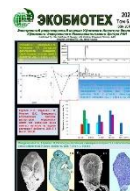




ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>


АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ ПРОМЫШЛЕННОГО ЭКОТОПА Г. УФЫ ПО ОТНОШЕНИЮ К ХЛОРФЕНОКСИУКСУСНЫМ КИСЛОТАМ

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

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

*E-mail: puzzle111@yandex.ru

Исследована способность природных изолятов промышленного экотопа г. Уфы отдельно использовать 4-хлорфеноксиуксусную (4-ХФУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусную (2,4-Д) и 2,4,5-трихлорфеноксиуксусную (2,4,5-Т) кислоты в качестве единственного источника углерода и энергии. Из одиннадцати штаммов у восьми был выявлен рост на всех трех кислотах, один вырос только на 4-ХФУК и 2,4-Д, и один – на 4-ХФУК. Лишь одна культура не проявила активности по отношению к исследованным субстратам. Анализ взаимоотношений изолятов показал, что почти все исследованные штаммы, кроме одного, не проявили антагонистического воздействия по отношению друг к другу, что говорит о возможности совместного применения их в составе консорциумов для очистки окружающей среды от хлорароматических соединений.

Ключевые слова: штаммы-деструкторы ♦ хлорфеноксиуксусные кислоты ♦ биодegradация ♦ антагонизм ♦ ремедиация

Поступила в редакцию: 07.11.2023

[Цитировать | Cite as](#)

DOI: [10.31163/2618-964X-2023-6-4-211-216](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2023-6-4-211-216)

EDN: [PVQDXO](https://www.edn.ru/PVQDXO)

ВВЕДЕНИЕ

Галогеносодержащие производные фенола, к которым относятся и хлорфеноксиуксусные кислоты, интенсивно применяются в нефтехимических производствах, а также в агротехнологиях. Эти соединения используются в качестве действующих веществ многих системных гербицидов, служат компонентами производства лекарств, красителей, вследствие чего становится возможным их попадание в окружающую среду. Большинство из хлорароматических веществ обладают токсичными и канцерогенными эффектами.

ACTIVITY OF BACTERIAL ISOLATES FROM THE INDUSTRIAL ECOTOPE OF THE CITY OF UFA IN RELATION TO CHLOROPHENOXYACETIC ACIDS

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

The ability of natural isolates from the industrial ecotope of the city of Ufa to separately use 4-chlorophenoxyacetic (4-CPAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic (2,4,5-T) acids as the only source of carbon and energy was studied. Of the eleven strains, eight showed growth on all three acids, one grew only on 4-CPA and 2,4-D, and one grew on 4-CPA. Only one culture did not show activity towards the studied substrates. An analysis of the relationships between the isolates showed that almost all of the studied strains, except one, did not exhibit an antagonistic effect in relation to each other, which suggests the possibility of their joint use as part of consortia for cleaning the environment from chloroaromatic compounds.

Keywords: degrader strain ♦ chlorophenoxyacetic acids ♦ biodegradation ♦ antagonism ♦ remediation

Принято в печать: 27.11.2023



Одним из перспективных направлений очистки окружающей среды является микробная деструкция загрязнителей. Поэтому изучение структуры и функционирования консорциумов бактерий, способных к конверсии галогенированных субстратов, все более актуально.

К настоящему времени описан ряд бактериальных штаммов-деструкторов хлорфеноксиуксусных кислот [Zameer et al, 2023; Pan et al, 2022; Wu et al, 2017; Xia et al, 2017; см. ссылки обзоров Жарикова и др., 2017; Жарикова и др., 2018]. Вместе с тем поиск и исследование аборигенных микроорганизмов играют значительную роль в решениях проблемы ремедиации определенных территорий с учетом их лучшей приспособленности к климату и условиям окружающей среды.

Одним из важных условий совместного использования штаммов в качестве микробных композиций является исследование межбактериальных взаимоотношений, которые в значительной степени определяются их физиолого-биохимическими особенностями.

Цель работы – исследование субстратной активности природных штаммов, изолированных из образцов почв промышленного экотопа г. Уфы, по отношению к хлорфеноксиуксусным кислотам, а именно: 4-хлорфеноксиуксусной (4-ХФУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусной (2,4-Д) и 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной (2,4,5-Т).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов в данную работу были привлечены природные бактериальные штаммы, ранее выделенные нами из образцов почв, отобранных на территории, загрязненной отходами химического производства г. Уфы, обозначенной нами как экотоп VI.

Активность исследуемых изолятов по отношению к хлорфеноксиуксусным кислотам оценивали визуально по наличию/отсутствию роста в минимальной солевой среде М9 следующего состава (г/л): Na_2HPO_4 – 6.0; KH_2PO_4 – 3.0; NaCl – 0.5; NH_4Cl – 1.0 [Маниатис и др., 1984]. Штаммы культивировали в мясопептонном бульоне (МПБ) при температуре 28°C в продолжение 18 часов, после чего их пересеивали в солевую среду М9, содержащую в качестве источника углерода и энергии хлорфеноксиуксусные кислоты, а именно: 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т в концентрации 100 мг/л, внесенные отдельно. Исследуемые изоляты инкубировали в течение 7 дней при температуре 28°C.

