

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.222.2:579.695

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ШТАММА-ДЕСТРУКТОРА ФЕНОЛА И 2,4-ДИХЛОРФЕНОЛА, *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* 17S, ДЛЯ ОЧИСТКИ ПРОМЫШЛЕННЫХ СТОКОВ**В.В. Коробов*, Е.Ю. Журенко, Н.В. Жарикова, Т.Р. Ясаков, Т.В. Маркушева**

Уфимский Институт биологии РАН, Россия, 450054, г. Уфа, просп. Октября, д. 69

*e-mail: vacikk@mail.ru

Описан новый штамм-деструктор фенола и 2,4-дихлорфенола (2,4-ДХФ), *Rhodococcus erythropolis* 17S, выделенный из почвы химического предприятия, имеющего длительную историю контакта с фенолом и его производными. Идентификация штамма проведена с учетом морфометрических, культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков, а также результатов сравнительного анализа последовательности гена 16S рРНК. Исследован рост периодической культуры *R. erythropolis* 17S в условиях использования фенола и 2,4-ДХФ в качестве источников углерода и энергии. Содержание фенола в культуральной жидкости снижалось к 4-м сут на 55%, а 2,4-ДХФ — к 22-м сут на 47% от контроля. Выявлена возможность применения *R. erythropolis* 17S для утилизации фенола в промышленных стоках нефтехимического производства и производства дубильных экстрактов.

Ключевые слова: *Rhodococcus erythropolis*, штамм-деструктор, фенол, 2,4-дихлорфенол, удаление отходов, сточные воды

Фенол и его хлорированные производные являются загрязнителями промышленных стоков химических и нефтеперерабатывающих заводов, обогатительных фабрик цветной металлургии, производств переработки древесины, сланцев, торфа, бурого и каменного угля. К настоящему моменту выявлен ряд микроорганизмов, способных использовать в качестве источников углерода и энергии фенол и 2,4-дихлорфенол (2,4-ДХФ), в том числе: *Achromobacter* sp. [1], *Agromyces* sp. IBRB-34DCP [2], *Pseudomonas* sp. EST1001 [3, 4], *Pseudomonas* sp. JS150 [5] и *Rhodococcus erythropolis* [6].

В ряде работ было отмечено, что бактерии рода *Rhodococcus* обладают широким метаболическим потенциалом и способны к росту в присутствии различных органических субстратов в концентрациях, не всегда потребляемых другими микробами [7, 8]. Вместе с тем деструкция фенола и его хлорпроизводных представителями рода *Rhodococcus* отмечена лишь в единичных публикациях.

Целью настоящей работы было выявление свойств нового штамма *Rhodococcus erythropolis* 17S — деструктора фенола и 2,4-ДХФ.

Материалы и методы

Штамм *R. erythropolis* 17S был выделен из пробы почвы расположенного в г. Уфа (Республика Башкортостан) предприятия, производившего и использовавшего фенол и его хлорпроизводные в производственных циклах более полувека.

Выделение и идентификация штамма по признакам морфологической, морфометрической, физи-

ологической и биохимической дифференциации. Выделение чистой культуры *R. erythropolis* 17S было проведено на селективной среде следующего состава: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2,6 г/л; KH_2PO_4 — 2,4 г/л; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 5,6 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 1,0 г/л; раствор микроэлементов — 0,1 мл/л; вода дистиллированная с добавлением 100 мг/л фенола или 2,4-ДХФ в качестве единственного источника углерода и энергии. Культуральные и физиолого-биохимические свойства изолята определяли согласно методическому руководству под ред. А.И. Нетрусова [9]. Морфометрические и морфологические характеристики были получены с помощью атомно-силовой микроскопии на сканирующем зондовом микроскопе Solver PRO-M (NT-MDT, Россия) [10]. Сканирование объектов вели в контактном режиме по методу постоянной силы с использованием кантилеверов CSG01 с радиусом кривизны зонда 10 нм. Изображения были получены с помощью двухпроходной методики съемки.

