

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 579.222.2:579.69

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВОГО ШТАММА-ДЕСТРУКТОРА *BACILLUS MOBILIS* 34Т ДЛЯ ОЧИСТКИ ПОЧВЫ ОТ 2,4,5-ТРИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

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

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

*e-mail: vacikk@mail.ru

Описан новый штамм-деструктор 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4,5-Т), выделенный из пробы почвы предприятия, которое являлось крупнейшим производителем гербицидов в России. Идентификация штамма проведена с учетом культурально-морфологических, морфометрических, физиолого-биохимических признаков, а также результатов сравнительного анализа последовательности гена 16S рРНК. Выделенный штамм определен как *Bacillus mobilis* 34Т. Исследован рост периодической культуры *B. mobilis* 34Т в условиях использования 2,4,5-Т в концентрации 100 мг/л в качестве источника углерода и энергии. Содержание 2,4,5-Т в культуральной жидкости в течение первых суток снижалось на 29%, к 9-м сут — на 62% от начального уровня. Штамм *B. mobilis* 34Т был применен для биологической очистки почвы, загрязненной 2,4,5-Т. Степень очистки составляла на 5-е сут 41%, на 10-е сут — 52% и на 15 — 20-е сутки культивирования — 58%.

Ключевые слова: *Bacillus mobilis*, штамм-деструктор, 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота, утилизация, гербициды, почва

Присутствие в биосфере хлорированных ароматических производных представляет существенную опасность для окружающей среды [1]. 2,4,5-Трихлорфеноксиуксусная кислота (2,4,5-Т), обладающая токсичными и канцерогенными свойствами, в сочетании с другими гербицидами широко применялась при выращивании зерновых культур, использовалась на пастбищах и газонах, а также в лесном хозяйстве. Агентство по защите окружающей среды США (USEPA) включило 2,4,5-Т в группу токсичных и ассоциированных с риском для здоровья человека веществ. 2,4,5-Т имеет тенденцию к накоплению в тканях, способна к кумулятивному токсическому воздействию на теплокровные организмы. Одной из причин такого положения является наличие в молекуле 2,4,5-Т галогенуглеродных связей, которые трудно расщепляются в клетках живых систем.

Известно, что микроорганизмы играют важную роль в утилизации органических загрязнителей. Современный этап исследований биологического воздействия на ксенобиотики характеризуется выраженным практическим интересом к выделению и изучению новых бакте-

риальных штаммов-деструкторов. Это связано с их высокой генетической пластичностью и, как следствие, высокой приспособляемостью к изменяющимся условиям окружающей среды. Благодаря этому бактерии приобретают способность использовать в качестве источников питания и энергии разнообразные производные, в том числе — токсичные по отношению к про- и эукариотам. Число описанных в литературе бактериальных культур, способных метаболизировать 2,4,5-Т, ограничено. Для вида *B. mobilis* свойство деградации 2,4,5-Т ранее не было установлено.

Материалы и методы

Штамм *B. mobilis* 34Т был выделен из пробы почвы расположенного в г. Уфе (Республика Башкортостан) вблизи предприятия, которое являлось крупнейшим производителем гербицидов в России. Тип почвы — аллювиальная с тяжелым механическим составом (легкие глины и тяжелые суглинки).

Выделение и идентификация штамма по признакам морфологической, морфометрической, физиологической и биохимической дифференциации.

Выделение чистой культуры *B. mobilis* 34Т 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 качестве единственного источника углерода и энергии в среду добавляли 2,4,5-Т в концентрации 100 мг/л. Физиолого-биохимические и культуральные свойства штамма определяли методами, описанными ранее [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 геномной ДНК штамма 34Т, амплификацию полной последовательности гена 16S рРНК и дальнейшее секвенирование проводили по методикам, описанным ранее [4]. Филогенетический анализ также был проведен по описанной ранее методике [5]. Штамм депонирован в международную базу данных GenBank под номером MK300727.

