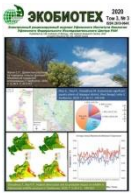
ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru



ШТАММ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* 21SG – ДЕСТРУКТОР ХЛОРФЕНОКСИУКСУСНЫХ КИСЛОТ

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

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа
*E-mail: vacikk@mail.ru

Выделен новый штамм *Pseudomonas aeruginosa* 21SG - деструктор хлорфеноксиуксусных кислот. Определение культуры проведено на основании физиолого-биохимических, культурально-морфологических и морфометрических характеристик, а также результатов сравнительного анализа последовательности гена 16S рРНК. Исследован рост периодической культуры *P. aeruginosa* 21SG на хлорфеноксиуксусных кислотах. Показана динамика уменьшения концентрации субстратов. Выявлены этапы метаболизма 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты.

Ключевые слова: штамм-деструктор, биодеградация, экотоксиканты, 4-хлорфеноксиуксусная кислота, 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота

PSEUDOMONAS AERUGINOSA STRAIN 21SG A DEGRADER OF CHLORPHENOXYACETIC ACIDS

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

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

A new strain of *Pseudomonas aeruginosa* 21SG, a chlorphenoxyacetic acid degrader, was isolated. The culture was determined on the basis of physiological, biochemical, cultural, morphological and morphometric characteristics, as well as the results of a comparative analysis of the 16S rRNA gene sequence. We studied the growth of a periodic culture of *P. aeruginosa* 21SG on chlorophenoxyacetic acids and presented the dynamics of a decrease in the concentration of substrates. The metabolic stages of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid were revealed.

Keywords: strain degrader, biodegradation, ecotoxicants, 4-chlorophenoxyacetic acid, 2,4-dichloro-phenoxyacetic acid, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid

Поступила в редакцию: 9.07.2020

DOI: 10.31163/2618-964X-2020-3-3-311-317

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии рода *Pseudomonas* широко распространены в природе. В сельскохозяйственных почвах они выполняют различные функции, включая разложение органического материала и содействие росту растений. Представители этого рода могут оказывать некоторые нежелательные эффекты: псевдомонады включают многие сапрофитные и фитопатогенные виды, а некоторые виды патогенны для человека и животных. Следует заметить, что большинство известных природных бактерий-деструкторов различных синтетических соединений, в том числе хлорароматических, относится к роду *Pseudomonas*.

Одним из наиболее широко применяемых галогенсодержащих ароматических соединений является 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д). 2,4-Д применялась в качестве селективного гербицида для обработки сельскохозяйственных культур, для уничтожения древесной кустарниковой и водной сорной растительности. На основе 2,4-Д создан ряд гербицидов, в том числе следующие: аминопелик, дезормон, дикамин-Д, дикопур Ф, луварам, октапон, эстерон, лотус Д, диален, чисталан, лонтрим, трезор, ланцет, фенфиз, октиген [Орехов и др., 1998].

2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота (2,4,5-Т) в виде кислоты, солей и эфиров использовалась для борьбы с древесной и кустарниковой растительностью, для обработки газонов, лесных угодий, пастбищ, на посевах цитрусовых. Применялась как стимулятор

роста и ускорения созревания плодов. Ввиду высокой токсичности в настоящее время это соединение запрещено к применению в Российской Федерации.

4-Хлорфеноксиуксусная кислота (4-ХФУК) синтетический пестицид и регулятор роста растений, аналогичный по своей структуре ауксинам. Применяется для повышения урожайности томатов за счёт стимулирования образования завязей и предотвращения их опадания. Промышленное значение также имеет производная 2-метил-4-хлорфеноксиуксусная кислота, используемая в качестве пестицид и гербицида.

Установлен механизм канцерогенной и опухолево-стимулирующей активности, связанной с воздействием 2,4-Д на самцов мышей [Biakley et al., 1992]. Получены данные, указывающие на то, что 2,4-Д уничтожает человеческие лимфоциты, инициируя апоптоз через прямое воздействие на митохондрии [Kaioumova et al., 2001]. 2,4-Д-бутиловый эфир вызывал нейротоксические эффекты [Schulze, Dougherty, 1988]. При исследовании свойств гербицида 2,4-Д, было отмечено, что внесение в окружающую среду 2,4-Д и ее производных приводило к подавлению численности микроорганизмов, и лишь некоторые из них обладали способностью ее метаболизировать [Krieger, 1995].