Рост культуры в жидкой питательной среде и его контроль. Посевной материал получали выращиванием бактерий в разведенном в 8 раз мясопептонном бульоне при температуре 30°C. Далее культуру засевали в количестве 1 мл в жидкую среду следующего состава (г/л): NH_4Cl — 1; K_2HPO_4 — 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,05; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,005; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; ZnSO_4 — 0,008; фенол (2,4-ДХФ) — 0,1, после чего инкубировали в термостатируемых орбитальных встряхивателях УВМТ-12-250 (Элион, СССР) при 115–120 об/мин. Контроль роста вели с использованием фотокolorиметра

КФК-2 (ЗОМЗ, Россия) по изменению оптической плотности клеточной суспензии при длине волны 590 нм.

Определение количества фенола осуществляли стандартным фотометрическим методом [11]. Для анализов отбирали по 5 мл культуральной жидкости, которую освобождали от клеток центрифугированием (3630 g, 30 мин). Далее к пробе последовательно приливали 30 мкл 2%-ного раствора 4-аминоантипирина, 100 мкл 2%-ного раствора аммиака и 100 мкл 2%-ного раствора железосинеродистого калия. Смесь перемешивали после добавления каждого компонента реакции и через 10 мин измеряли коэффициент пропускания на фотокolorиметре КФК-2 при длине волны 540 нм. Количество фенола определяли по градуировочному графику, построенному в стандартных условиях определения.

При определении количества фенола в сточных водах использовали методическое руководство по анализу сточных вод нефтеперерабатывающих и нефтехимических заводов [12]. Сразу после отбора пробы сточных вод консервировали 50%-ным едким натром из расчета 5 мл NaOH на 1 л пробы, а затем их помещали в перегонную колбу, добавляли 10%-ный раствор CuSO_4 , подкисляли разбавленной серной кислотой и далее отгоняли фенол. В дальнейшем ход определения меняли в зависимости от концентрации фенола в полученном отгоне. При концентрации фенола больше 0,4 мг/л определение проводили так же, как в культуральной жидкости, а при содержании меньше 0,4 мг/л фенол извлекали экстрагирующей смесью хлороформ-изоамиловый спирт. Содержание фенола находили по калибровочной кривой, которую строили по значениям стандартных образцов.

Секвенирование генов, кодирующих 16S рРНК, сравнение последовательностей и филогенетический анализ. Для получения амплификатов и последующего секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК использовалась универсальная праймерная система: 8f – (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG), 926r – (CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT), 1492r – (GGT TAC CCT TGT TAC GAC TT). Температурно-временной профиль ПЦР: первый цикл – 3 мин при 95°C; последующие 35 циклов – 0,5 мин при 95°C, 0,5 мин при 57°C, 1,5 мин при 72°C; завершающий цикл – 5 мин при 72°C. Сравнительный анализ амплификатов осуществляли путем электрофореза в 1%-ном агарозном геле при напряженности электрического поля 5 В/см [13].

Секвенирование ДНК проводилось в трех повторях на автоматическом секвенаторе 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, США). Для поиска последовательностей с высоким уровнем идентичности генов 16S рРНК использовалась база данных GenBank [14]. Филогенетическое древо было построено в программе MEGA7 [15] с использованием метода Neighbor-Joining [16]. Эволюционные

расстояния рассчитывались с помощью метода максимального составного правдоподобия (Maximum Composite Likelihood) [17]. Достоверность ветвления определялась с помощью “bootstrap”-анализа 1000 альтернативных деревьев (значимыми признавались величины больше 50) [18].

Результаты и обсуждение

Идентификация штамма *R. erythropolis* 17S.

На момент анализа микробная популяция *R. erythropolis* 17S была представлена неспорообразующими клетками в виде искривленных коротких палочек (60% от всего числа клеток) и овалами (25%), а также небольшим числом средних и длинных палочек, расположенных одиночно, в парах и в скоплениях неправильной формы. Размеры всех этих форм варьировали в пределах от 0,4–0,8 до 0,6–3,2 мкм.

Наблюдалась положительная окраска клеток по Граму, при этом клетки могли легко обесцвечиваться.

Культура *R. erythropolis* 17S при росте на мясопептонном агаре образовывала колонии бело-кремового цвета. Оптимальный рост культуры наблюдался в аэробных условиях в пределах от +22°C до +37°C при значениях pH 7–8. Штамм метаболизировал D-лактозу, D-мальтозу, использовал минеральный азот, глицин и тиамин, при разложении глюкозы образовывал небольшое количество кислоты. Клетки обладали каталазной и казеиназной активностью, осуществляли гидролиз желатины.

