ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru

БИОРАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ ФЕНОЛА И ЕГО ХЛОРИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПОЧВ ПРОМЗОНЫ Г. УФЫ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ ОТХОДАМИ ХИМИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

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

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН
E-mail: puzzle111@yandex.ru

Проведен анализ 7-ми почвенных проб промзоны г.Уфы Республики Башкортостан, который показал, что в исследуемых бактериальных популяциях превалировали актиномицеты. Из данных почвенных образцов было выделено 56 штаммов бактерий. Среди них: деструкторов фенола – 31; 2,4-ДХФ – 28; 4-ХФУК – 29; 2,4-Д – 26 и 2,4,5-Т – 20 культур, соответственно. С увеличением степени галогенирования субстрата наблюдалось уменьшение количества штаммов-деструкторов, способных к его конверсии.

Ключевые слова: биодеградация, фенол, 2,4-дихлорфенол (2,4-ДХФ), 4-хлорфеноксиуксусная кислота (4-ХФУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота (2,4,5-Т)

BIODIVERSITY OF THE BACTERIA DEGRADERS OF PHENOL AND ITS CHLORINATED DERIVATIVES WHICH WERE ISOLATED FROM THE SOILS (INDUSTRIAL ZONE, UFA CITY) CONTAMINATED WITH CHEMICAL WASTE

Zharikova N.V., Iasakov T.R., Korobov V.V., Zhurenko E.I.

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa
E-mail: puzzle111@yandex.ru

The analysis of 7 soil samples from the industrial zone of Ufa city (Republic of Bashkortostan) showed prevalence of a actinomycetes in the bacterial populations. The 56 bacterial strains were isolated from these soil samples. Among them phenol degraders were – 31, 2,4-DCP – 28, 4-CPA – 29, 2,4-D – 26, and 2,4,5-T – 20 cultures, respectively. With an increase of the degree of substrate chlorination, a decrease in the number of degrader strains capable of its conversion was observed.

Keywords: biodegradation, phenol, 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), 4-chlorophenoxyacetic acid (4-CPA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)

Поступила в редакцию: 11.07.2019

DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-416-419

ВВЕДЕНИЕ

Фенол и его хлорированные производные широко используются в качестве противомикробных средств, пестицидов древесных консервантов, а также для синтеза красителей и лекарств [Czaplicka, 2004, Olaniran and Igbinosa, 2011]. Они представляют опасность для окружающей среды и здоровья человека вследствие своих канцерогенных, мутагенных и цитотоксических свойств [Czaplicka, 2004, Igbinosa et al., 2013]. Из-за устойчивости к микробному разложению соединения данной группы стали широко распространенными загрязнителями окружающей среды, однако был выделен ряд бактериальных культур, способных к их разложению [Маркушева и др., 2004, см. ссылки обзоров Arora and Bae, 2014, Olaniran and Igbinosa, 2011, Жарикова и др., 2017]. Биологическая трансформация фенола и его хлорпроизводных микроорганизмами является эффективным и экологически чистым методом решения проблем загрязнения окружающей среды, вызванных этими соединениями [Czaplicka, 2004]

Цель работы – выделение из почвы, загрязненной отходами химического производства, новых бактериальных штаммов, способных к конверсии фенола и его хлорированных производных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящей работе были использованы образцы почв, отобранные методом случайных проб на территории промышленной зоны г.Уфы.

Образцы почвы предварительно подсушили при комнатной температуре в течение 48 ч. Бактерии, использующие органические формы азота, выявляли на мясо-пептонном агаре (МПА) как описано ранее [Журенко и др., 2003]. Для учета бациллярных форм применяли смешанный агар: МПА +сусло-агар в соотношении 1:1. Актиномицеты как микроорганизмы, способные использовать минеральные формы азота, выявляли на крахмал-аммиачном агаре (КАА).