Выявлено, что 2,4,5-Т способна оказывать значительное воздействие на живые системы. В частности, 2,4,5-Т вызывала аберрации хромосом и микроядер в клетках животных и растений, индуцировала митоз, изменяла его продолжительность, вызывала сжатие хромосом. Отмечался также эффект полиплоидизации клеток, снижение фертильности, устойчивости растений и животных. Даже в небольших концентрациях 2,4,5-Т нарушала ранний оогенез и вызывала хромосомные нарушения, которые приводили к стерильности у *Drosophila melanogaster*. В ряде исследований приведены сведения о том, что соединения ароматического ряда способны оказать мутагенное действие на клетки млекопитающих [Имельбаева и др., 1998].

Обсуждаемые данные свидетельствуют о том, что перечисленные соединения высокотоксичны и обладают канцерогенным свойством.

Предполагается, что одной из причин токсичности галогенорганических соединений является труднорасщепляемая для биологических объектов галогенуглеродная связь. При этом присутствие нескольких заместителей-галогенов придает им особую устойчивость. Поэтому ксенобиотики данной группы склонны к накоплению и постепенному распространению по пищевым цепям. Значимая роль в разложении ксенобиотиков принадлежит микроорганизмам [Хазиев и др., 2000].

Представляется перспективным поиск эффективных штаммов в зонах загрязнений, так как имеются свидетельства того, что штаммы-деструкторы могут формироваться в качестве важных составляющих сообществ микроорганизмов, подвергавшихся длительному воздействию ксенобиотиков. Такие штаммы становятся частью естественной микрофлоры трансформированных экотопов, а использование чужеродных соединений в качестве источника углерода и энергии предопределяет их существенные черты и определяет экологическую нишу.

Целью данной работы было получение характеристик нового штамма *Pseudomonas aeruginosa* 21SG - деструктора хлорфеноксиуксусных кислот.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась культура 21SG, выделенная из пробы почвы находящегося в г. Уфе химического предприятия, являющегося крупным производителем синтетических дубителей.

Выделение чистой культуры 21SG было проведено на селективной среде следующего состава (г/л): $(NH_4)_2SO_4$ – 2,6; KH_2PO_4 – 2,4; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 5,6; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1,0. В качестве единственного источника углерода и энергии в среду добавляли 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т в концентрации 100 мг/л.

На основании физиолого-биохимических, культурально-морфологических и морфометрических характеристик, а также результатов сравнительного анализа последовательности гена 16S рРНК, штамм 21SG был определен как *Pseudomonas aeruginosa* [Коробов и др., 2018].

Посевной материал получали выращиванием бактерий в мясопептонном бульоне при температуре +30^{o}C. Далее культуру засевали в количестве 0,01% от объема в жидкую питательную среду следующего состава в г/л: NH_4Cl – 1; K_2HPO_4 – 5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,05; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,005; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,001; $ZnSO_4$ – 0,008; pH – 6,8–7,0. В качестве источника питания использовали 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т до конечной концентрации 100 мг/л. Инкубирование проводили в термостатированных орбитальных встряхивателях УВМТ-12-250 при 115-120 об/мин. Рост контролировали по изменению значений оптической плотности клеточной суспензии при длине волны 590 нм ($ОД_{590}$) на фотоколориметре КФК-2.

Количество хлорфеноксиуксусных кислот в культуральной жидкости определяли согласно методам [Клисенко, 1984] определения микроколичеств пестицидов с небольшими модификациями. Для анализов отбирали 10 мл культуральной жидкости, которую освобождали от клеток бактерий центрифугированием при 5 тыс. об. / мин в течение 30 мин. Далее жидкость подкисляли 1н соляной кислотой до pH 2. Затем проводили 3-кратную экстракцию хлорфеноксикислот равными объемами хлороформа, последний после экстракции удаляли отгонкой на вакуумном роторном испарителе. Экстракты метилировали, переводили в гексан и фракционировали методом тонкослойной хроматографии на пластинах Силуфол UV-254 (Чехия). Образцы сканировали при длине волны 260-280 нм в камере Хромоскана (Jouce-Loebl). Содержание 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т определяли по калибровочному графику для чистого стандарта.