Секвенирование и сравнительный анализ вариабельных участков гена 16S рРНК длиной 539 п.н. позволил выявить 29 близких типовых штаммов родов *Rhodococcus* и *Nocardia*. При этом исследуемый изолят образовывал кластер с типовыми штаммами N11 (X79289) и ATCC 4277 (X81929) вида *R. erythropolis*. Уровень идентичности между исследуемыми последовательностями составил 99,6% и 98,3%, соответственно. Принимая во внимание то, что, согласно критериям молекулярной систематики, уровень идентичности между штаммами должен составлять не менее 97%, изучаемый штамм был отнесен к *R. erythropolis* (рис. 1). Последовательность гена 16S рРНК *R. erythropolis* 17S была депонирована в международной базе данных GenBank под номером KY563744.

На основании выявленных морфометрических, физиолого-биохимических, культурально-морфологических признаков, а также сравнительного анализа последовательности гена 16S рРНК штамм 17S был идентифицирован как *Rhodococcus erythropolis* 17S.

Субстратная специфичность штамма *Rhodococcus erythropolis*. В ходе дальнейшей работы был исследован рост периодической культуры *R. erythropolis* 17S на феноле и 2,4-ДХФ.

Существенное накопление массы клеток при использовании фенола в качестве источника углерода и энергии начиналось с первых суток культивирования (рис. 2). Экспоненциальная фаза роста

