

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.222.2:579.695

ПРИМЕНЕНИЕ ШТАММА-ДЕСТРУКТОРА ФЕНОЛА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* 21SG ДЛЯ ОЧИСТКИ ПРОМЫШЛЕННЫХ СТОЧНЫХ ВОД

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

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН,
Россия, 450054, г. Уфа, просп. Октября, д. 69

*e-mail: vacikk@mail.ru

Описаны свойства штамма-деструктора фенола *Pseudomonas aeruginosa* 21SG, выделенного из почвы расположенного в г. Уфе (Республика Башкортостан) предприятия, являющегося крупнейшим производителем синтетических дубителей в России. Идентификация штамма проведена с учетом культурально-морфологических, физиолого-биохимических и морфометрических признаков, а также результатов сравнительного анализа последовательности гена 16S рРНК. В условиях периодической культуры исследован рост *P. aeruginosa* 21SG и установлено, что содержание фенола в культуральной жидкости снижается через 4 сут на 84% от контроля. Выявлена возможность применения *P. aeruginosa* 21SG для утилизации фенола в промышленных стоках нефтехимического производства и производства дубильных экстрактов.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, штамм-деструктор, экотоксиканты, фенол, утилизация, сточные воды

Фенол является одним из токсичных ароматических соединений, загрязняющих сточные воды при термической и химической переработке нефти, каменного угля, торфа, сланцев, древесины, а также при производстве красителей, лекарственных средств, синтетических волокон и пластмасс на основе формальдегидов, синтетических дубителей. Концентрация фенолов в производственных сточных водах может быть значительной: в сточных водах ряда нефтехимических предприятий она может составлять до 15–17 г/л. Большинство предприятий на начальном этапе осуществляют очистку фенолсодержащих сточных вод механическими методами, избавляясь от грубодисперсных взвешенных частиц, далее физико-химическими и химическими методами разрушаются комплексы и удаляются мелкодисперсные фенолсодержащие загрязнения. Конечным этапом является биологическая очистка, после которой стоки часто оказываются не избавленными от остаточных количеств фенола, длительная эмиссия которых является нежелательной для окружающей среды. В этом контексте острую необходимость осуществления эффективных коррективных мер по очистке стоков обуславливает “эффект курьеров”, заключающийся в том, что присутствие фенолов, растворителей, углеводородов способствует вертикальной миграции диоксинов из верхних слоев почвы, находящихся на глубине 5–10 см, до грунтовых вод на глубину 8–10 м. Подобные условия имеют место на территории многих промышленных предприятий, они характерны для мест утилизации и хранения промышленных отходов, свалок, нефтебаз, заправочных станций и др. [1].

Следует отметить, что известны факты, указывающие на то, что бактерии способны использовать в качестве источников питания и энергии большое число соединений, опасных по отношению к живым системам. Вместе с тем вопросы применения бактерий в практике борьбы с трудноудаляемыми остаточными количествами фенола оказались малоизученными.

Целью настоящей работы было получение характеристик нового штамма-деструктора фенола *Pseudomonas aeruginosa* 21SG и возможность его применения для доочистки промышленных стоков.

Материалы и методы

Штамм *P. aeruginosa* 21SG был выделен из пробы почвы расположенного в г. Уфе (Республика Башкортостан) предприятия, являющегося крупнейшим производителем синтетических дубителей для кожевенной промышленности России.

Выделение и идентификация штамма по признакам морфологической, морфометрической, физиологической и биохимической дифференциации. Выделение чистой культуры *P. aeruginosa* 21SG было проведено на селективной среде следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2,6; KH_2PO_4 — 2,4; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 5,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 1,0. В среду вносили смесь микроэлементов — 0,1 мл/л. Вода дистиллированная с добавлением 100 мг/л фенола в качестве единственного источника углерода и энергии. Культуральные и физиолого-биохимические свойства штамма определяли общепринятыми методами [2]. Морфометрические и морфологические характеристики были определены с помощью

атомно-силовой микроскопии на сканирующем зондовом микроскопе Solver PRO-M (NT-MDT, Россия) [3].