Выделение чистых культур бактерий из образцов почвы было проведено по методу Р. Коха, при этом чистота культуры оценивалась визуальным и микроскопическим способами. Почвенную суспензию из соответствующего разведения (10^{-3} -10^{-4}) высевали на МПА и КАА. Для выявления бациллярных форм разведение 10^{-2} предварительно пастеризовали при 70°С 15 мин и затем высевали на МПА +сусло-агар (1:1) [Теппер и др., 2004].

Оценки роста изолятов на феноле и его хлорированных производных проводили на минимальной солевой среде М9 (г/л): – 0.1; Na_2HPO_4 – 6.0; KH_2PO_4 – 3.0; NaCl – 0.5; NH_4Cl – 1.0, раздельно содержащей в качестве единственного источника углерода фенол, 2,4-дихлорфенол (2,4-ДХФ), 4-хлорфеноксиуксусную кислоту (4-ХФУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) и 2,4,5-трихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4,5-Т) в конечной концентрации 100 мг/л. Культивирование проводили в 3 мл среды при температуре 28°С в течении 14 дней.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

В начале работы с территории промышленной зоны г.Уфы Республики Башкортостан были отобраны семь образцов почвы. Затем был проведен анализ состава бактериальных популяций этих почвенных образцов, результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Сравнительный анализ бактериальных групп почв промышленной зоны г. Уфы Республики Башкортостан

обозначение почвенной пробы	количество КОЕ в 1г абсолютно сухой почвы (n)		
	бактерии, (n x 10^3)	спорообразующие бактерии, (n x 10^2)	актиномицеты,(n x 10^3)
№3	1±0.22	0	53±1.66
№4	0	4±0.4	22±0.33
№5	8±0.4	2±0.6	75±0.2
№6	0	0	20±0.4
№7	6±0.33	20±0.8	40±1.2
Яма	42±0.4	0	55±1.04
Завод ТСХ	4±1.2	0	38±1.0

Бактерии, использующие органические формы азота изолированные на МПА, не были обнаружены в пробах №4 и №6. В остальных пробах, кроме образца, обозначенного «Яма», они присутствовали в незначительном количестве.

Спорообразующие бактерии не были выявлены в пробах №3 и №6, а также в образцах, обозначенных «Яма» и «Завод ТСХ». Из оставшихся трех проб в значительном количестве эта группа бактерий была обнаружена только в образце №7.

Больше всего актиномицетов было изолировано из пробы №5, однако и в остальных шести образцах они присутствовали в большом количестве.

В дальнейшем по методу Р. Коха из различающихся колоний было выделено 56 чистых культур бактерий (табл.2). Подавляющее большинство бактериальных изолятов было получено из проб №№3-5 и образца, обозначенного «Завод ТСХ». Из пробы №6 было выделено два штамма, а из образцов №7 и «Яма» - по одному.

Затем была проведена оценка способностей этих бактериальных изолятов использовать фенол и его хлорированные производные в качестве единственных источников углерода и энергии. Эксперименты проводилась на минимальной среде М9, раздельно содержащей фенол, 2,4-ДХФ, 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т (табл.2).

Таблица 2. Количество бактериальных изолятов, использующих фенол и его хлорированные производные

обозначение почвенной пробы	Всего выделено штаммов	Из них используют				
		фенол	2,4-ДХФ	4-ХФУК	2,4-Д	2,4,5-Т
№3	13	9	6	7	6	1
№4	11	10	8	6	5	4
№5	17	8	9	5	5	5
№6	2	1	1	2	2	2
№7	1	0	0	1	1	1
Яма	1	0	0	0	0	0
Завод ТСХ	11	3	4	8	7	7

Из 56 бактериальных изолятов, выделенных из семи почвенных образцов, были способны использовать фенол – 31, 2,4-ДХФ – 28, 4-ХФУК – 29, 2,4-Д – 26 и 2,4,5-Т – 20 культур, соответственно.

Деструкторы фенола и, в меньшей степени, 2,4-ДХФ превалировали в пробах №№3-5. К конверсии феноксикислот, особенно более галогенированных (2,4-Д и 2,4,5-Т), были способны заметно меньше изолятов из данных образцов.