Рост культуры в жидкой питательной среде и его анализ. Посевной материал получали выращиванием бактерий в разведенном в 8 раз мясопептонном бульоне при температуре 30°C. Далее культуру в концентрации $5,4 \cdot 10^8$ колониеобразующих единиц (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; 2,4,5-Т – 0,1 и инкубировали в термостатируемом орбитальном встряхивателе УВМТ-12-250 («Элион», СССР) при 120 об./мин. Контроль роста осуществляли с использованием фотокolorиметра КФК-2 («ЗОМЗ», Россия) по изменению оптической плотности клеточной суспензии при длине волны 590 нм.

Определение концентрации 2,4,5-Т в культуральной жидкости. Определение проводили согласно методам, описанным ранее [2]. Для анализов отбирали по 10 мл культуральной жидкости на 3-и, 5-е и 7-е сут инкубации штамма. Пробы освобождали от клеток штамма центрифугированием (3630g, 30 мин). Далее жидкость подкисляли до pH 2 добавлением 1 н соляной кислоты. В каждую пробу добавляли в качестве стандарта 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) до конечной концентрации 100 мг/л. Затем из проб проводили 3-кратную экстракцию 2,4,5-Т и 2,4-Д равными объемами хлороформа. После экстракции хлороформ удаляли отгонкой на вакуумном роторном испарителе. Экстракты 2,4,5-Т и 2,4-Д переводили в гексан и фракционировали методом тонкослой-

ной хроматографии. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинах силуфол UV-254 («Kavalier», Чехия). Сканирование образцов проводили при длине волны 280 нм в камере Chromoscan 201 («Jouze-Loebl», Великобритания). Содержание 2,4,5-Т определяли по калибровочному графику для чистого стандарта 2,4,5-Т.

Определение концентрации 2,4,5-Т в почве. В модельном эксперименте использовали почву экологически чистого Зилаирского района Республики Башкортостан. Тип почвы – горно-лесная темно-серая, с тяжелосуглинистым и глинистым механическим составом. Для исследований в почву вносили 2,4,5-Т в концентрации 100 мг/кг. 20 г почвы помещали в стеклянные стаканы объемом 100 мл. Для проведения процесса биологической очистки в почву вносили посевной материал культуры *B. mobilis* 34Т из расчета 105–106 КОЕ на 1 г почвы. Культивирование проводили при 24–27°C в течение 21 сут. На 5-е, 10-е, 15-е и 20-е сут инкубации проводили отбор почвы в количестве 2 г. К каждой пробе добавляли по 10 мл дистиллированной воды. Пробы помещали на 20 мин во встряхиватель УВМТ-12-250 («Элион», СССР). Данную процедуру повторяли 3 раза. Водную вытяжку объединяли и осветляли центрифугированием (3630g, 30 мин). Тонкослойную хроматографию и анализ содержания 2,4,5-Т проводили так, как описано выше для определения 2,4,5-Т в культуральной жидкости.

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 *B. mobilis* 34Т. В ходе определения основных морфологических и физиолого-биохимических признаков культуры 34Т было показано, что эта культура образует на агаре беловатые непрозрачные мелко складчатые колонии. Клетки имели положительную окраску по Граму. Для штамма был характерен аэробный рост, оптимальный рост наблюдался в диапазоне температур от +22°C до +41°C и значениях pH среды, близких к нейтральным (6,8). Культура не использовала в качестве источника углерода цитрат, пропионат, фенилаланин, не наблюдалось образования кислоты из арабинозы, ксилозы, маннита, газа из глюкозы, а при ассимиляции глюкозы среда подкислялась. Бактерии осуществляли гидролиз желатина, проявляли невысокую активность в отноше-

нии крахмала и казеина, обладали каталазной, лецитиназной активностью, осуществляли редукцию NO_3^- . В присутствии 2% NaCl наблюдался небольшой рост, а в диапазоне концентрации от 5 до 10% NaCl рост бактерий отсутствовал.