Секвенирование генов, кодирующих 16S рРНК, сравнение последовательностей и филогенетический анализ. Выделение ДНК из биомассы бактерий проводили согласно методу, описанному ранее [4]. Концентрация полученного препарата ДНК при использовании этого метода составляла 30–50 мкг/мл. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов частичной последовательности гена 16S рРНК была использована универсальная праймерная система [5]. Амплификационная смесь (50 мкл) имела следующий состав: буфер для ДНК-полимеразы BioTaq (БиоМастер, Россия) (17 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 67 мМ трис-НСl, pH 8,8; 2 мМ MgCl_2); по 12,5 нмоль каждого из dNTP, 50 нг ДНК-матрицы; по 5 пмоль соответствующих праймеров и 3 ед. ДНК полимеразы BioTaq (Диалат, Россия). Температурно-временной профиль ПЦР: первый цикл – 9 мин при 94°C, 1 мин при 55°C, 2 мин при 72°C; последующие 30 циклов – 1 мин при 94°C, 1 мин при 55°C, 2 мин при 72°C; завершающий цикл – 7 мин при 72°C. Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 2%-ном агарозном геле при напряженности электрического поля 6 В/см. Выделение и очистку продуктов ПЦР проводили, как описано ранее [6]. Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов генов проводили с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, США) на автоматическом секвенаторе ABI PRIZM 3730 (Applied Biosystems, США) согласно инструкциям производителя. Первичный анализ гомологии нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК изучаемого штамма проводили с помощью баз данных RDP [7] и NCBI [8]. Множественное выравнивание и построение филогенетического древа было проведено, как описано ранее [9]. Последовательность длиной 1400 пар нуклеотидов депонирована в международную базу данных GenBank под номером MH457188.

Рост культуры в жидкой питательной среде и его учет. Посевной материал получали выращиванием бактерий в разведенном в 8 раз мясоептонном бульоне при температуре 30°C. Далее культуру в концентрации $5,37 \cdot 10^8$ КОЕ засеивали в количестве 1 мл в жидкую среду объемом 100 мл 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 – 0,1 и инкубировали в термостатируемом орбитальном встряхивателе УВМТ-12-250 (Элион, СССР) при 115–120 об./мин [10]. Контроль роста вели с использованием фотокolorиметра КФК-2 (ЗОМЗ, Россия) по изменению оптической плотности клеточной суспензии при длине волны 590 нм.

Определение концентрации фенола. Определение количества фенола осуществляли стандартным фотометрическим методом [11]. Для анализов от-

бирали по 5 мл культуральной жидкости, которую освобождали от клеток центрифугированием (3630g, 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.

Определение количества фенола в сточных водах проводили по описанному ранее протоколу [9].

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

Идентификация штамма *P. aeruginosa* 21SG.

Клетки штамма представляли собой подвижные палочки, при росте на мясоептонном агаре образовывали гладкие непигментированные колонии. Окраска клеток по Граму отрицательная. Исследование физиолого-биохимических признаков изучаемого штамма показало, что для культуры характерен аэробный рост с оптимумом в диапазоне температур от +22°C до +30°C и значениях pH среды в пределах 6–8. Штамм использовал в качестве единственного источника азота соли аммония и аминокислот, а в качестве источника углерода – маннит. Изолят обладал оксидазной активностью, осуществлял восстановление нитратов, не использовал в качестве источников углерода целлюлозу, не осуществлял гидролиз крахмала, казеина, проявлял невысокую активность в отношении желатины.

При изучении морфологии и морфометрических параметров культуры 21SG было установлено, что микробная популяция на момент анализа была гетерогенна по возрасту клеток. Значительная часть бактерий в популяции (67% от всего числа клеток) была представлена молодыми клетками, сходными по морфологии. Большинство клеток популяции (95%) имело форму коротких палочек или палочек с размерами 0,37/0,73–1,4 мкм с ровной поверхностью.