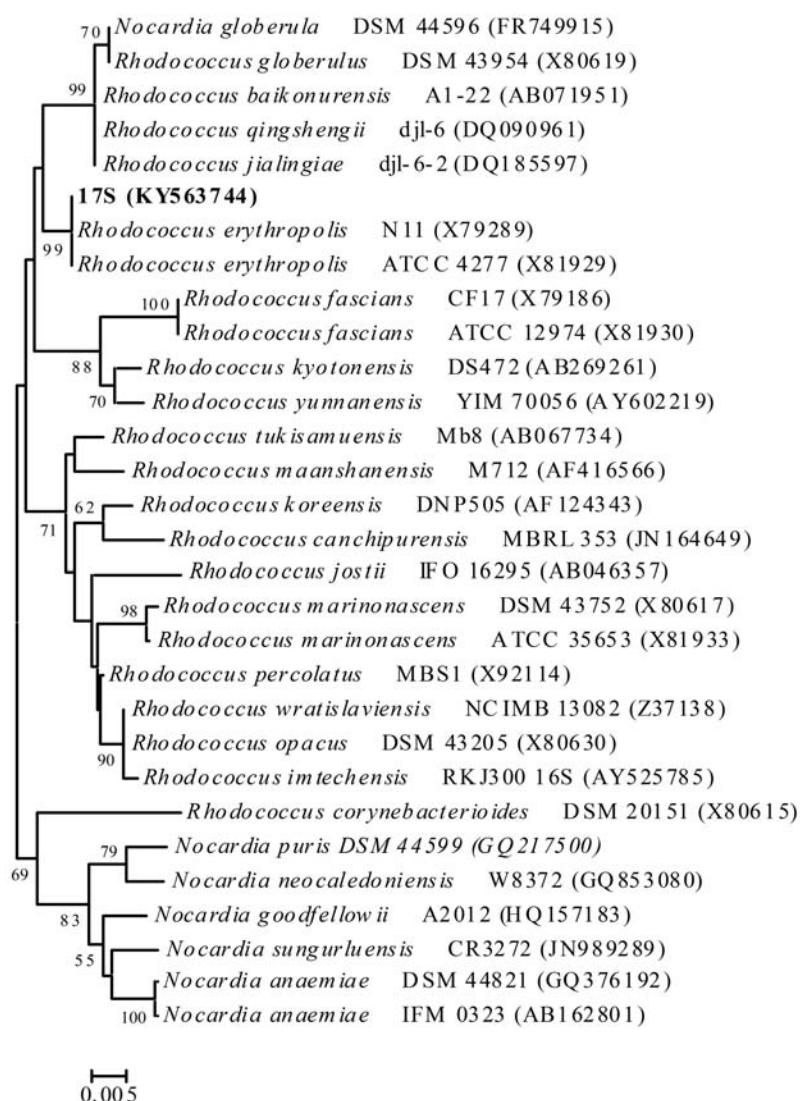


Рис. 1. Филогенетическое древо, построенное методом Neighbor-Joining на основании сравнительного анализа частичной последовательности гена 16S рРНК штамма 17S и близких ему последовательностей типовых штаммов бактерий. Цифрами указана достоверность ветвления, рассчитанная с помощью “bootstrap”-анализа (значимыми признаются величины больше 50). Масштаб отражает эволюционное расстояние, соответствующее 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов. В скобках указаны номера GenBank

длилась около двух суток, и оптическая плотность (OP_{590}) достигала 0,7 оптических единиц (о.е.), а затем, достигая плохо выраженной стационарной фазы, культура заканчивала свой рост. Содержание фенола в культуральной жидкости снижалось в течение двух суток на 30%, а к четвертым суткам — на 55% от начального уровня.

Анализ динамики показателей роста штамма *R. erythropolis* 17S при использовании 2,4-ДХФ в качестве субстрата позволил констатировать, что биомасса накапливалась достаточно медленно и только к 14-м сут инкубации показатель OP_{590} достигал 0,12 о.е. При этом концентрация 2,4-ДХФ постепенно снижалась и составляла к 22-м сут 53% от начальной.

Приведенные выше результаты показывают, что *R. erythropolis* 17S способен использовать фе-

нол и 2,4-ДХФ в качестве единственного источника углерода и энергии. Сравнивая графики, можно отметить, что утилизация молекул хлорированного фенола являлась более сложной задачей для *R. erythropolis* 17S, чем конверсия молекул фенола. Это наблюдение согласуется с ранее полученными данными о том, что атомы хлора делают ароматический субстрат менее доступным для микроорганизмов. В ряде работ была исследована скорость утилизации фенола и 2,4-ДХФ. Так, при культивировании *Agromyces* sp. IBRB-34DCP на феноле и 2,4-ДХФ при начальной концентрации 100 мг/л содержание фенола снижалось к 3-м сут на 44%, а к 9-м — на 74% от исходного значения. Количество 2,4-ДХФ уменьшалось к 3-м сут на 45%, к 9-м — на 73% [2]. При концентрации 2,4-ДХФ 50 мг/л адаптированная культура *R. erythropolis* через 7 сут полностью

