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

ДЕГРАДАЦИЯ ФЕНОЛА И 2,4-ДИХЛОРФЕНОЛА БАКТЕРИЯМИ ВИДА *RAOULTELLA PLANTICOLA*

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

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа
*E-mail: puzzle111@yandex.ru

Исследована способность трех природных изолятов вида *Raoultella planticola* раздельно использовать фенол и 2,4-дихлорфенол (2,4-ДХФ) в качестве единственного источника углерода и энергии. Все исследуемые штаммы проявили способность к конверсии фенола, но наиболее эффективным деструктором оказалась культура *R. planticola* 36Т, которая утилизировала 97% субстрата. Вследствие большей токсичности 2,4-ДХФ только один штамм 33-4ch мог использовать данный субстрат с конечной эффективностью 73%. Штаммы не оказывали антагонистического влияния друг на друга, что говорит о возможности их совместного применения для очистки окружающей среды от хлорароматических загрязнителей.

Ключевые слова: фенол ◆ 2,4-дихлорфенол ◆ бактерии-деструкторы ◆ биодеградация ◆ антагонизм

DEGRADATION OF PHENOL AND 2,4-DICHLOROPHENOL BY BACTERIA OF THE SPECIES *RAOULTELLA PLANTICOLA*

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

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa
*E-mail: puzzle111@yandex.ru

The ability of three natural isolates of the species *Raoultella planticola* to separately use phenol and 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) as the only source of carbon and energy was studied. All strains converted phenol, but *R. planticola* 36T was the most effective and utilized 97% of the substrate. Due to the higher toxicity of 2,4-DCP, only one strain 33-4ch could use this substrate with a final efficiency of 73%. The strains did not antagonize each other, which indicates the possibility of their combined use for cleaning the environment from chloroaromatic pollutants.

Keywords: phenol ◆ 2,4-dichlorophenol ◆ degrader strain ◆ biodegradation ◆ antagonism

Поступила в редакцию: 03.12.2021

DOI: 10.31163/2618-964X-2021-4-4-282-286

ВВЕДЕНИЕ

Фенол и его хлорированные производные являются стойкими загрязнителями окружающей среды, которые используются при производстве красителей, лекарств, пестицидов и других промышленных продуктов. Из всех подходов к решению проблемы очистки среды от ароматических соединений наиболее перспективна их микробиологическая деградация. Микроорганизмы-деструкторы катаболизируют (хлор)ароматические вещества, превращая их в гидроксилированные производные с последующим раскрытием бензольного кольца и образованием многочисленных легко утилизируемых субстратов. Получающиеся продукты биодеградации представляют интерес как с точки зрения исследования основных путей биоутилизации (хлор)ароматических соединений, так и перспективы их использования для очистки окружающей среды [Czaplicka, 2004, Arora and Bae, 2014].

Цель работы – исследование антагонистической активности и потенциала деградации фенола и 2,4-дихлорфенола (2,4-ДХФ) бактериальных штаммов вида *Raoultella planticola*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследований служили три природных бактериальных штамма: 33-4ch, 36D и 36T, изолированные из образцов почвы, загрязненной отходами химического производства (Уфа, Россия).

Посевной материал для учета роста культуры в жидкой питательной среде получали выращиванием бактерий в разведенном в 5 раз мясо-пептонном бульоне (МПБ) при температуре 30°С. Далее культуру в количестве 5% от общего объема засевали в минимальную среду М9 (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; 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 фотоколориметра КФК-2 (ЗОМЗ, Россия) по изменению оптической плотности клеточной суспензии при длине волны 590 нм.

Содержание фенола/2,4-ДХФ в культуральной жидкости определяли стандартным фотометрическим методом [Коробов и др., 2018]. Культуральную жидкость объемом 5 мл освобождали от клеток центрифугированием (3630 *g*, 30 мин), а затем 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 и через 10 мин измеряли коэффициент пропускания на фотоколориметре КФК-2 при длине волны 540 нм. Количество фенола/2,4-ДХФ определяли по калибровочному графику.

Оценку антагонистической активности бактерий проводили методом перпендикулярных штрихов, как было описано ранее [Журенко и др.,2012].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучаемые бактериальные изоляты 33-4ch, 36D и 36T ранее были идентифицированы как принадлежащие к виду *Raoultella planticola*, а их практически полные последовательности амплификатов генов (1439 п.н., соответствующие позициям 42-1481 по номенклатуре *E. coli*), кодирующих 16S рРНК, оказались идентичными и депонированы в базе данных GenBank (DQ333356). (Жарикова и др., 2006, 2021)

Для определения потенциала деградации фенола и 2,4-ДХФ, изучаемые штаммы выращивали на минимальной среде М9, раздельно содержащей вышеуказанные субстраты (табл. 1).

