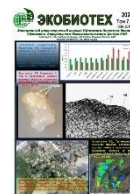




# ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>

## ШТАММ *ACHROMOBACTER* SP 36P – ДЕСТРУКТОР 2,4,5- ТРИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

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

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

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

Проведена идентификация природного штамма, выделенного из образца почв промышленной зоны г. Уфы. По результатам анализа физиолого-биохимических данных и последовательности гена 16S рДНК таксономическое положение изолята было определено до рода *Achromobacter*. Штамм обозначили как *Achromobacter* sp 36P. Исследована субстратная активность культуры по отношению к 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоте (2,4,5-Т). Изолят утилизировал 2,4,5-Т в концентрации 100 мг/л в течение 5 суток, при этом наблюдалось уменьшение количества субстрата на 73% от исходного значения.

**Ключевые слова:** *Achromobacter* ♦ 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота ♦ штаммы-деструкторы ♦ биодegradация ♦ ремедиация

Поступила в редакцию: 03.07.2024

[Цитировать | Cite as](#)

DOI: [10.31163/2618-964X-2024-7-2-118-123](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2024-7-2-118-123)

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

## ВВЕДЕНИЕ

Род *Achromobacter* был впервые определен в 1923 году Комитетом Общества американских бактериологов (сегодня Американское общество микробиологии) как «непигментообразующие, подвижные или неподвижные грамтрицательные бактерии, встречающиеся в воде и почве. Близкое сходство рода *Achromobacter* с родом *Alcaligenes*, оба из которых являются членами семейства *Alcaligenaceae* отряда *Burkholderiales*, привело к отнесению нескольких видов *Achromobacter* к роду *Alcaligenes* и наоборот. Род *Achromobacter* интенсивно пополняется, в настоящее время включает 19 официально обозначенных видов, большинство из которых были охарактеризованы в течение последнего десятилетия. Представители этого рода широко распространены в водных средах обитания, но также могут быть причинами оппортунистических инфекций у людей. Например, *Achromobacter xylosoxidans* способен вызывать персистирующую инфекцию дыхательных путей у пациентов с муковисцидозом, в то время как три близкородственных *A. ruhlandii*, *A. piechaudii* и *A. denitrificans*, являющиеся почвенными комменсалами, представленными очень ограниченным числом описанных штаммов, не являются патогенными для людей [Isler et al., 2020].

Некоторые штаммы, принадлежащие к роду *Achromobacter*, рассматриваются как репрезентативные бактерии с потенциалом биоремедиации, поскольку сообщалось

## STRAIN *ACHROMOBACTER* SP 36P – DESTRUCTOR OF 2,4,5- TRICHLOROPHOXYACETIC ACID

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

A natural strain isolated from a soil sample from an industrial zone in Ufa was identified. Based on the results of analysis of physiological and biochemical data and the 16S rDNA gene sequence, the taxonomic position of the isolate was determined to the genus *Achromobacter*. The strain was designated *Achromobacter* sp 36P. The substrate activity of the culture in relation to 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) was studied. The isolate utilized 2,4,5-T at a concentration of 100 mg/l for 5 days, and a decrease in the amount of substrate by 73% of the initial value was observed.

**Keywords:** *Achromobacter* ♦ 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid ♦ degrader strain ♦ biodegradation ♦ remediation

Принято в печать: 25.07.2024



о разнообразных биоремедиационных свойствах таких бактериальных популяций, например, катаболизме бифенилов [Furukawa et al., 1989], разложении углеводов [Deng et al., 2014], а также деградации хлорароматических субстратов, в частности 2-хлорбензойной и 2,5-дихлорбензойной кислот [Jencova et al., 2008].

Известно, что хлорароматические соединения как загрязнители окружающей среды представляют собой значительную опасность, в связи с их токсичными, мутагенными и канцерогенными свойствами. Они являются устойчивыми к разложению и, как следствие, могут накапливаться в экосистемах и постепенно распространяться по пищевым цепям.

Следует отметить, что существенные количества загрязнителей этого ряда были накоплены в зоне производства пестицидов на территории Уфимского промузла. Одним из таких гербицидов является 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота (2,4,5-Т). Наличие в молекуле трех атомов хлора, два из которых в *орто*-положении, делает 2,4,5-Т недоступным или малодоступным источником углерода и энергии для большинства микроорганизмов.

Перспективным представляется поиск и исследование эффективных изолятов в сложившихся зонах загрязнений, так как имеются свидетельства того, что штаммы-деструкторы могут формироваться в результате длительного воздействия ксенобиотиков.

