

БИОРАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИЙ – ДЕСТРУКТОРОВ ХЛОРИРОВАННЫХ ФЕНОКСИКИСЛОТ

Исследованы микроорганизмы, способные к вовлечению в процессы обмена веществ хлорированных производных ароматического ряда. Описаны новые бактериальные деструкторы, выделенные из образцов почв крупнейшего предприятия Уфимского промузла ОАО «Уфахимпром», проведена их идентификация и рассмотрена субстратная активность в отношении хлорированных феноксикислот.

Ключевые слова: бактерии-деструкторы, хлорированные феноксикислоты, ксенобиотики.

В ряде исследований было отмечено, что в биоценозах, подвергавшихся долговременному действию ксенобиотиков, формировались микроорганизмы, поддерживавшие свою численность за счет утилизации присутствовавших в окружающей среде синтетических молекул. Прежде всего это замечание было отнесено к бактериям. Популяции таких бактерий становились частью природных сообществ, способной вовлечь в круговорот органического вещества разные производные, в том числе загрязнители промышленного ряда. С учетом указанных наблюдений был предпринят поиск бактерий-деструкторов 4-хлорфеноксиуксусной (4-ХФУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусной (2,4-Д) и 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислот (2,4,5-Т) в популяциях почвенных микроорганизмов, подвергавшихся воздействию факторов нефтехимического производства.

В работе были использованы почвенные образцы, отобранные методом случайных проб на территории крупнейшего предприятия по производству гербицидов – ОАО «Уфахимпром». В качестве контроля использовали почву, полученную из Зилаирского района, удаленного от техногенной зоны.

Чистые культуры микроорганизмов-деструкторов выделяли по методу Коха с модификациями. Идентификацию штаммов осуществляли согласно признакам фенотипической и физиолого-биохимической дифференциации бактерий [1, 2].

Посевной материал бактерий получали выращиванием культур в разбавленном мясopетонном бульоне (1МПБ:7Н₂О) при температуре +30 °С. Далее его засекали в количестве 0,01% от объема в жидкую питательную среду следующего состава (г/л): NH₄Cl – 1.0; K₂HPO₄ – 5.0; MgSO₄ · 7H₂O – 0.05; FeSO₄ · 7H₂O – 0.005;

CuSO₄ · 5H₂O – 0.001; ZnSO₄ – 0.0008; pH – 6.8-7.0. В качестве единственного источника углерода и энергии в среду добавляли 4-ХФУК, 2,4-Д или 2,4,5-Т. Рост контролировали по изменению плотности клеточной суспензии.

На первом этапе работ был проведен анализ бактериального компонента исследуемого биоценоза. Результаты количественных оценок показали, что в микробном сообществе отмечалось присутствие сапрофитных бактерий (табл. 1).

При этом численность представителей указанной группы во всех пробах, отобранных на территории ОАО «Уфахимпром», была существенно ниже контрольной. Оценка бациллярных форм в состоянии спор проводилась в четырех пробах и позволила установить, что такие формы отсутствовали в одном образце, а в остальных трех этот показатель был меньше контрольного и только в одном варианте превышал контроль.

Приведенные результаты указывали на то, что в целом популяции микроорганизмов исследованных почв были обеднены бактериальной составляющей. Одним из объяснений причин этого явления могло быть сильное отрицательное воздействие загрязнителей (или их комплекса) на популяции почвенных микроорганизмов в указанных точках отбора, следствием которого и явилось отсутствие разнообразия микроорганизмов в средах, подвергнутых анализу.

С целью выявления деструкторов хлорированных феноксиуксусных кислот среди обнаруженной группы отдельные колонии бактерий были высеяны на селективные жидкие среды с ксенобиотиками, присутствовавшими в их составе в качестве единственного источника углерода и энергии. По положительным оценкам роста в указанных условиях были выявлены 4 изолята, обладавшие способностью использовать в качестве субстрата 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т. При

Таблица 1. Количественные оценки бактериальной составляющей популяций почвенных микроорганизмов

Характеристика почвенной пробы		Число КОЕ бактерий в пробе, (n)	
источник	№ пробы	бактерии, $n \times 10^3, \text{мл}^{-1}$	спорообразующие формы, $n \times 10^3, \text{мл}^{-1}$
ОАО «Уфахимпром»	32	$2 \pm 0,42$	$10 \pm 0,1$
	35	$12 \pm 1,68$	$8 \pm 0,42$
	39	$238 \pm 1,26$	$96 \pm 1,68$
	207	$14 \pm 0,42$	0
	300	$8 \pm 1,26$	не опр.
	208	$472 \pm 2,1$	не опр.
	209	$22 \pm 0,4$	не опр.
Зилаирский район	44	$272 \pm 1,6$	$48 \pm 0,42$

Таблица 2. Штаммы-деструкторы и оценки их роста в условиях использования ксенобиотиков в качестве единственного источника углерода и энергии

