ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>

ШТАММ *ENTEROBACTER* SP. UOM-3 СПОСОБЕН К СИНХРОННОЙ ДЕСТРУКЦИИ ГАЛОГЕНСОДЕРЖАЩИХ ГЕРБИЦИДОВ И СИНТЕЗУ ИНДОЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Стариков С.Н.*, Четвериков С.П.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа (Россия)

*E-mail: senik0406@gmail.com

В работе был изучен штамм-нефтедеструктор *Enterobacter* sp. UOM-3, выделенный и идентифицированный ранее. В ходе исследования было показано, что бактерии способны синтезировать индол-3-уксусную кислоту (ИУК) при росте в средах с галогенсодержащими гербицидами Октапон и Флоракс: деструкция 2,4-Д на 4 сутки культивирования достигала 79% и 68% соответственно, максимальная концентрация ИУК за время эксперимента составляла 485 нг/мл и 270 нг/мл. Штамм может быть применен в составе биопрепарата для ремедиации окружающей среды и для стимуляции роста и развития растений.

Ключевые слова: бактерии, ИУК, гербициды, 2,4-Д, биоремедиация, ВЭЖХ

STRAIN *ENTEROBACTER* SP. UOM-3 IS ABLE TO SYNCHRONOUS DESTRUCTION OF HALOGEN-CONTAINING HERBICIDES AND SYNTHESIS OF INDOL-3-ACETIC ACID

Starikov S.N.*, Chetverikov S.P.

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of
the Russian Academy of Sciences, Ufa (Russia)

*E-mail: senik0406@gmail.com

We studied the *Enterobacter* sp. UOM-3 oil destructor strain that was isolated and identified earlier. During the study, it was shown that these bacteria are able to synthesize indole-3-acetic acid (IAA) when growing in culture medium with the halogen-containing herbicides Octapone and Florax: the destruction of 2,4-D on the 4th day of cultivation reached 79% and 68%, respectively, the maximum concentration of IAA during the experiment was 485 ng / ml and 270 ng / ml.

The strain can be applied as part of a biological product to remediate the environment and to stimulate plant growth and development.

Keywords: bacteria, IAA, herbicides, 2,4-D, bioremediation, HPLC

Поступила в редакцию: 13.11.2020

DOI: [10.31163/2618-964X-2020-3-4-716-721](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-4-716-721)

ВВЕДЕНИЕ

2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) была первым представленным в 1940-х гг. на рынке коммерческим препаратом для борьбы с сорной растительностью и до сих пор остается одним из наиболее часто используемых гербицидов в мире из-за низкой стоимости, селективности, эффективности и широкого спектра подавляемых сорняков. 2,4-Д представляет собой - умеренно стойкое химическое вещество с периодом полураспада от 20 до 312 дней в зависимости от условий окружающей среды [Ordaz-Guillén et al., 2014]. Из-за слабой адсорбции и высокой растворимости в воде 2,4-Д легко вымывается с полей и часто обнаруживается в поверхностных и подземных водах, что представляет существенную экологическую проблему и опасность для здоровья [Gaultier et al., 2008; Kearns et al., 2014; Shareef and Shaw, 2008].

В научной литературе имеются сообщения о разработке и планируемом внедрении устойчивых к 2,4-Д сельскохозяйственных культур (например, новых сортов кукурузы и сои), что может привести к более широкому использованию гербицида и потенциально небезопасному уровню его остатков в окружающей среде [Schütte et al., 2017].

Указанные тенденции повышают актуальность разработки мер по удалению из почвы остатков 2,4-Д и ликвидации локальных очагов загрязнения сельскохозяйственных угодий этим гербицидом, возникающих в случае нарушения техники безопасности во время приготовления рабочих растворов, очистке оборудования и утилизации неиспользованных препаратов. Одно из эффективных, экономически выгодных и безопасных направлений в этой области – применение микроорганизмов-деструкторов [Nayak et al., 2018; Yang et al., 2018], в том числе ассоциированных с растениями бактерий [Germaine et al., 2006]. При этом малоизученным остается вопрос влияния 2,4-Д на свойства бактерий, важные для установления их связи с растениями, например, на синтез микроорганизмами фитогормонов.

В связи с этим, целью настоящего исследования стало изучение способности штамма *Enterobacter* sp. UOM-3 к деструкции 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и ее влиянии на синтез штаммом индолилуксусной кислоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штамм *Enterobacter* sp. UOM-3, выбранный в качестве объекта исследования, обладал способностью к деструкции нефтяных углеводородов и к стимуляции роста растений на незагрязненной и загрязненной нефтью почве [Четвериков и др., 2019; Высоцкая и др., 2020]. Клетки штамма *Enterobacter* sp. UOM-3 культивировали в конических колбах на термостатируемом шейкере (160 об/мин) при температуре 28 °С в течение 4 суток. В качестве питательного субстрата использовали минеральную основу среды Раймонда [Raymond, 1961] с добавлением 1 г/л пептона и 1 мл/л гербицидов «Октапон экстра» или «Флоракс». «Октапон экстра» – гербицид избирательного действия, содержащий 500 г/л 2,4-Д (производится в настоящее время). «Флоракс» - двухкомпонентный гербицид, содержащий 550 г/л 2,4-Д и 7,4 г/л флорасулама (производится в настоящее время). Готовые препаративные формы гербицидов были выбраны в связи с тем, что поверхностно-активные вещества и другие их компоненты могут изменять уровень токсичности гербицидов [RodeaPalomares et al., 2015].