Цель работы – определение таксономического положения природного штамма, выделенного из образца почв промышленной зоны г. Уфы, и исследование его субстратной активности по отношению к 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоте (2,4,5-Т).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований был выбран природный бактериальный изолят, выделенный из образца почв промышленной зоны г. Уфы и обозначенный нами как 36P.

Культуральные и физиолого-биохимические свойства исследуемого штамма определяли согласно методическому руководству [Gerhardt, 1981].

Морфометрические характеристики были изучены с помощью просвечивающей электронной микроскопии на микроскопе H-300 («Hitachi», Япония) при увеличении 18000 (75 кВ).

Для определения последовательностей гена 16S рРНК из клеток исследуемого штамма выделяли геномную ДНК и проводили ПЦР с последующим секвенированием ПЦР-фрагментов по методике, описанной ранее [Zharikova et al., 2024].

Поиск гомологичных генов 16S рРНК исследованного штамма последовательностей был проведен в базе данных GenBank с помощью программного пакета BLAST. Множественное выравнивание и построение филогенетического дерева выполнено посредством программ CLUSTAL W и MEGA 5 [Zharikova et al., 2024].

Динамики роста и утилизации 2,4,5-Т определяли в процессе периодического культивирования на минимальной солевой среде следующего состава (г/л):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 1.5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1.5;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 1. В среду добавляли 2,4,5-Т в концентрации 100 мг/л, которая служила единственным источником углерода. Изолят выращивали в термостатируемой установке УВМТ-12-250 («Элион», Россия) при температуре 28°C при 120 об./мин. Оптическую плотность ( $\text{ОП}_{590}$ ) клеточной суспензии, по которой определяли динамику роста штамма, измеряли с использованием фотокolorиметра КФК-2 («ЗОМЗ», Россия).

Содержание количества 2,4,5-Т в среде определяли согласно руководству [Клисенко, 1984] с небольшими модификациями, описанными ранее в статье Жариковой с соавт. [Zharikova et al., 2024].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

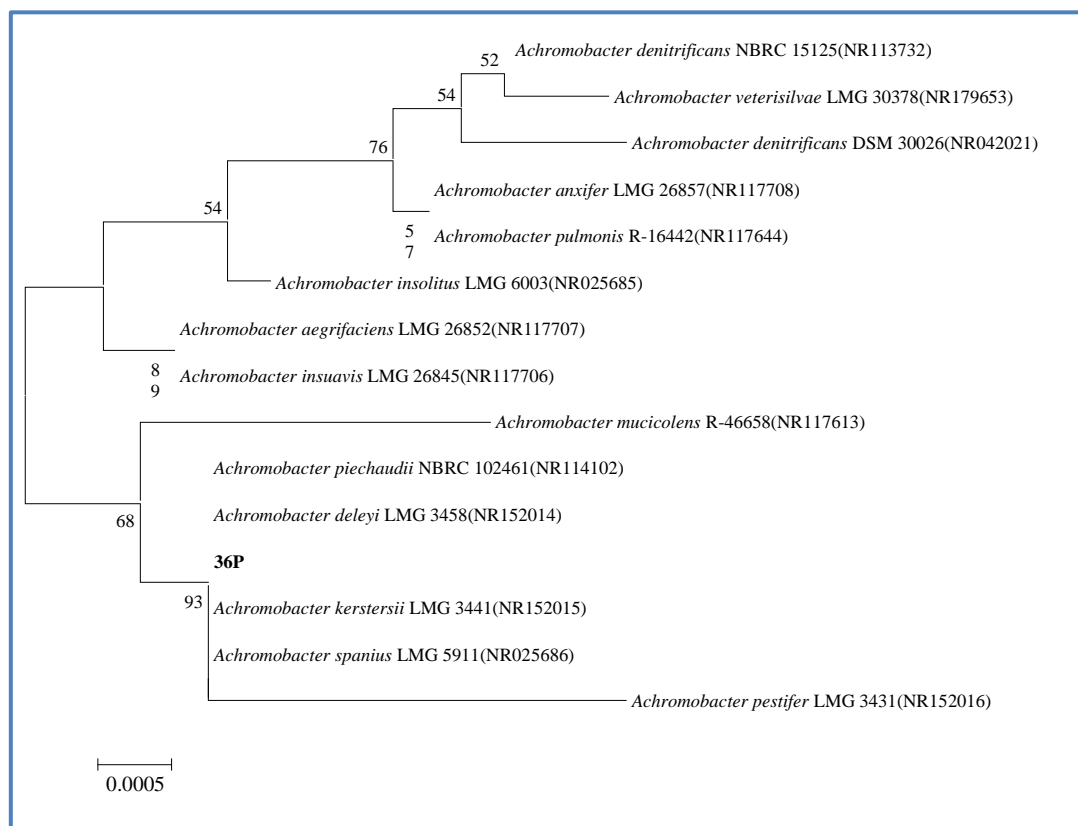
Анализ морфологических признаков культуры 36P показал, что при росте штамма на агаризованной пептоно-глюкозной среде образовывались полупрозрачные, гладкие блестящие колонии с плоским ворсинчатым краем. Оптимальный рост наблюдался в диапазоне от 20°C до 37°C, при pH 6.8. Культура метаболизировала арабинозу, мальтозу, рамнозу и глицерин, а также использовала D-глюкозу и D-ксилозу с образованием кислоты. Реакция Фогеса-Проскауэра положительная. Подвижные грамотрицательные клетки культуры были способны продуцировать буроватый внеклеточный пигмент. Клетки обладали каталазной активностью, но не лизиндекарбоксилазной и аргининдигидролазной, не осуществляли гидролиз желатин.