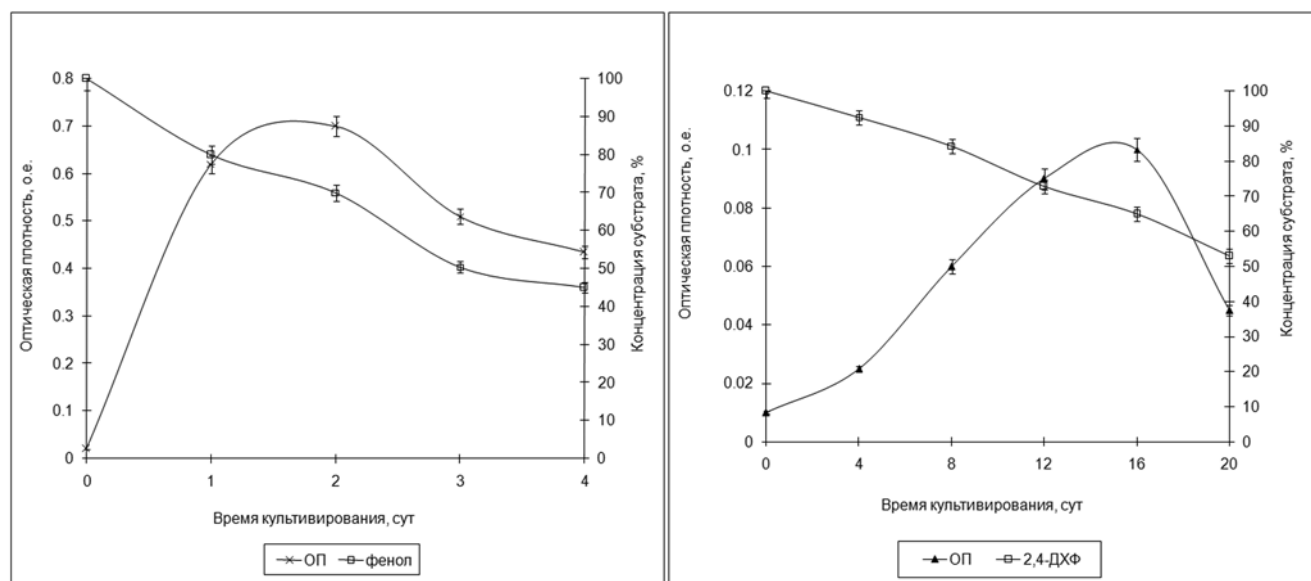


Рис. 2. Графики зависимости значений оптической плотности клеточной суспензии ОП₅₉₀, а также концентрации фенола и 2,4-ДХФ, используемых в качестве единственного источника углерода и энергии, от времени инкубации штамма *R. erythropolis* 17S в периодической культуре

утилизировала данный субстрат [6]. Ранее было проведено исследование биodeградации 2,4-ДХФ в биореакторе культурой *Achromobacter* sp. Результаты показали, что 2,4-ДХФ в концентрации 25 мг/л был полностью утилизирован в течение 5 ч [1]. Как известно, рост концентрации ксенобиотиков оказывает подавляющее влияние на рост бактерий. В связи с этим, способность *R. erythropolis* 17S расти при более высоких концентрациях фенола и 2,4-ДХФ является его конкурентным преимуществом, и может быть использована для очистки сточных вод с более высоким содержанием этих соединений.

Использование штамма *R. erythropolis* 17S для доочистки от фенола сточных вод предприятий нефтехимического профиля. Известно, что очистку и обезвреживание сточных вод предприятий нефтехимического профиля от фенола проводят обычно в две ступени: на первой происходит освобождение стоков от механических примесей в отстойниках, ловушках и фильтрах различных систем. Далее используются физико-химические методы: экстракция органическими растворителями, адсорбция, очистка с применением фильтров, парорециркуляция. Как показывает практика, после такой обработки в стоках могут присутствовать остаточные количества фенола, удаление которых затруднено типичными для доочистки стоков плохой аэрацией и низким содержанием питательных веществ. С учетом того, что родококки отличаются способностью длительно оставаться жизнеспособными в олиготрофных условиях за счет азотфиксации, запасаения и эффективного использования эндогенных фосфорных соединений, проведено исследование возможности доочистки загрязненных фенолом сточных вод двух промышленных предприятий,

занимающихся нефтехимическим производством (НХП) и производством дубильных экстрактов (ПДЭ) культурой *R. erythropolis* 17S.

Содержание фенола в пробах сточных вод предприятия НХП составляло 0,09 мг/л, а в стоках компании ПДЭ — 0,74 мг/л. После 3 сут воздействия бактерий концентрация фенола снижалась до 0,012 и 0,155 мг/л, соответственно (рис. 3). Полученные данные показывают, что культура *R. erythropolis* 17S проявила активность в реальных условиях загрязненных сточных вод обоих производств. Существенное изменение содержания фенола в сточных водах при использовании *R. erythropolis* 17S наблюдалось уже после первых суток воздействия. Степень очистки сточных вод, достигаемая при использовании штамма *R. erythropolis* 17S, составляла для стоков НХП 86,7%, а для стоков ПДЭ — 79,1%.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что в настоящее время представители рода *Rhodococcus*, выгодно отличающиеся длительным сохранением жизнеспособности в неблагоприятных условиях, психрофильностью и термотолерантностью, могут рассматриваться в качестве перспективных объектов биотехнологии. В практическом плане для целевой конверсии ксенобиотиков особый интерес представляют адаптированные штаммы родококков из экотопов, подвергавшихся техногенному воздействию. Результаты данной работы свидетельствуют о возможности использования выделенного из техносферы штамма *R. erythropolis* 17S для направленной деградации фенола. Полученные данные дополняют понимание процессов взаимодействия микроорганизмов с чужеродными соединениями.