Изучение морфо-популяционных особенно-

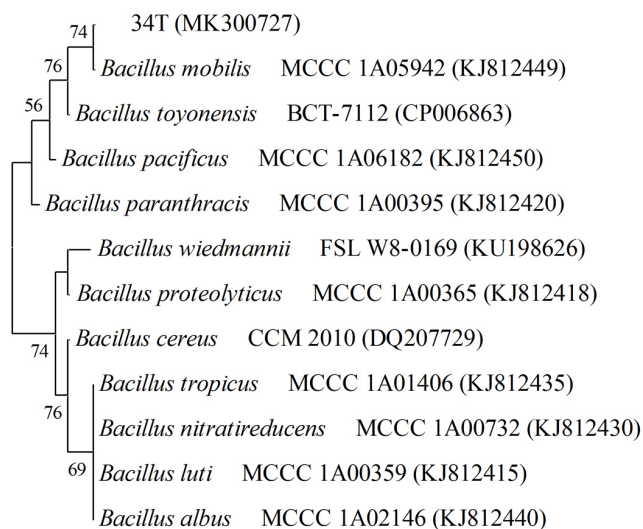


Рис. 1. Филогенетическое древо, показывающее положение штамма 34Т (МК300727) и близких ему типовых штаммов группы *Bacillus cereus* (построено методом Neighbor-Joining). Цифрами указана достоверность ветвления, рассчитанная с помощью «bootstrap»-анализа (значимыми признаются величины больше 50). Масштаб отражает эволюционное расстояние, соответствующее 5 нуклеотидным заменам на каждые 10000 нуклеотидов. В скобках указаны номера в GenBank

стей клеточной суспензии штамма 34Т показало, что клетки имеют крупные размеры, варьирующие в пределах 0,63/1,47–0,77/2,47 мкм, также обнаруживались единичные образования округлой и овальной формы размерами 0,4–0,4/0,7 мкм, которые представляли собой споры этой культуры. Более старые микробы имели несколько искривленную форму и более рыхлую цитоплазму, а их размеры примерно на 10% превышали размеры молодых клеток.

Анализ филогенетического древа, построенного методом Neighbor-Joining [6] показал, что исследуемый штамм 34Т принадлежит к группе *Bacillus cereus* [7]. Уровень идентичности между последовательностями генов 16S рРНК исследуемого штамма (1509 п.н.) и типовых штаммов группы *Bacillus cereus* составил 99,46–99,93%. Филогенетически наиболее близким к исследуемому штамму был типовой представитель вида *Bacillus mobilis* – штамм MCCC 1A05942^T (=KCTC 33717^T=LMG 28877^T) (KJ812449), который образовывал с ним единый кластер. Уровень идентичности между ними составил

99,93%. Таким образом, согласно существующим в настоящее время представлениям [8], штамм 34Т принадлежит виду *Bacillus mobilis*.

С учетом культурально-морфологических, физиолого-биохимических свойств и по молекулярным критериям штамм идентифицирован как *Bacillus mobilis* 34Т (рис. 1).

Субстратная специфичность штамма *B. mobilis* 34Т. При использовании 2,4,5-Т в качестве источника углерода и энергии изменение значений оптической плотности клеточной суспензии *B. mobilis* 34Т отмечалось после невыраженной лаг-фазы. Максимальное значение оптической плотности наблюдалось на 3-е сут инкубации и составляло 0,79 оптических единиц (о.е.), затем культура заканчивала свой рост и переходила в стационарную фазу. В течение первых суток культивирования концентрация 2,4,5-Т снижалась на 29%, к 9-м сут инкубации – на 62% от начального уровня (рис. 2).