Культура 36P была представлена одиночными клетками в форме овала и короткими прямыми палочками размерами 0.66/1.05-1.4 мкм.

Для выделенного изолята была определена практически полная последовательность (1485 п.н.) амплификата гена, кодирующего 16S рРНК,

Наибольшее сходство с исследуемой культурой показали бактерии рода *Achromobacter*, такие как *Achromobacter deleyi* LMG 3458 (уровень идентичности 99.7%), *Achromobacter kerstersii* LMG 3441T (уровень идентичности 99.7%), *Achromobacter piechaudii* NBRC 102461 (уровень идентичности 99.7%) и *Achromobacter spanius* LMG 5911 (уровень идентичности 99.8%)

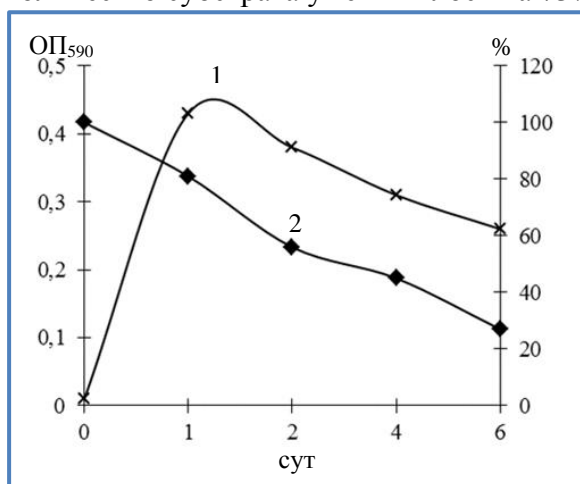
С типовыми штаммами *A. deleyi* LMG 3458, *A. kerstersii* LMG 3441, *A. spanius* LMG 5911 и *A. piechaudii* NBRC 102461 исследуемая культура образовывала кластер с высоким уровнем достоверности – значение бутстреп анализа равно 93 (рис. 1).



**Рис. 1.** Филогенетическое дерево 16S рРНК штамма 36P и гомологичных ему последовательностей типовых видов бактерий рода *Achromobacter*, построенное методом «Neighbor-Joining». Цифрами указана достоверность ветвления, рассчитанная с помощью «bootstrap»-анализа (значимыми признаются величины больше 50). Масштаб отражает эволюционное расстояние, соответствующее 5 нуклеотидных замен на каждые 10000 нуклеотидов. В скобках указаны номера последовательностей в базе данных (GenBank).

Обнаруженный уровень сходства последовательностей 16S рНК позволяет отнести изучаемый штамм 36P к роду *Achromobacter*.

В ходе дальнейшей работы было установлено, что штамм *Achromobacter* sp. 36P способен к утилизации 2,4,5-Т в качестве единственного источника углерода и энергии. При росте в периодической культуре значение оптической плотности (ОП) клеточной суспензии достигало максимальной величины (0.43 ОЕ) уже на 1 сут инкубации, при этом уменьшение субстрата составило 19% от исходного. В последующие 5 суток культивирования наблюдалось плавное снижение ОП клеточной суспензии, при этом количество субстрата уменьшилось на 73% от начальной величины (рис. 2).