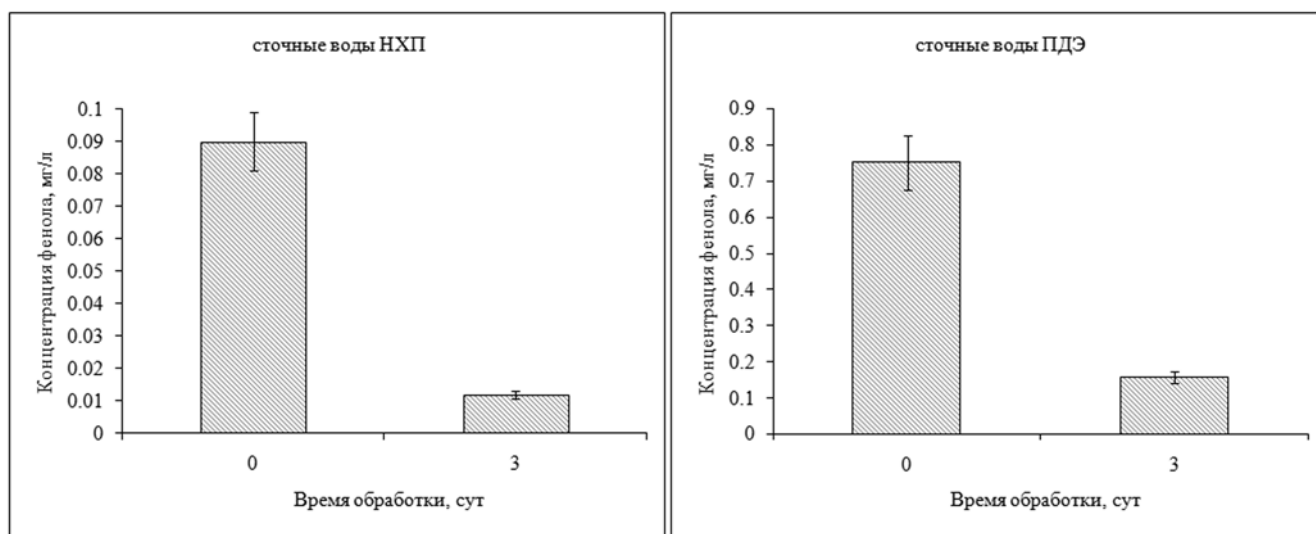


Рис. 3. Диаграмма остаточного содержания фенола на третьи сутки обработки сточных вод НХП и ПДЭ культурой *R. erythropolis* 17S