Идентификация бактериального штамма 21SG проводилась на основании результатов сравнительного анализа частичной последовательности гена 16S рРНК (1400 п.н.) и близких ему последовательностей других типовых видов. На основании анализа представленного филогенетического древа можно сделать вывод о принадлежности исследуемого штамма к роду *Pseudomonas*. Уровень идентичности между ним и другими типовыми видами бактерий рода *Pseudomonas* находился в пределах

95,5–99,6%. Исследуемый штамм находится в одном кластере с представителем типового вида — штаммом *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071, который филогенетически наиболее близок к нему. Уровень идентичности между ними составил 99,6%, что соответствует внутривидовому для вида *Pseudomonas aeruginosa* (рис. 1).

Таким образом, на основании полученных результатов и в соответствии с существующими молекулярными критериями [12] исследуемый штамм был идентифицирован как *Pseudomonas aeruginosa* 21SG.

Субстратная специфичность штамма *P. aeruginosa* 21SG. В ходе дальнейшей работы был исследован рост периодической культуры *P. aeruginosa* 21SG на феноле. Накопление массы клеток при использовании фенола в качестве источника углерода и энергии начиналось с первых суток культивирования (рис. 2). Экспоненциальная фаза роста длилась 4 сут, и оптическая плотность (ОП₅₉₀) достигала 0,46 оптических единиц (о.е.), а затем, после невыраженной стационарной фазы, культура заканчивала свой рост. Содержание фенола в культуральной жидкости снижалось в течение первых суток

на 68%, а к четвертым суткам — на 84% от начального уровня.

Приведенные выше результаты показывают, что штамм *P. aeruginosa* 21SG способен активно утилизировать фенол в качестве единственного источника углерода и энергии.

Использование штамма *P. aeruginosa* 21SG для доочистки сточных вод предприятий нефтехимического профиля и производства дубильных экстрактов от фенола. Культура *P. aeruginosa* 21SG была применена для обработки загрязненных фенолом сточных вод двух промышленных предприятий, занимающихся нефтехимическим производством (НХП) и производством дубильных экстрактов (ПДЭ).

Содержание фенола в пробах сточных вод предприятия НХП составляло 0,096 мг/л, а в стоках компании ПДЭ — 0,75 мг/л. После 3 сут воздействия бактерий концентрация фенола снижалась соответственно до 0,014 и 0,06 мг/л, а в контрольной пробе сохранялась постоянной (рис. 3). Полученные данные показывают, что культура *P. aeruginosa* 21SG проявила активность в реальных условиях загрязненных сточных вод обоих производств. Существенное изменение содержания фенола в стоках