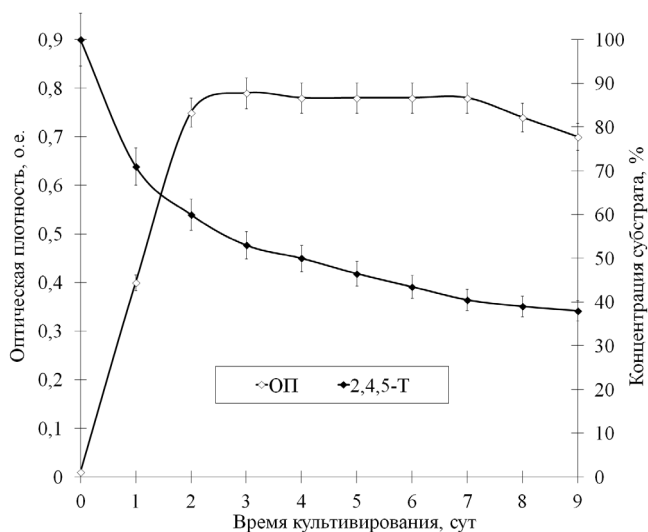


Рис. 2. Графики зависимости значений оптической плотности клеточной суспензии (ОП₅₉₀) и концентрации 2,4,5-Т, используемой в качестве единственного источника углерода и энергии, от времени инкубации штамма *B. mobilis* 34Т в периодической культуре

Использование штамма *B. mobilis* 34Т для очистки почвы от 2,4,5-Т. Штамм *B. mobilis* 34Т был применен для биологической очистки почвы, загрязненной 2,4,5-Т в концентрации 100 мг/кг. Уменьшение концентрации 2,4,5-Т в почве происходило в течение 20 сут. Степень очистки, достигаемая при использовании данной культуры, составляла 41% на 5-е сут, 52% на 10-е сут и 58% – на 15–20-е сут культивирования.

В литературе описано несколько штаммов, принимающих участие в биологической дегра-

дации 2,4,5-Т. Штамм *Pseudomonas cepacia* AC1100 при оптимальной температуре и влажности разлагал до 95% 2,4,5-Т при концентрации 1 мг/г почвы в течение 7 сут [9]. Штамм *Burkholderia* sp JR7B3 минерализовывал 2,4,5-Т в концентрации 1 мг/мл в присутствии 0,01% дрожжевого экстракта [10].

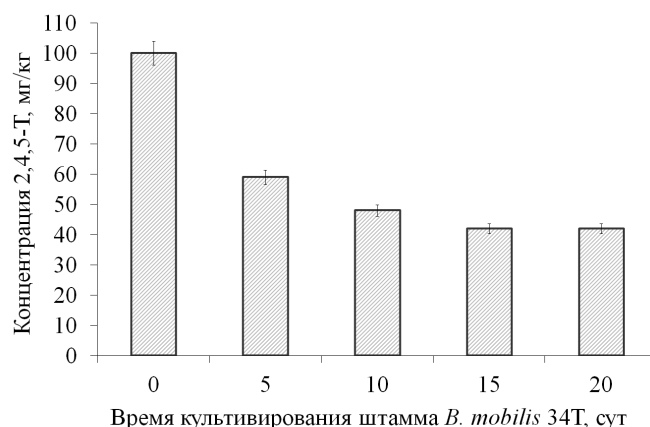


Рис. 3. Зависимость снижения концентрации 2,4,5-Т в почве от времени инкубации штамма *B. mobilis* 34Т

Ранее нами было выделено и описано несколько культур, способных использовать 2,4,5-Т в качестве единственного источника углерода и энергии. Культура *Gluconobacter oxydans* 2Т

утилизировала 81% 2,4,5-Т в периодической культуре и 67% в почве при концентрации 2,4,5-Т 100 мг/кг. [11]. Штамм *Rhodococcus rubropertinctus* 5D утилизировал около 40% 2,4,5-Т на 8-е сут в жидкой среде культивирования [12]. Показана принципиальная возможность накопления биомассы культурами *B. subtilis* CN93F и *B. simplex* CM53F при использовании 2,4,5-Т в качестве источника питания.

Принимая во внимание приведенные данные, следует отметить, что для представителей *B. mobilis* ранее не была установлена возможность ассимиляции 2,4,5-Т. Мы показали, что штамм *B. mobilis* 34Т способен использовать 2,4,5-Т в качестве источника углерода и энергии в водной среде и почве. Выявленное свойство позволяет применять данный штамм для ремедиации окружающей среды.