Межбактериальные взаимоотношения изолятов исследовали, используя два метода: метод перпендикулярных штрихов и метод агаровых блоков [Нетрусов, 2005]. В случае первого метода на поверхность агаризованной среды (МПА) в чашке Петри засеивали штрихом предполагаемый продуцент по диаметру чашки и затем инкубировали при температуре 28°C в течение 48 ч. Далее, к выросшему штриху подсеивали перпендикулярно штрихами тест-организмы. Чашки вновь помещали в термостат на 48 часов. О наличии и степени антагонистической активности у исследуемых штаммов судили по присутствию/отсутствию зоны роста тест-культуры на границе со штрихом продуцента.

Чем больше расстояние от роста самого антагониста, тем более чувствителен тест-штамм к антибиотическому веществу, которое образует продуцент, в то время как нечувствительные культуры будут расти вблизи от штриха продуцента.

При использовании метода агаровых блоков предполагаемый штамм-продуцент высевали на поверхность МПА среды и растирали шпателем для образования сплошного газона. После инкубации при 28°C в течение 3–5 суток, стерильным пробочным сверлом вырезали блоки из среды с газоном продуцента и переносили их на поверхность среды в другой чашке Петри, непосредственно перед этим засеянной тест-организмом, устанавливая их ростом вверх на равном расстоянии один от другого и от краев чашки. Образование зоны задержки роста засеянного штамма вокруг агаровых блоков после инкубации в продолжение 3 суток свидетельствовало о наличии антагонистической активности продуцента по отношению к исследуемой тест-культуре.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследований был проведен анализ активности одиннадцати штаммов, изолированных ранее из образцов почв промзоны г. Уфы, обозначенной нами как экотоп VI, по отношению к хлорфеноксиуксусным кислотам, а именно: 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т. Эксперименты проводились на минимальной солевой среде М9, разделяющей вышеуказанные соединения в качестве единственного источника углерода и энергии. Данные, характеризующие способность штаммов к конверсии использованных в работе субстратов, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Рост бактериальных штаммов на хлорфеноксиуксусных кислотах, использованных в качестве единственных источников углерода и энергии

Экотоп	№	Штамм	Рост на субстратах		
			4-ХФУК	2,4-Д	2,4,5-Т
VI	1.	C3-1a	+	+	+
	2.	C3-1b	+	+	+
	3.	C3-3c	–	–	–
	4.	C3-13	+	+	–
	5.	C5-1	+	+	+
	6.	C5-2	+	+	+
	7.	C5-3	+	+	+
	8.	C5-5a	+	+	+
	9.	C5-6	+	+	+
	10.	C5-9	+	–	–
	11.	C7-1	+	+	+

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

Как следует из таблицы 1, восемь штаммов оказались способны к росту на всех трех кислотах. Один штамм, а именно: С3-13, показал активность в отношении к 4-ХФУК и 2,4-Д, но не к 2,4,5-Т. Ещё один изолят (С5-9) проявил рост только на 4-ХФУК и не вырос на двух остальных кислотах. И только одна культура С3-3с не росла ни на одном из субстратов, привлеченных в данное исследование.

Антагонистические взаимоотношения исследуемых изолятов проводили методом перпендикулярных штрихов. Преимущество этого метода заключается в том, что он позволяет одновременно проверить чувствительность большого числа культур к предполагаемому антагонисту. Также для более объективной оценки полученных данных дополнительно был применен метод агаровых блоков.

Результаты исследования межбактериальных взаимодействий представлены в таблице 2.

Таблица 2. Межбактериальные взаимодействия культур экотопа VI

Продуцент Тест-организм	С3-1a	С3-1b	С3-3с	С3-13	С5-1	С5-2	С5-3	С5-5a	С5-6	С5-9	С7-1
С3-1a	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
С3-1b	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
С3-3с	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
С3-13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
С5-1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
С5-2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
С5-3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
С5-5a	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
С5-6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
С5-9	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
С7-1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Примечание: «—» – отсутствие зоны ингибирования роста тест-штамма, «+» – наличие зоны ингибирования роста тест-штамма.

Как видно из таблицы 2, почти все исследованные штаммы не проявили антагонистического воздействия по отношению друг к другу – рост большей части тест культур происходил в непосредственной близости от штрихов продуцентов. И лишь в случае совместного культивирования изолятов С5-9, выступающего в роли продуцента, и С3-1b, используемого в качестве тест-организма, наблюдалось наличие зоны

ингибирования роста последнего. Для подтверждения этого результата был также применен метод агаровых блоков, в ходе которого были обнаружены зоны отсутствия роста вокруг блоков штамма С5-9 при размещении их на засеянной в виде газона культуре С3-1b.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что у восьми изолятов промышленного экотопа VI был выявлен рост на всех трех кислотах. Кроме того, один штамм проявил активность по отношению к 4-ХФУК и 2,4-Д, но не к 2,4,5-Т, один – только к 4-ХФУК, а у единственной культуры не был отмечен рост ни на одном из субстратов.