Продукты катаболизма 2,4,5-Т в метилированных экстрактах определяли на хроматомасс-спектрометрической системе хроматограф HP 5890 с масс-селективным детектором HP 5972A. Условия анализа: капиллярная колонка HP-5 50 м × 0,2 мм, растворитель - гексан, температура инжектора +250^{o}C, интерфейса +250^{o}C, начальная температура колонки +40^{o}C, выдержка 6 мин., скорость нагрева 10 мин., конечная температура колонки +250^{o}C. Идентифицировали полученные соединения по совокупности данных о временах их удерживания в хроматографической колонке, данных анализа масс-спектров, основанных на зависимости структура – характер распада. Интерпретацию данных проводили с использованием системы MS HP ChemStation, содержащей библиотеку из 138 тыс. масс-спектров WILEY138L.

Проведение экспериментов осуществляли в 3-кратной повторности, данные обрабатывали с помощью программы ORIGIN SRO 7.0. В качестве достоверных рассматривали различия между выборочными средними при 5%-ном уровне значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы был исследован рост периодической культуры *P. aeruginosa* 21SG на 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т. Оптическая плотность клеточной суспензии *P. aeruginosa* 21SG при использовании 4-ХФУК достигала своего максимального значения 0,8 ОЕ на 6-е сутки

культивирования. При этом количество 4-ХФУК снижалось на 9-е сутки на 36% от контроля. На среде с 2,4-Д максимальное значение оптической плотности наблюдалось на 1-е сутки инкубации (0,85 ОЕ), а концентрация 2,4-Д снижалась к 3-м суткам на 66%. Оптическая плотность клеточной суспензии в условиях использования 2,4,5-Т достигала максимального значения к 4-м суткам культивирования (0,2 ОЕ). Содержание 2,4,5-Т уменьшалось к 3-м суткам на 67%, а к 13-м суткам - на 82% (рис. 1).