Таблица 1. Рост бактериальных изолятов на феноле и 2,4-ДХФ как единственных источников углерода и энергии

Штамм	Рост на феноле	Рост на 2,4-ДХФ
33-4ch	+	+
36D	+	–
36T	+	–

Примечание: «+» – наличие роста; «–» – отсутствие роста

На 5-е сутки из трех штаммов на минимальной среде с 2,4-ДХФ, как единственным источником питательных веществ, вырос только один – 33-4ch. На среде с фенолом хорошо росли все культуры.

Далее были детально исследованы динамики роста и утилизации субстратов у деструкторов фенола (Рис. A, B, C).

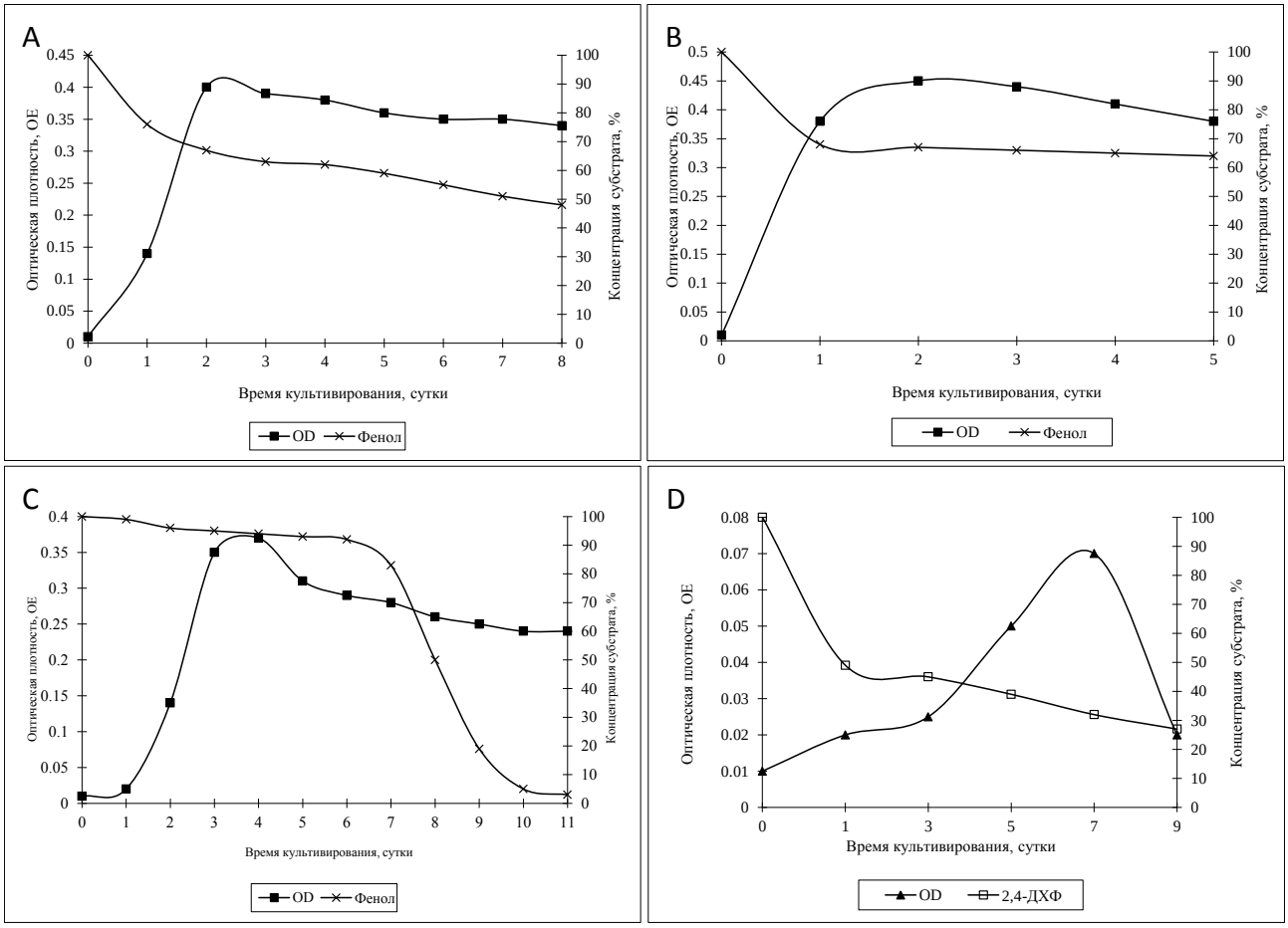

Рис. 1. Зависимость значений оптической плотности клеточной суспензии (ОП$_{590}$) и концентрации субстрата от времени инкубации штаммов *R. planticola* 33-4ch (A), *R. planticola* 36D (B), *R. planticola* 36T (C) на феноле, *R. planticola* 33-4ch (D) на 2,4-ДХФ в периодической культуре.