Больше всего деструкторов хлорфеноксикислот присутствовало в образце, обозначенным «Завод ТСХ», из 11 культур - 8 росли на 4-ХФУК, и по 7 - на 2,4-Д и 2,4,5-Т.

Из образца №6 обе культуры метаболизировали хлорфеноксикислоты и только одна еще дополнительно фенол и 2,4-ДХФ.

Единственный изолят пробы №7 осуществлял деградацию всех трех хлорфеноксикислот, но не мог использовать фенол и 2,4-ДХФ.

Один штамм, выделенный из образца «Яма», оказался не способным к конверсии фенола и его хлорпроизводных.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ состава бактериальных популяций семи почвенных проб отобранных с территории промышленной зоны г.Уфы Республики Башкортостан (табл.1) показал, что в исследуемых бактериальных популяциях превалировали актиномицеты. Из данных таблицы 1 видно, что все представленные почвенные образцы кроме №7 были обеднены присутствием бациллярных форм. То же самое можно сказать и о бактериях, использующих органические формы азота, которые в значительном количестве присутствовали также только в одной пробе «Яма». Такая обедненность почвенных популяций бактерий промзоны г. Уфы, скорее всего, является следствием высокой техногенной нагрузки.

Оценка способностей 56 выделенных бактериальных культур использовать фенол и его хлорированные производные в качестве единственных источников углерода и энергии выявила наибольшее количество деструкторов фенола – 31 штамм. С увеличением степени хлорирования субстрата наблюдалось постепенное уменьшение количества штаммов-деструкторов, способных к его конверсии. Меньше всего оказалось бактериальных культур, способных использовать 2,4,5-Т – 20 штаммов.

Известно, что токсичность хлорпроизводных фенола зависит не только от степени хлорирования молекулы субстрата, но и от положения атомов хлора относительно гидроксильной группы. Токсичность субстрата увеличивается при наличии хлор-заместителя в 3-, 4- и 5-позиции [Czaplicka, 2004]. Данное обстоятельство, скорее всего, и является причиной, по которой наблюдалось уменьшение количество изолятов, способных использовать хлорированные феноксиуксусные кислоты в ряду 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Маркушева Т.В. Бактериальные гены инициации деградации 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, кодирующие α-кетоглутаратзависимую диоксигеназную активность // Успехи современной биологии. 2017. Т. 137. № 5. С. 514–528. https://doi.org/10.7868/S0042132417050076.
2. Журенко Е.Ю., Маркушева Т.В., Галкин Е.Г., Коробов В.В., Жарикова Н.В., Гафиятова Л.Р. // *Glucobacter oxydans* IBRB-2T – деструктор 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты // Биотехнология. 2003. № 6. С. 67–71.
3. Маркушева Т.В., Журенко Е.Ю., Галкин Е.Г., Коробов В.В., Жарикова Н.В., Гафиятова Л.Р. Идентификация и характеристика плазмиды штамма *Aeronomas hydrophila* IBRB-36 4CPA, несущей гены катаболизма хлорфеноксиуксусных кислот // Генетика. 2004. Т. 40. № 11. С. 1469–1476.
4. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. М.: Дрофа. 2004. 256 с.
5. Arora P.K., Bae H. Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives // Microb. Cell. Fact. 2014. V. 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. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.09.015
7. Igbinosa E.O., Odjadjare E.E., Chigor V.N., Igbinosa I.H., Emoghene A.O., Ekhaise F.O., Igiehon N.O., Idemudia O.G: Toxicological profile of chlorophenols and their derivatives in the environment: the public health perspective // The Scientific World Journal. 2013. V. 2013. P. 1–11. https://doi.org/10.1155/2013/460215.
8. Olaniran A.O., Igbinosa E.O. Chlorophenols and other related derivatives of environmental concern: properties, distribution and microbial degradation processes // Chemosphere. 2011. V. 83. P. 1297–1306. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.04.009