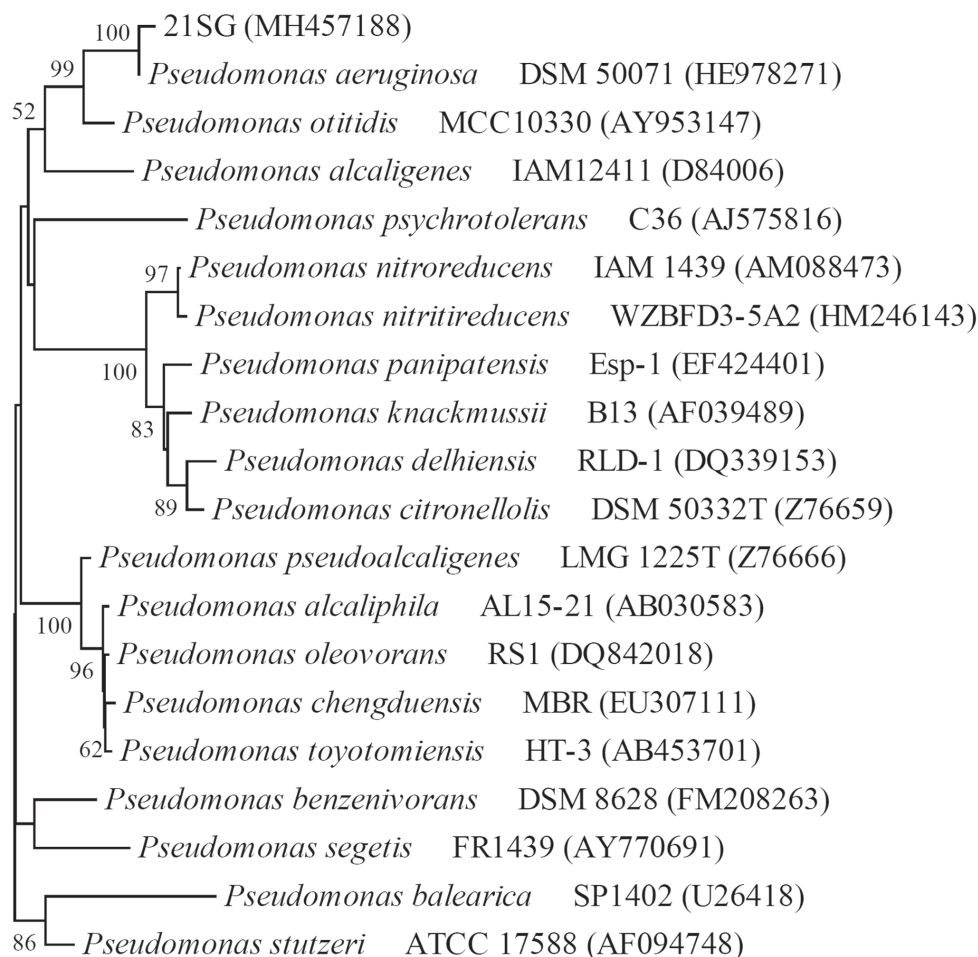


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнительного анализа частичной последовательности гена 16S рРНК штамма 21SG и гомологичных ему последовательностей типовых видов бактерий рода *Pseudomonas*. Цифрами указана достоверность ветвления, рассчитанная с помощью "bootstrap"-анализа (значимыми признаются величины больше 50). Масштаб отражает эволюционное расстояние, соответствующее 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов. Номера в GenBank указаны в скобках

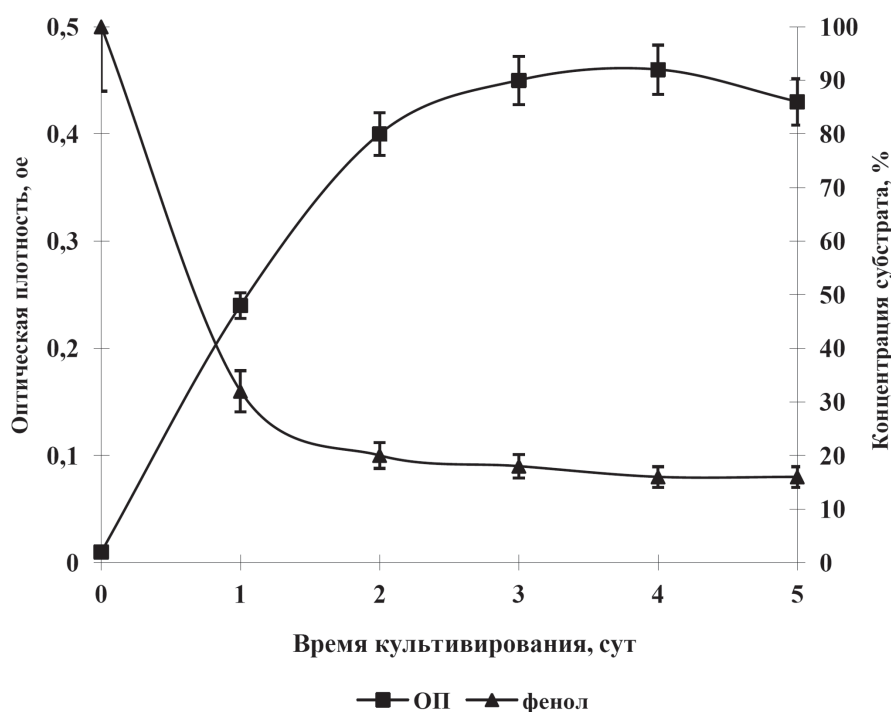


Рис. 2. Графики зависимости значений оптической плотности клеточной суспензии (ОП₅₉₀) и концентрации фенола, используемого в качестве единственного источника углерода и энергии, от времени инкубации штамма *P. aeruginosa* 21SG в периодической культуре

при использовании *P. aeruginosa* 21SG наблюдалось уже после первых суток воздействия. Степень очистки сточных вод, достигаемая при использовании штамма *P. aeruginosa* 21SG, составляла для стоков НХП 85,4%, а для стоков ПДЭ — 92%.