**Рис. 2. Зависимость значений ОП<sub>590</sub> клеточной суспензии (1) и концентрации 2,4,5-Т (2) от времени инкубации штамма *Achromobacter* sp 36P в периодической культуре.**

## ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из рисунка 1 на филогенетическом древе 16S рНК последовательность исследуемого штамма образует кластер с гомологичных ему последовательностей четырех типовых видов бактерий рода *Achromobacter*: *A. deleyi* LMG 3458, *A. kerstersii* LMG 3441, *A. spanius* LMG 5911 и *A. piechaudii* NBRC 102461. При этом в основном из природных образцов выделены виды *A. kerstersii* и *A. piechaudii*, а из клинических – *A. deleyi* и *A. spanius* [Vandamme et al., 2016; Coenye et al., 2003].

Стоит отметить, что обычными методами *Achromobacter* spp. часто ошибочно идентифицируются как другие распространенные (такие как *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter* spp., *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter* spp.) или редкие (например, *Pandora* spp. или *Ralstonia* spp.) неферментирующие грамотрицательные бактерии из-за их биохимического сходства. Кроме того, традиционными методами большинство видов ахромобактерий относят к виду *A. xylosoxidans*. Постоянно меняющаяся таксономия и высокая степень идентичности последовательностей 16S рДНК среди видов *Achromobacter* затрудняют определение их естественной истории, судьбы в окружающей среде и факторов риска заражения. Более точное определение вида стало возможным благодаря использованию генотипических методов, таких как секвенирование генов *nrdA* и мультилокусное сиквенс-типирование. [Liu et al., 2002; Isler et al., 2020].

Таким образом, по результатам анализа физиолого-биохимических данных и последовательности гена 16S рДНК исследованный штамм может быть идентифицирован нами только до рода *Achromobacter*.

Из данных, приведенных на рисунке 2, следует, что *Achromobacter* sp 36P способен к утилизации 2,4,5-Т, при этом в течение 5 суток происходило уменьшение ее количества на 73% от исходного значения.

Стоит заметить, что изолятов, осуществляющих биodeградацию 2,4,5-Т, описано гораздо меньше по сравнению, например, с культурами, метаболизирующих близкий по химической структуре гербицид 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту. Среди наиболее

исследованных – штамм-деструктор *Burkholderia phenoliruptrix* AC1100, утилизирующий более 97% 2,4,5-Т в концентрации 1 мг/мл [Kilbane et al., 1982]. Другая культура, *Nocardioides simplex* 3E, была способна полностью конвертировать 2,4,5-Т в концентрации 0.04 мМ [Golovleva, et al, 1990].

Описанные нами ранее штаммы *Raoultella planticola* 33-4ch, *Raoultella planticola* 36D, *Raoultella planticola* 36T, *Cellulosimicrobium* sp. NPZ-121 и *Serratia* sp. 22S также были способны использовать 2,4,5-Т в качестве основного источника углерода и энергии. Так, *R. planticola* 33-4ch утилизировал 2,4,5-Т на 51%, *R. planticola* 36D – на 75% и *R. planticola* 36T – на 45% от начальной концентрации 100 мг/л [Zharikova et al., 2021]. Что касается *Cellulosimicrobium* sp. NPZ-121 и *Serratia* sp. 22S, то при культивировании их на среде с такой же концентрацией 2,4,5-Т наблюдалось снижение содержания субстрата на 75 и 72%, соответственно, от исходного количества. [Korobov et al., 2018; Zharikova et al., 2024].

Таким образом, в ходе работы была проведена идентификация природного штамма, выделенного из образца почв промышленной зоны г. Уфы. Было показано, что *Achromobacter* sp 36P проявил субстратную активность по отношению к 2,4,5-Т и с высокой эффективностью утилизировал это соединение в концентрации 100 мг/л, что свидетельствует о его перспективности как агента в технологиях ремедиации загрязненных территорий.