Отсюда следует, что штаммы экотопа VI не показали явного предпочтения к определенной хлорфеноксиуксусной кислоте как к субстрату. Единичные штаммы не конвертировали некоторые хлорфеноксиуксусные кислоты, но подавляющее большинство изолятов хорошо росло на всех вышеуказанных субстратах, что может быть связано с местом их выделения – территории крупнотоннажного производства хлорфеноксиуксусных кислот.

Стоит отметить, что в предыдущих исследованиях природных штаммов экотопа VI нами была выявлена способность некоторых из них отдельно использовать 2,5-ДХФ и 2,4,6-ТХФ в качестве единственного источника углерода и энергии. Два изолята (С5-3 и С5-9), привлеченные в представленную работу, выросли на обоих вышеуказанных хлорфенолах. Помимо этих культур, еще 3 штамма, а именно: С5-1, С5-2 и С5-6, оказались способными использовать 2,4,6-ТХФ как источник углерода [Жарикова и др., 2020].

Таким образом, культуры С5-1, С5-2, С5-3 и С5-6 проявили активность по отношению к четырем и более субстратам, поэтому они особенно интересны в перспективе их применения для ремедиации территорий от сложных мультифакторных загрязнений.

Изучение межбактериального взаимодействия изолятов выявило, что большинство культур, использованных в качестве продуцентов (10 из 11), не оказывают негативного воздействия на тест-организмы. Только штамм С5-9 препятствовал росту тест-культуры С3-1b, о чем свидетельствовало наличие зоны ингибирования.

Учитывая полученные данные, следует отметить, что для создания эффективного консорциума с целью конверсии хлорфеноксикислот необходимо избегать совместного применения штаммов С5-9 и С3-1b из-за наличия у них антагонистических взаимодействий.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России по теме № 220131100163-4. При проведении исследований использовали оборудование ЦКП «Агидель» УФИЦ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Журенко Е.Ю. и др. Бактериальные гены инициации деградации 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, кодирующие α -кетоглутарат-

- зависимую диоксигеназную активность // Успехи современной биологии. 2017. Т. 137. С. 514-528. DOI: [10.7868/S0042132417050076](https://doi.org/10.7868/S0042132417050076)
2. Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Журенко Е.Ю. и др. Бактериальные гены инициации деградации хлорфеноксиуксусных кислот, кодирующие негемовые железосодержащие оксигеназы с кластером риске-типа // Генетика. 2018. Т. 54. С. 292-305. DOI: [10.7868/S0016675818030025](https://doi.org/10.7868/S0016675818030025)
 3. 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)
 4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
 5. Практикум по микробиологии. Уч. пособие для вузов / Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Академия, 2005. 608 с.
 6. Pan D., Xu Y., Ni Y. et al. The efficient persistence and migration of *Cupriavidus gilardii* T1 contribute to the removal of MCPA in laboratory and field soils // Environ Pollut. 2022. V. 304. P. 119-220. DOI: [10.1016/j.envpol.2022.119220](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119220)
 7. Wu X., Wang W., Liu J. et al. Rapid biodegradation of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by *Cupriavidus gilardii* T-1 // J Agric Food Chem. 2017. V. 65. №18. P. 3711-3720. DOI: [10.1021/acs.jafc.7b00544](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00544)
 8. Xia Z.Y., Zhang L., Zhao Y. et al. Biodegradation of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by a new isolated strain of *Achromobacter* sp. LZ35 // Curr. Microbiol. 2017. V. 74. № 2. P. 193-202. DOI: [10.1007/s00284-016-1173-y](https://doi.org/10.1007/s00284-016-1173-y)
 9. Zameer M., Tahir U., Khalid S. et al. Isolation and characterization of indigenous bacterial assemblage for biodegradation of persistent herbicides in the soil // Acta Biochim Pol. 2023. V. 70. № 2. C325-334. DOI: [10.18388/abp.2020_6563](https://doi.org/10.18388/abp.2020_6563)

Цитировать как

Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Коробов В.В. Активность бактериальных изолятов промышленного экотопа г. Уфы по отношению к хлорфеноксиуксусным кислотам // Экобиотех, 2023. Т. 6. № 4. С. 211-216. DOI: [10.31163/2618-964X-2023-6-4-211-216](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2023-6-4-211-216). EDN: PVQDXO

Cited as

Zhurenko E.I., Zharikova N.V., Korobov V.V. Activity of bacterial isolates from the industrial ecotope of the city of Ufa in relation to chlorophenoxyacetic acids. *Ékobioteh.* 2023, V. 6 (4). P. 211-216. DOI: [10.31163/2618-964X-2023-6-4-211-216](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2023-6-4-211-216). EDN: PVQDXO (In Rus.)