Обсуждая полученные данные, следует подчеркнуть, что большинство описанных в литературе культур *Pseudomonas aeruginosa* утилизировали фенол, присутствующий в сточных водах в высоких концентрациях. Так, бактериальный штамм *P. aeruginosa* KDQ4 утилизировал в сточных водах фенол в концентрации 800 мг/л [13], культура *P. aeruginosa*

NIBGE MB осуществляла деградацию фенола в концентрации 2600 мг/л [14], культура *P. aeruginosa* 101/1 эффективно удаляла фенол в концентрации 1600 мг/л [15].

Таким образом, в результате работы выявлена возможность применения штамма-деструктора *P. aeruginosa* 21SG для доочистки стоков НХП и ПДЭ от фенола

В работе было использовано оборудование регионального центра коллективного пользования “Агидель” Уфимского федерального исследовательского центра РАН.

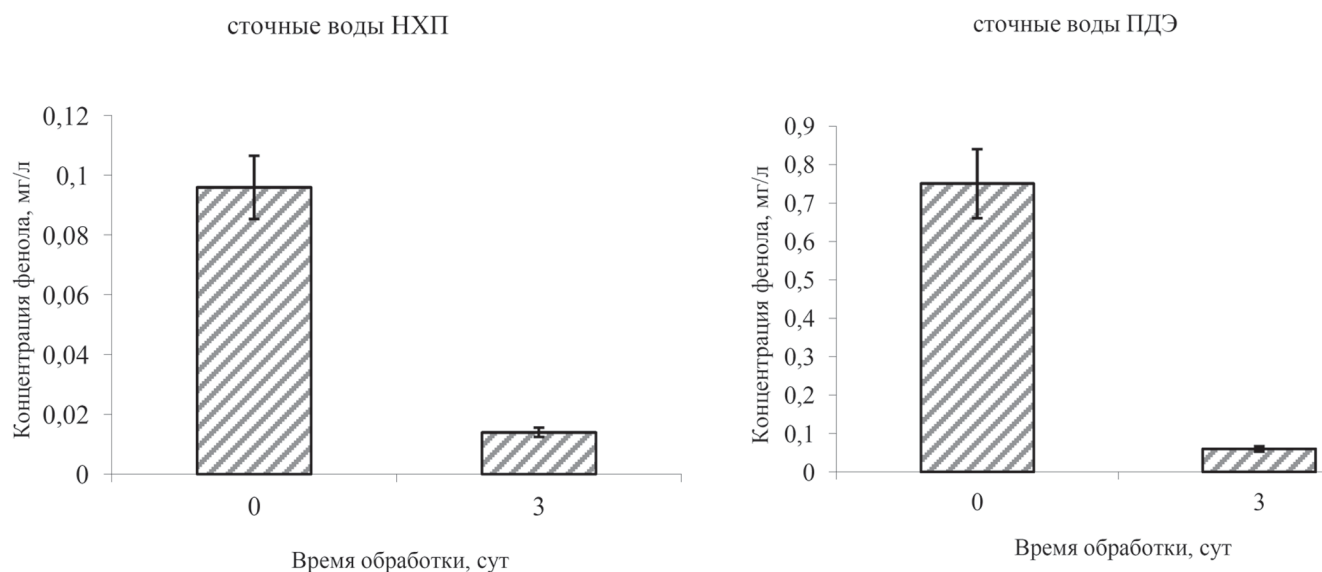


Рис. 3. Диаграммы снижения концентрации фенола в сточных водах НХП и ПДЭ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Майстренко В.Н. Эколого-аналитический мониторинг диоксинов: состояние проблемы и пути решения // Вестник АН РБ. 1997. Т. 2. № 1. С. 30–39.
2. Manual of methods for general bacteriology / Ed. P. Gerhardt. Washington: American Society for Microbiology, 1981. 536 pp.
3. 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.
4. Boulygina E.S., Kuznetsov B.B., Marusina A.I., Tourova T.P., Kravchenko I.K., Bykova S.A., Kolganova T.V., Galchenko V.F. A Study of nucleotide sequences of *nifH* genes of some methanotrophic bacteria // Microbiology. 2002. Vol. 71. N 4. С. 425–432.
5. Lane D.J. 16S/23S sequencing // Nucleic acid techniques in bacterial systematics / Eds. E. Stackebrandt and M. Goodfellow. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 1991. P. 115–175.
6. 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. 2018. Vol. 25. N 4. P. 660–671.
7. C7le 1. J.R., Wang Q., Fish J.A., Chai B., McGarrell D.M., Sun Y., Brown C.T., Porras-Alfaro A., Kuske C.R., Tiedje J.M. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis // Nucleic Acids Res. 2014. Vol. 42. N D1. P. D633–D642.
8. Benson D.A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. GenBank // Nucleic Acids Res. 2013. Vol. 41. N D1. P. D36–D42.
9. Korobov V.V., Zhurenko E.I., Zharikova N.V., Iasakov T.R., Markusheva T.V. Possibility of using phenol- and 2,4-dichlorophenol-degrading strain, *Rhodococcus erythro-*
- polis* 17S, for treatment of industrial wastewater // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. Vol. 72. N 4. P. 201–205.
10. Коробов В.В., Жарикова Н.В., Анисимова Л.Г., Ясаков 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.