#### 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. Методы определения микроколичеств пестицидов. /Ред. М.А. Клисенко М.: Медицина, 1984. 256 с.
2. Coenye T., Vancanneyt M., Falsen E. et al. *Achromobacter insolitus* sp. nov. and *Achromobacter spanius* sp. nov., from human clinical samples // IJSEM. 2003. V. 53. P. 1819–1824. DOI: [10.1099/ijse.0.02698-0](https://doi.org/10.1099/ijse.0.02698-0)
3. Deng M., Li J., Liang F. et al. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the DayaBay, southern China // Mar. Pollut. Bull. 2014. V. 83. P. 79–86. DOI: [10.1016/j.marpolbul.2014.04.018](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.04.018)
4. Furukawa K., Hayase N., Taira K. et al. Molecular relationship of chromosomal genes encoding biphenyl/polychlorinated biphenyl catabolism: some soil bacteria possess a highly conserved bph operon. // J. Bacteriol. 1989. V. 171. P. 5467–5472. DOI: [10.1128/jb.171.10.5467-5472.1989](https://doi.org/10.1128/jb.171.10.5467-5472.1989)
5. Golovleva L.A., Pertsova R.N., Evtushenko L.I. et al. Degradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by a *Nocardioides simplex* culture// Biodegradation. 1990. V. 1. № 4. P. 263–271. DOI: [10.1007/BF00119763](https://doi.org/10.1007/BF00119763)
6. Isler B., Kidd T., Stewart P. et al. *Achromobacter* Infections and Treatment Options // Antimicrob Agents Chemother. 2020. 64. DOI: [10.1128/AAC.01025-20](https://doi.org/10.1128/AAC.01025-20)
7. Jencova V., Strnad H., Chodora Z. et al. Nucleotide sequence, organization and characterization of the (halo)aromatic acid catabolic plasmid pA81 from *Achromobacter*

- xylooxidans* A8. // Res. Microbiol. 2008. V. 159. P. 118–127. DOI: [10.1016/j.resmic.2007.11.018](https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.11.018)
8. Kilbane J.J., Chatterjee D.K., Karns J.S., Kellogg S.T., Chakrabarty A.M. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*// Appl. Environ. Microbiol. 1982. V. 44. № 1. P. 72–78. DOI: [10.1128/aem.44.1.72-78.1982](https://doi.org/10.1128/aem.44.1.72-78.1982)
  9. Liu L., Coenye T., Burns J., et al. Ribosomal DNA-directed PCR for identification of *Achromobacter (Alcaligenes) xylooxidans* recovered from sputum samples from cystic fibrosis patients // J. Clin. Microbiol. 2002. Vol. 40. No. 4. P. 1210–1213. DOI: [10.1128/jcm.40.4.1210-1213.2002](https://doi.org/10.1128/jcm.40.4.1210-1213.2002)
  10. Manual of methods for general bacteriology / Ed. P. Gerhardt. Washington: American Society for Microbiology, 1981. 536 p.
  11. Vandamme P., Peeters C., Ingan E., et al. Taxonomic dissection of *Achromobacter denitrificans* Coenye et al. 2003 and proposal of *Achromobacter agilis* sp. nov., nom. rev., *Achromobacter pestifer* sp. nov., nom. rev., *Achromobacter kerstersii* sp. nov. and *Achromobacter deleyi* sp. nov. // IJSEM. 2016. V. 66. 3708–3717 DOI: [10.1099/ijsem.0.001254](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001254)
  12. Zharikova N.V., Iasakov T.R., Zhurenko E.I., et al. Plasmids of the chlorophenoxyacetic-acid degradation of bacteria of the genus *Raoultella* // Appl. biochem. microbiol. 2021. V. 57. № 3. P. 335–343. DOI: [10.1134/S0003683821030157](https://doi.org/10.1134/S0003683821030157)
  13. 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. V. 87. № 1. P. 147–150. DOI: [10.1134/S0026261718010101](https://doi.org/10.1134/S0026261718010101)
  14. Zharikova N.V., Zhurenko E.I., Korobov V.V., et al. Metabolic potential of *Serratia* sp. 22s for chlorphenoxyacetic acids conversion // Appl. biochem. microbiol. 2024. V.60. № 1. P. 55–63. DOI: [10.1134/S0003683824010204](https://doi.org/10.1134/S0003683824010204)

Цитировать как

Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В. Штамм *Achromobacter* sp 36p – деструктор 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты // Экобиотех, 2024, Т. 7 № 2. С. 118-123. DOI: [10.31163/2618-964X-2024-7-2-118-123](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2024-7-2-118-123) EDN: WSGTPL

Cited as

Zharikova N.V., Zhurenko E.I., Korobov V.V. Strain *Achromobacter* sp 36p – destructor of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid. *Ekobioteh*. 2024, V.7 (2). P.118-123. DOI: [10.31163/2618-964X-2024-7-2-118-123](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2024-7-2-118-123) EDN: WSGTPL (In Rus.)