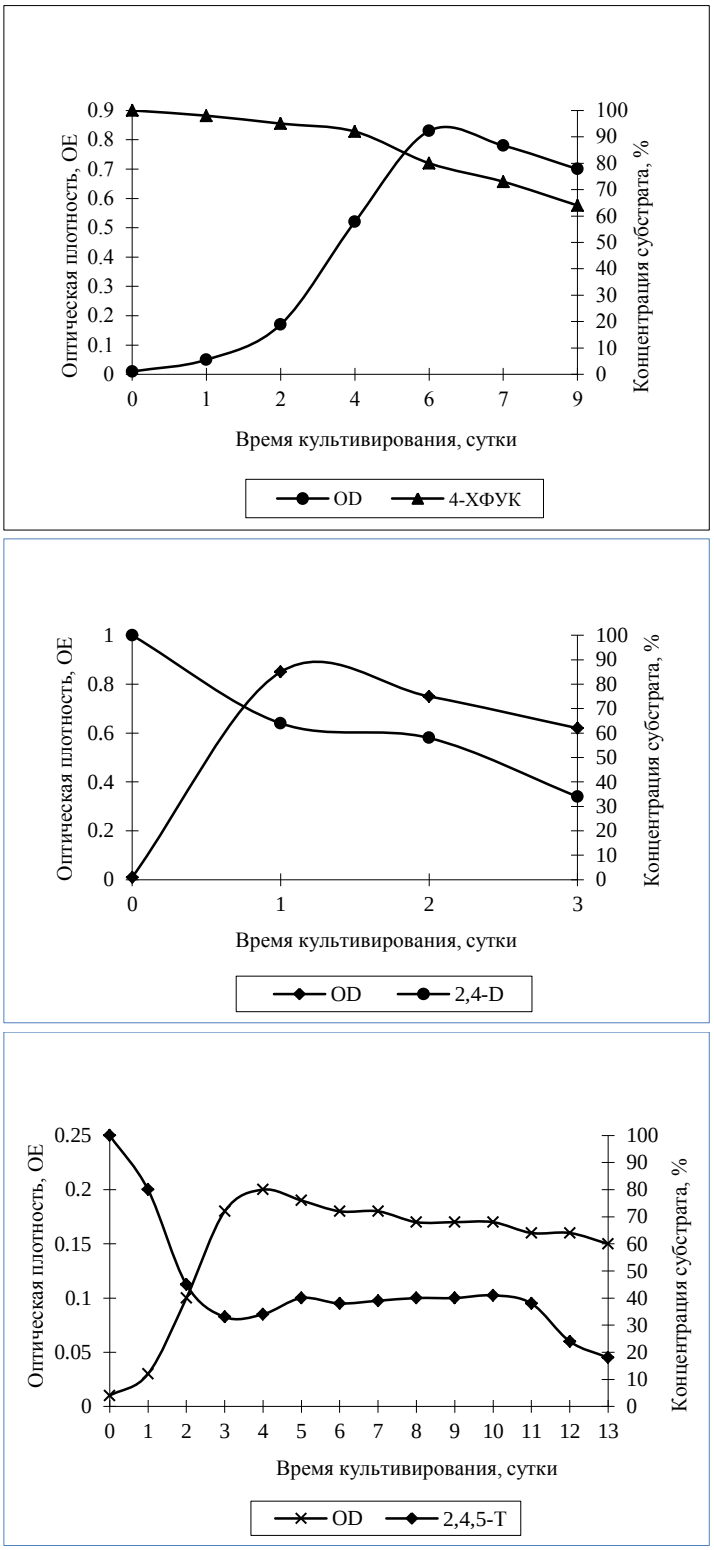


Рис. 1. Графики зависимости изменения значений оптической плотности (OD) культуры *Pseudomonas aeruginosa* 21SG и концентрации 4-ХФУК, 2,4-Д, 2,4,5-Т от времени инкубации.

С целью выявления этапов метаболизма 2,4,5-Т *P. aeruginosa* 21SG исследован характер промежуточных продуктов превращения ксенобиотика, обнаруживаемых в среде культивирования штамма в условиях периодической культуры. В среде культивирования *P. aeruginosa* 21SG наблюдалось присутствие 2,4-дихлор-6-метил ФУК и 2-гидрокси-2-гексендионовой кислоты. Эти результаты указывают на то, что *P. aeruginosa* 21SG осуществляет дехлорирование молекул 2,4,5-Т с образованием молекул галогенированных феноксиуксусных кислот, которые последовательно подвергались расщеплению с образованием 2-гидрокси-2-гексендионовой кислоты. Последовательность реакций конверсии 2,4,5-Т *P. aeruginosa* 21SG изображена на рисунке 2.