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. Stackebrandt E., Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards // Microbiology Today. 2006. Vol. 8. N 4. P. 6–9.
13. Zhang P., Jia R., Zhang Y., Shi P., Chai T. Quinoline-degrading strain *Pseudomonas aeruginosa* KDQ4 isolated from coking activated sludge is capable of the simultaneous removal of phenol in a dual substrate system // J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng. 2016. Vol. 51. N 13. P. 1139–1148.
14. Afzal M., Iqbal S., Rauf S., Khalid Z.M. Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudo-mallei* // J. Hazard. Mater. 2007. Vol. 149. N 1. P. 60–66.
15. Son T.T., Błaszczyk M., Przytocka-Jusiak M. Growth and phenol activity of *Pseudomonas aeruginosa* strain 101/1 in batch cultures // Acta Microbiol. Pol. 1999. Vol. 48. N 3. P. 297–306.

Поступила в редакцию
21.03.2018

Принята к печати
07.06.2018

MICROBIOLOGY

APPLICATION OF PHENOL-DEGRADING STRAIN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* 21SG FOR TREATMENT OF INDUSTRIAL WASTEWATER

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

Ufa Institute of Biology Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
prospect Oktyabrya, 69, Ufa, 450054, Russia

*e-mail: vacikk@mail.ru

The features of the phenol-degrading strain *Pseudomonas aeruginosa* 21SG, isolated from the soil of the Ufa (Republic of Bashkortostan) largest producer of synthetic tanning agents in Russia, are described. Identification of the strain was performed according to the cultural, morphological, physiological, biochemical, morphometric features, as well as the results of the comparative analysis of the 16S rRNA gene sequence. The growth of *P. aeruginosa* 21SG in the batch culture was studied. It was established that the phenol content was reduced to the 4th day by 84% from the control in the culture liquid. The possibility of using *P. aeruginosa* 21SG for phenol utilization in industrial wastewater of petrochemical production and production of tanning extracts has been revealed.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, degrader strain, ecotoxicants, phenol, utilization, wastewater

Сведения об авторах

Коробов Владислав Викторович – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории прикладной микробиологии Уфимского Института биологии УФИЦ 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 УФИЦ 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 УФИЦ 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 УФИЦ 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 УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: tvmark@anrb.ru