Источник пробы	№ пробы	Штаммы	Субстраты		
			4-ХФУК	2,4-Д	2,4,5-Т
ОАО «Уфахимпром»	32	1. <i>Arthrobacter globiformis</i> IBRB 17S	+	+	+
	БОС	2. <i>Bacillus subtilis</i> IBRB 16	+	+	+
	39	3. <i>Pseudomonas fluorescens</i> IBRB 39D	+	+	+
	35	4. <i>Pseudomonas putida</i> IBRB 19S	+	+	+

этом штаммы-деструкторы были обнаружены во всех исследованных образцах почв ОАО «Уфахимпром» (№ 32, 35, 39), а также в составе активного ила БОС ОАО «Уфахим-пром». Они были определены по культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам и обозначены как *Arthrobacter globiformis* IBRB-17S, *Bacillus subtilis* IBRB-16, *Pseudomonas fluorescens* IBRB-39D, *Pseudomonas putida* IBRB-19S (таб. 2).

Оценки роста бактерий в условиях использования 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т в качестве источников углерода и энергии приведены в таблице 2. Из этих данных понятно, что все четыре исследованных штамма, а именно: *Art. globiformis* IBRB-17S, *B. subtilis* IBRB-16, *Ps. fluorescens* IBRB-39D и *Pseudomonas putida* IBRB-19S, были способны метаболизировать все указанные соединения.

С целью обсуждения новизны полученных результатов было проведено их сравнение с известными сведениями о деструкторах 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т. Оказалось, что ранее было выявлено несколько штаммов - деструкторов фенола и его производных, отнесенных к родам *Arthrobacter*, *Bacillus* и *Pseudomonas*, представители которых также присутствовали в составе

смешанных популяций трансформированного экотопа.

Например, несколько культур *Arthrobacter sp.* использовали в качестве источника питания 2,4-Д [3, 4]. Однако среди деструкторов хлорфеноксиуксусных кислот ранее не был описан штамм, относящийся к виду *Arthrobacter globiformis*, а именно такой штамм был обнаружен в пробе почвы ОАО «Уфахимпром».

Имеются сведения о *Bacillus subtilis* КСМ-RG₅, способном к конверсии 2,4-Д [5]. В то же время штаммы рода *Bacillus* как деструкторы 2,4,5-Т и 4-ХФУК ранее отмечены не были.

Большинство исследованных ранее деструкторов хлорароматических соединений было отнесено к роду *Pseudomonas*. Согласно разным авторам, конверсию 4-ХФУК мог метаболизировать один штамм, 2,4-Д – двадцать один, а 2,4,5-Т – один из представителей псевдомонад [6]. Вместе с тем штаммы вида *Ps. fluorescens* среди деструкторов 4-ХФУК и 2,4,5-Т, относящихся к роду *Pseudomonas*, не были описаны, в то время как такой штамм были обнаружен в исследованном биоценозе. Некоторые штаммы вида *Ps. putida* были выявлены как деструкторы 2,4-Д [7]. Отмечено, что в ряде случаев деструкторы рода *Pseudomonas* обладали полисубстрат-

ной активностью, но ни для одного из них не была установлена полисубстратная активность в отношении 2,4-ДХФ, 4-ХФУК и 2,4,5-Т, как это показано выше для *Ps. putida* IBRB-19S.

Обобщая полученные данные и их обсуждение, можно заключить, что в составе популяций почвенных микроорганизмов, подвергавшихся воздействию факторов нефтехимического производства, обнаружено четыре штамма - деструктора 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-

Т, принадлежавших к родам *Arthrobacter*, *Bacillus* и *Pseudomonas*. На примере вновь выделенных штаммов *Arthrobacter globiformis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas putida* впервые была обнаружена полисубстратная активность бактерий упомянутых родов по отношению к 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т, которые использовались в экспериментах как единственные источники углерода и энергии.

Список использованной литературы:

1. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. 9-е изд. В 2-х т. М: Мир, 1997. 799 с.
2. Скворцова И.Н. Идентификация почвенных бактерий рода *Bacillus*. М.: Изд-во МГУ, 1984. 26 с.
3. Bollag J.-M., Helling C.S., Alexander M. 2,4-D metabolism. Enzymatic hydroxylation of chlorinated phenols // J. Agr. Food Chem. 1968. Vol. 16. P. 826–828.
4. Tiedje J.M., Alexander M. Enzymatic cleavage of the ether bond of 2,4-D // J. Agr. Food Chem. 1969. Vol.17, №5. P.1080–1084.
5. 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. Vol. 20. №1. P. 97-102.
6. Маркушева Т.В., Журенко Е.Ю., Кусова И.В. Бактерии–деструкторы фенола и его хлорированных производных. Уфа: Гилем, 2002. 108 с.
7. Short K.A., Seidler R.J., Olsen R.H. Survival and degradative capacity of *Pseudomonas putida* induced or constitutively expressing plasmid-mediated degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate (TFD) in soil // Can. J. Microbiol. - 1990. Vol. 36. P. 821–829.

Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН «Поддержка молодых ученых», гранта «Биоразнообразие и динамика генофондов», гранта Роснауки «Поддержка сети ЦКП, мероприятие 5.2» и программы УМНИК.