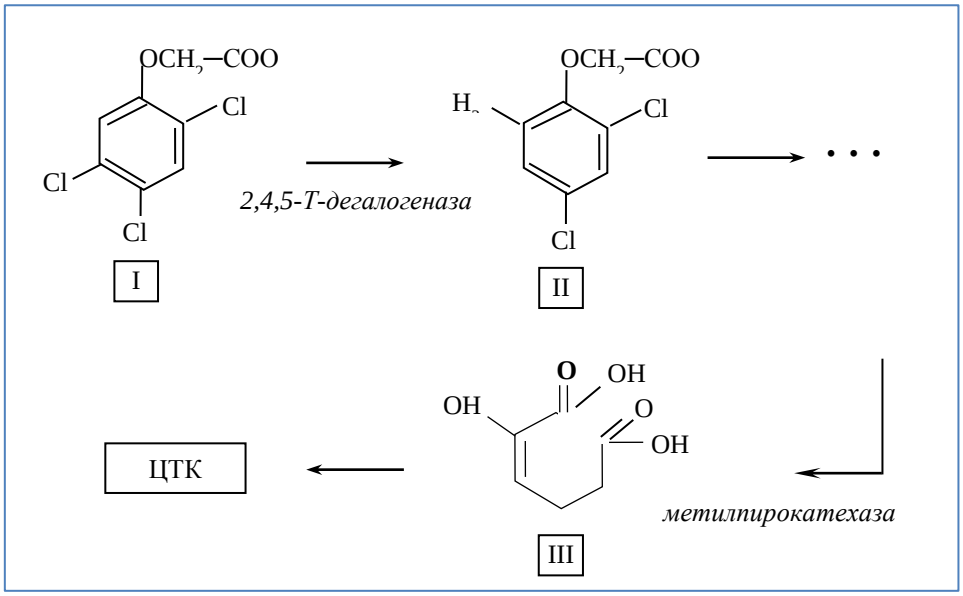


Рис. 2. Схема метаболизма 2,4,5-Т штамма *P. aeruginosa* 21SG. Условные обозначения: I - 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота; II - 2,4-дихлор-6-метилфеноксиуксусная кислота; III - 2-гидрокси-2-гексендионовая кислота; ЦТК - цикл трикарбоновых кислот.

Следует отметить, что к настоящему времени описано несколько бактерий, способных метаболизировать 2,4,5-Т: *Brevibacterium* sp., *Nocardioides simplex* 3E, *Pseudomonas* sp., *Burkholderia cepacia* AC1100 [Жарикова и др., 2018], *Burkholderia* sp. штаммы JR7B2 и JR7B3 [Rice et al., 2005] и *Burkholderia phenoliruptrix* sp. [Coenye et al., 2004].

2,4,5-Т является недоступным или малодоступным источником питания и энергии для большинства микроорганизмов. Это качество молекулам 2,4,5-Т придает наличие трех атомов хлора, два из которых находятся в ортоположении. Показано, что процессы конверсии 2,4,5-Т бактериями родов *Pseudomonas* и *Nocardioides* проходят с последовательным образованием 2,4,5-трихлорфенола, дихлоркатехола и хлоргидрохинона, сукцината, малеилацетата и 3-оксиадипата [Жарикова и др., 2018]. В качестве интермедиата при деградации 2,4,5-Т штаммом *Brevibacterium sp.* наблюдали присутствие 3,5-дихлоркатехола. Следовательно, характер деградации 2,4,5-Т бактериями *P. aeruginosa* 21SG отличается от ранее опубликованных данных.

Сведения о микробной конверсии 4-ХФУК ограничены результатами немногочисленных исследований, указывающих на то, что в качестве субстрата 4-ХФУК способны использовать несколько штаммов, а именно: *Pseudomonas* sp. CBS3, *Ralstonia eutropha* JMP134, *Azotobacter chroococcum, Pseudomonas* sp. 36DCP [Жарикова и др., 2019].

Согласно имеющимся публикациям, обнаружен ряд микроорганизмов, способных метаболизировать 2,4-Д: *Achromobacter xylosoxidans subs. denitrificans* EST4002 [Vedler et al., 2000], *Bacillus subtilis* KCM-RG_5 [Satchanska et al., 2006], *Rhodococcus* sp. [Плотникова и др.,

2006], *Serratia marcescens* [Silva et al., 2007], Среди деструкторов 2,4-Д выделяется группа псевдомонад: *Pseudomonas aeruginosa* D5, *Pseudomonas aeruginosa* D8, *P. fluorescens* SM1 [Wasi et al., 2008], *Pseudomonas putida* PaW340, *P. rhodesiae* KCM-R_5 [Satchanska et al., 2006], *Pseudomonas* sp. EST4002 [Жарикова и др., 2017].

Известно, что местные виды микробов являются более адаптивными и способны превосходить чужеродные микроорганизмы в восстановлении особых загрязненных сред [Silva et al., 2009]. Следовательно, выделение новых бактерий-деструкторов фенола и его хлорированных производных необходимо для биоремедиации загрязненных сред в различных регионах.