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Quan X., Shia H., Zhange Y., Wang J., Qiana Y. Biodegradation of 2,4-dichlorophenol and phenol in an airlift inner-loop bioreactor immobilized with *Achromobacter* sp. // Sep. Purif. Technol. 2004. Vol. 34. N 1–3. P. 97–103.
2. Коробов В.В., Жарикова Н.В., Анисимова Л.Г., Ясков Т.Р., Кусова И.В., Журенко Е.Ю., Галкин Е.Г., Маркушева Т.В. *Agromyces* sp. IBRB-34DCP – новый штамм-деструктор фенола и 2,4-дихлорфенола // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2013. Т. 15. № 3–4. С. 1320–1322.
3. Kivisaar M.A., Habicht J.K., Heinari A.L. Degradation of phenol and *m*-toluate in *Pseudomonas* sp. strain EST1001 and its *Pseudomonas putida* transconjugants is determined by a multiplasmid system // J. Bacteriol. 1989. Vol. 171. N 9. P. 5111–5116.
4. Nurk A., Kasak L., Kivisaar M. Sequence of the gene (*phe A*) encoding phenol monooxygenase from *Pseudomonas* sp. EST1001: expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida* // Gene. 1991. Vol. 102. N 1. P. 13–18.
5. Haigler B.E., Pettigrew C.A., Spain J.C. Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. strain JS150 // Appl. Envir. Microbiol. 1992. Vol. 58. N 7. P. 2237–2244.
6. Горлатов С.Н., Мальцева О.В., Шевченко В.И., Головлева Л.А. Разложение хлорфенолов культурой *Rhodococcus erythropolis* // Микробиология. 1989. Т. 58. № 5. С. 802–806.
7. Korshunova I.O., Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Pistsova O.N. The effect of organic solvents on the viability and morphofunctional properties of rhodococcus // Appl. Biochem. Microbiol. 2016. Vol. 52. N 1. P. 43–50.
8. Serebrennikova M.K., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V., Ivshina I.B. Adaptation of coimmobilized *Rhodococcus* cells to oil hydrocarbons in a column bioreactor // Appl. Biochem. Microbiol. 2014. Vol. 50. N 3. P. 265–272.
9. Практикум по микробиологии. Уч. пособие для вузов / Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Академия, 2005. 608 с.
10. Bolshakova A.V., Kiselyova O.I., Yaminsky I.V. Microbial surfaces investigated using atomic force microscopy // Biotechnol. Prog. 2004. Vol. 20. N 6. P. 1615–1622.
11. Коробов В.В., Маркушева Т.В., Кусова И.В., Журенко Е.Ю., Галкин Е.Г., Жарикова Н.В., Гафиятова Л.Р. Штамм бактерий *Serratia marcescens* В-6493 – деструктор фенола и 2,4-дихлорфенола // Биотехнология. 2006. № 2. С. 63–65.
12. Методическое руководство по анализу сточных вод нефтеперерабатывающих и нефтехимических заводов. М. 1977. С. 367–387.
13. Zharikova N.V., Iasakov T.R., Zhurenko E.I., Korobov V.V., Sagitova A.I., Markusheva T.V., Bumazhkin B.K., Patutina E.O., Kuznetsov B.B. Isolation and sequence analysis of pCS36-4CPA, a small plasmid from *Citrobacter* sp. 36-4CPA // Saudi J. Biol. Sci. 2016. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.02.014.3
14. Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Wheeler D.L. GenBank // Nucleic Acids Res. 2005. Vol. 33, suppl. 1. P. D34–D38.
15. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. Vol. 33. N 7. P. 1870–1874.
16. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. Vol. 4. N 4. P. 406–425.
17. Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004. Vol. 101. N 30. P. 11030–11035.
18. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. 1985. Vol. 39. N 4. P. 783–791.

Поступила в редакцию
07.07.2017 г.

Принята к печати
09.09.2017 г.

MICROBIOLOGY

THE POSSIBILITY OF USING PHENOL- AND 2,4-DICHLOROPHENOL-DEGRADING STRAIN, *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* 17S, FOR CLEANING OF INDUSTRIAL WASTEWATER

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

Ufa Institute of Biology, Russian Academy of Sciences, prospect Oktyabrya 69, Ufa, 450054, Russia

*e-mail: vacikk@mail.ru

Isolation and characterization of a new phenol- and 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP)-degrading bacterium from the soil contaminated with phenol and its derivatives for a long time are reported. The strain 17S was identified as *Rhodococcus erythropolis* based on the results of 16S rRNA sequence analysis data and its phenotypic, physiological and biochemical features. The growth of *R. erythropolis* 17S in batch culture using phenol and 2,4-DCP as sources of carbon and energy has been studied. The concentration of phenol and 2,4-DCP in culture medium decreased by 55% (at the 4th day) and 47% (at the 22nd day) from the control values, respectively. It is concluded that *R. erythropolis* 17S can be used for phenol utilization in industrial wastewaters of petrochemical and tanning extracts manufacturing.

Keywords: *Rhodococcus erythropolis*, degrader strain, phenol, 2,4-dichlorophenol, waste disposal, wastewater

Сведения об авторах

Коробов Владислав Викторович — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории прикладной микробиологии Уфимского института биологии РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: vacikk@mail.ru

Журенко Евгения Юрьевна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории прикладной микробиологии Уфимского института биологии РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: zhurenkoe@gmail.ru

Жарикова Наталья Владимировна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории прикладной микробиологии Уфимского института биологии РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: puzzle111@yandex.ru

Ясаков Тимур Рамилевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории прикладной микробиологии Уфимского института биологии РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: iasakov@anrb.ru

Маркушева Татьяна Вячеславовна — докт. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории прикладной микробиологии Уфимского института биологии РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: tvmark@anrb.ru