В работе было использовано оборудование регионального центра коллективного пользования «Агидель» Уфимского федерального исследовательского центра РАН.

Работа выполнена в рамках государственного задания (номер гос. регистрации — АААА-А18-118022190098-9).

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sastry B.V., Janson V.E., Clark C.P., Owens L.K. Cellular toxicity of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid: formation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetylcholine // Cell Mol. Biol. 1997. Vol. 43. N 4. P. 549–557.
2. Korobov V.V., Zhurenko E.Yu., Galkin E.G., Zharikova N.V., Iasakov T.R., Starikov S.N., Sagitova A.I., Markusheva T.V. Cellulosimikrobium sp. Strain NPZ-121, a Degradar of 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid // Microbiology. 2018. Vol. 87. N 1. P. 147–150.
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. Zharikova N.V., Iasakov T.R., Bumazhkin B.K., Patutina E.O., Zhurenko E.I., Korobov V.V., Sagitova A.I., Kuznetsov B.B., Markusheva T.V. 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.
5. 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 erythropolis* 17S, for treatment of industrial wastewater // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. Vol. 72. N 4. P. 235–240.
6. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. N 4. P. 406–425.
7. Liu Y., Du J., Lai Q., Zeng R., Ye D., Xu J., Shao Z. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. Vol. 67. N 8. P. 2499–2508.
8. Stackebrandt E., Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards // Microbiol. Today. 2006. Vol. 33. N 4. P. 152–155.
9. Chatterjee D.K., Kilbane J.J., Chakrabarty A.M. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in soil by a pure culture of *Pseudomonas cepacia* // Appl. Environ. Microbiol. 1982. Vol. 44. N 2. P. 514–516.
10. Rice J.F., Menn F.M., Hay A.G., Sanseverino J., Sayler G.S. Natural selection for 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid mineralizing

bacteria in agent orange contaminated soil // Biodegradation. 2005. Vol. 16. N 6. P. 501–512.

11. Zhurenko E.Yu., Markusheva T.V., Galkin E.G., Korobov V.V., Zharikova N.V., Gafiyatova L.R. *Gluconobacter oxydans* IBRB-2T Degrades 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid // Biotechnol. Russ. 2003. N 6. P. 75–80.

12. Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Ясаков Т.Р., Анисимова Л.Г., Маркушева

Т.В., Абрамов С.Н. Выделение и анализ биодegradационного потенциала нового природного штамма-деструктора хлорфеноксикислот рода *Rhodococcus* // Изв. Самар. Науч. центра РАН. 2011. Т. 13. № 5–2. С. 169–171.

Поступила в редакцию 14.03.2019 г.

После доработки 08.05.2019 г.

Принята в печать 20.06.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

APPLICATION OF THE NEW DEGRADER STRAIN BACILLUS MOBILIS 34T FOR SOIL CLEARING FROM 2,4,5-TRICHLOROPHENOXYACETIC ACID

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

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

*e-mail: vacikk@mail.ru

The 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)-degrading strain *Bacillus mobilis* 34T isolated from the soil sample of the largest producer of herbicides in Russia was described. The strain was identified as *Bacillus mobilis* 34T according to the cultural, morphological, morphometric, physiological, biochemical, features as well as the results of the comparative analysis of the 16S rRNA gene sequence. The growth of *B. mobilis* 34T in the batch culture with using 2,4,5-T as a sole source of carbon and energy was studied. It was showed that 2,4,5-T content was reduced from the initial level by 29% and 62% during the first and ninth day, respectively. The strain was used for the treatment of a soil contaminated with 2,4,5-T. The decontamination degree was 41%, 52%, 58% on the 5th, 10th and 15–20st days of cultivation, respectively.

Keywords: *Bacillus mobilis*, degrader strain, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, utilization, herbicides, soil

Сведения об авторах

Коробов Владислав Викторович — канд. биол. наук, ст. 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, ст. 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, ст. 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