В результате проведенных исследований выявлено, что культура *P. aeruginosa* 21SG способна использовать 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т в качестве единственного источника углерода и энергии и осуществляет дехлорирование молекул 2,4,5-Т с последующим образованием 2-гидрокси-2-гексендионовой кислоты.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098-9 с использованием оборудования центра коллективного пользования УФИЦ РАН «Агидель».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Ясаков Т.Р. и др. Особенности конверсии 4-хлорфеноксиуксусной кислоты у штамма *Pseudomonas sp.* 36DCP // Прикладная биохимия и микробиология. 2019. Т. 55 (2). С. 144–150.
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 (3). С. 292–305. https://doi10.7868/S0016675818030025
3. Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Журенко Е.Ю. и др. Бактериальные гены инициации деградации 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, кодирующие а-кетоглутаратзависимую диоксигеназную активность // Успехи современной биологии. 2017. Т. 137 (5). С. 514–528. https://doi.org/10.7868/S0042132417050076
4. Имельбаева Э.А., Теплова С.Н., Камилов Ф.Х., Каюмова А.Ф. Состояние системы мононуклеарных фагоцитов при воздействии экотоксиканта – гербицида 2,4-Д // Башк. экол. вестн. 1998. №2. С.48–52.
5. Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В. и др. Применение штамма-деструктора фенола *Pseudomonas aeruginosa* 21SG для очистки промышленных сточных вод // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2018. Т. 73 (3). С. 185–190.
6. Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В. и др. Применение штамма-деструктора фенола *Pseudomonas aeruginosa* 21SG для очистки промышленных сточных вод // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2018. Т. 73 (3). С. 185–190.
7. Методы определения микроколичеств пестицидов / Под ред. М.А. Клисенко − М.: Медицина, 1984. 256 с.

8. Орехов Д.А., Картомышева О.П., Морозов О.В., Кузмичева Е.В. Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению в Российской Федерации // Защита и карантин растений. 1998. № 5. С. 119–125.
9. Хазиев Ф.Х., Багаутдинов Ф.Я., Сахабутдинова А.З. Экотоксиканты в почвах Башкортостана. Уфа: Гилем, 2000. 60 с.
10. Biakley B.R., Gagnon J.M., Rousseaux C.G. The effect of a commercial 2,4-D formulation on chemical- and viral-induced tumor production in mice // J. Appl. Toxicol. 1992. V. 12 (4). P. 245–249.
11. Coenye T., Henry D., Speert D.P., Vandamme P. *Burkholderia phenoliruptrix* sp. nov., to accommodate the 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and halophenol-degrading strain AC1100 // Syst. Appl. Microbiol. 2004. V. 27 (6). P. 623–627.
12. Kaioumova D., Süsal C., Opeiz G. Induction of apoptosis in human lymphocytes by the herbicide 2,4-dichlolrophenoxyacetic acid // Human Immunology. 2001. V. 62 (1). P. 64–74.
13. Krieger R.I. Pesticide exposure assessment // Toxicol. Lett. 1995. V. 82–83. P. 65–72.
14. Rice J.F., Menn F.M., Hay A.G. et al. Natural selection for 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid mineralizing bacteria in agent orange contaminated soil // Biodegradation. 2005. V. 16 (6). P. 501–512.
15. Satchanska G., Topalova Y., Ivanov I., Golovinsky E. Xenobiotic biotransformation potential of *Pseudomonas rhodesiae* KCM-R5 and *Bacillus subtilis* KCM-RG5, tolerant to heavy metals and phenol derivatives // Biotechnology and Biotechnological Equipment. 2006. V. 20 (1). P. 97–102.
16. Schulze G.E., Dougherty J.A. Neurobehavioral toxicity and tolerance to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-n-butyl ester (2,4-D ester) // Fundam. Appl. Toxicol. 1988. V. 10. P. 413–424.
17. Silva Í.S., Santos E.d.C.d., Menezes C.R.d. et al. Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia // Bioresource Technol. 2009. V. 100 (20). P. 4669–4675.
18. Silva T.M., Stets M.I., Mazzetto A.M. et al. Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms isolated from Brazilian contaminated soil // Brazilian Journal of Microbiology. 2007. V. 38 (3). P. 522–525.
19. Vedler E., Kõiv V., Heinaru A. Analysis of the 2,4-dichlorophenoxyacetic-degrative plasmid pEST 4011 of *Achromobacter xylosoxidans* subsp. denitrificans strain EST 4002 // Gene. 2000. V. 255 (2). P.281–288.
20. Wasi S., Jeelani G., Ahmad M. Biochemical characterization of a multiple heavy metal, pesticides and phenol resistant *Pseudomonas fluorescens* strain // Chemosphere. 2008. V. 71 (7). P. 1348–1355.