Оптическая плотность клеточной суспензии штамма *R. planticola* 33-4ch при использовании фенола как единственного источника питания достигала максимального значения (0.4 ОЕ) на вторые сутки культивирования. В это время происходила значительная убыль субстрата (24%). Затем до конца культивирования концентрация фенола уменьшалась постепенно и к 8-мым суткам достигла 48% от исходной.

Активный рост культуры *R. planticola* 36D наблюдался в первые сутки культивирования, когда концентрация субстрата упала на 32%. К концу опыта (5-е сут) содержание фенола составило 64% от первоначального значения.

У штамма *R. planticola* 36T при росте на феноле визуализировалась лаг фаза, после которой до конца 4-х суток наблюдалась фаза логарифмического роста культуры. В то же время концентрация субстрата падала незначительно, а резкая убыль фенола произошла после 7-х суток культивирования и к концу опыта составила 3% от исходной.

Только один штамм *R. planticola* 33-4ch был способен использовать 2,4-ДХФ в качестве единственного источника углерода и энергии. При этом оптическая плотность его клеточной суспензии достигала максимального значения только на 7-е сутки культивирования и составила 0.07. Не смотря на такой слабый рост концентрация субстрата составила к этому времени 32%, а к концу опыта – 27% от исходной (Рис. D).

Таким образом, все исследуемые штаммы проявили способность к конверсии фенола, но наиболее эффективным деструктором оказалась культура *R. planticola* 36T, которая утилизировала 97% субстрата.

Как известно токсичность хлорированных фенолов зависит от двух факторов: количества атомов хлора в молекуле субстрата и от их положения, особенно в 3-, 4- и 5-ой позициях [Czaplicka, 2004]. Поэтому не удивительно, что только один штамм *R. planticola* 33-4ch проявил активность по отношению 2,4-ДХФ.

Необходимо отметить, что бактериальные культуры 33-4ch, 36D и 36T ранее показали себя как эффективные деструкторы 2,4-дихлорфеноксиуксусной и 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислот [Жарикова и др., 2006, 2021]. Следовательно, все три штамма вида *Raoultella planticola* обладают полисубстратной активностью по отношению к хлорароматическим субстратам.

Для определения возможности совместного применения вышеуказанных штаммов исследовались их межбактериальные взаимодействия методом перпендикулярных штрихов. Результаты работы представлены в таблице 2.

Таблица 2. Межбактериальные взаимодействия культур 33-4ch, 36D и 36T

Продуцент / Тест-организм	33-4ch	36D	36T
33-4ch		+	+
36D	+		+
36T	+	+	

Примечание: «+» – наличие роста тест-организма

В результате проведенного исследования было установлено, что ни один из исследованных штаммов не проявляет антагонистического воздействия по отношению к другим. Таким образом, все три штамма вида *Raoultella planticola* могут быть использованы совместно в технологиях очистки окружающей среды от загрязнителей хлорароматической природы.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

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., Маркушева Т.В., Галкин Е.Г. и др. *Raoultella planticola* – новый штамм-деструктор 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 3. С. 292–297. DOI: 10.1134/S0003683806030069
2. Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Маркушева Т.В. Плазмиды деградации хлорфеноксиуксусных кислот бактерий рода *Raoultella* //

Прикладная биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 3. С. 235-244. DOI: 10.31857/S0555109921030156

3. Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Коробов В.В., Маркушева Т.В. Особенности антагонистических взаимодействий природных бактерий-деструкторов ароматических галогенидов // Известия Уфимского научного центра РАН. 2012. № 3. С. 53-56.
4. Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Маркушева Т.В. 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.
5. Arora P.K., Bae H. Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives // Microb. Cell. Fact. 2014. V. 13. Article 31. DOI: 10.1186/1475-2859-13-31
6. Czaplicka M. Sources and transformations of chlorophenols in the natural environment // Sci. Total. Environ. 2004 V. 322. № 1–3. P. 21–39. DOI: 10.1016/J.SCITOTENV.2003.09.015