different heterocyclic antibiotics produced by *Actinomycetes* // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2009. V. 73 (10). P. 2149–2155. DOI: [10.1271/bbb.90263](https://doi.org/10.1271/bbb.90263)
10. Zharikova N.V., Iasakov T.R., Zhurenko E.I. et al. Bacterial genes of non-heme iron oxygenases, which have a rieske-type cluster, catalyzing initial stages of degradation of chlorophenoxyacetic acids // *Russian Journal of Genetics*. 2018. T. 54 (3). P. 284–295. DOI: [10.1134/S1022795418030171](https://doi.org/10.1134/S1022795418030171)

Цитировать как

Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В. Таксономическое разнообразие природных бактериальных деструкторов фенола и его хлорпроизводных в промышленных экотопах г. Уфы // *Экобиотех*, 2022, Т. 5 (4). С. 161-167. DOI: [10.31163/2618-964X-2022-5-4-161-167](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2022-5-4-161-167), EDN: MSZUZK

Cited as

Korobov V.V., Zhurenko E.I., Zharikova N.V. Taxonomic diversity of natural bacterial degraders of phenol and its chlorine derivatives industrial environment of the Ufa city. *Èkobioteh*. V. 5 (4). P. 161-167. DOI: [10.31163/2618-964X-2022-5-4-161-167](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2022-5-4-161-167), EDN: MSZUZK (In Rus.)