Рост штамма оценивали по оптической плотности (ОП₅₉₀) клеточной суспензии на спектрофотометре СФ-56 (Россия).

Отбор проб для оценки содержания ИУК и 2,4-Д в культуральной жидкости (КЖ) проводили каждые 24 часа. КЖ подвергали центрифугированию при 8000 g с последующей ультрафильтрацией через кассеты с диаметром пор 1 кДа («SARTOCOON Slice Cassete», Германия). Ультрафильтраты анализировали в системе ВЭЖХ LC-20 Prominence с диодно-матричным детектором SPD-M20A («Shimadzu», Япония). Для хроматографического разделения использовали колонку Zorbax-ODS (250x4,6 мм) («Shimadzu», Япония) в изократическом режиме при соотношении растворителей 0,1% уксусной кислоты в воде: ацетонитрил – 20:80. Поглощение регистрировали при длине волны 279 нм.

Концентрацию ИУК определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием стандарта («Sigma», США), в интервале концентраций 10–10000 нг/мл.

Относительное уменьшение количества 2,4-Д в отобранных в разное время пробах оценивали, сравнивая на хроматограмме высоту соответствующих этому веществу пиков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа ультрафильтратов исследуемых образцов методом ВЭЖХ при вышеперечисленных условиях были получены хроматограммы с хорошо разрешёнными

пиками с временами выхода 17,4 и 44,9 мин, которые соответствовали пикам стандартов ИУК (рис. 1а) и 2,4-Д (рис. 1б). Типовая хроматограмма ультрафильтрата представлена на рис. 1в.

Результаты хроматографического определения 2,4-Д в КЖ штамма *Enterobacter* sp. UOM-3 позволяют заключить, что бактериальный штамм способен к деструкции или трансформации этого соединения. Динамика содержания 2,4-Д в средах с «Октапоном экстра» и «Флораксом» отражена на рисунках 2а и 3а и имела общие характерные черты. В первые 24 часа культивирования бактерий не наблюдалось значительного разрушения 2,4-Д. По-видимому, активный рост численности бактерий в этот период стимулировался содержащимся в питательной среде пептоном (рис. 4). Период 24-48 часов культивирования характеризовался наиболее быстрым удалением 2,4-Д из КЖ, которое сопровождалось замедлением роста титра микроорганизмов в ней в связи с тем, что 2,4-Д представляет собой более сложный для потребления питательный субстрат. В дальнейшем деструкция гербицидов проходила менее активно, возможно из-за накопления продуктов преобразования 2,4-Д. В варианте опыта с «Октапоном экстра» к четвертым суткам количество 2,4-Д в КЖ упало на 79%, а в варианте с «Флораксом» - на 68%, что сопоставимо со степенью деградации 2,4-Д, зарегистрированной Сусой et al., [2011] за 8 суток культивирования бактерий-деструкторов. Содержащийся в препарате «Флоракс» дополнительный компонент мог оказывать негативное влияние на активность бактерий, что косвенно подтверждается более низкой скоростью их роста.

Рис. 1. Хроматограммы стандарта ИУК (а), 2,4-Д (б) и ультрафильтрата КЖ штамма *Enterobacter* sp. UOM-3 после 4-х сут культивирования (в).

В настоящее время синтез фитогормонов деструкторами гербицидов остается малоизученным, но перспективным с точки зрения регуляции роста растений явлением. Такая способность была описана [Ямборко и др., 2016] для деструкторов гексахлорциклогексана.

Индол-3-уксусная кислота (ИУК) - наиболее распространенный в природе ауксин. Ранее нами было показано, что процесс микробиологического синтеза ИУК может быть чувствителен к присутствию в среде углеводов [Bakaeva et al., 2020]. Shahid и Khan., [2017] установили, что глифосат может подавлять синтез ИУК у штаммов *Bradyrhizobium* и *Pseudomonas*. Однако данных о влиянии 2,4-Д на этот процесс нами обнаружено не было.

При культивировании исследуемого штамма на среде с «Октапоном» (Рис. 2б) в культуральной жидкости уже через сутки была обнаружена ИУК в концентрации 155 нг/мл. Максимальное её накопление было зафиксировано на третьи сутки эксперимента и составляло 485 нг/мл. В вариантах опыта с гербицидом «Флоракс» (Рис. 3б) количество ИУК в течение первых 24 часов также значительно возрастало (до 265 нг/мл), однако дальнейшего существенного накопления фитогормона не фиксировалось. Поскольку «Флоракс» является двухкомпонентным препаратом, можно предположить, что наблюдавшееся ингибирование синтеза ИУК вызвано накоплением в среде продуктов микробной трансформации второго действующего вещества препарата – флорасулама. Содержание в среде ИУК в варианте опыта без гербицидов линейно возрастало, достигая к четвертым суткам эксперимента концентрации 810 нг/мл. Подавление накопления ИУК в присутствии гербицидов можно объяснить как накоплением токсичных продуктов трансформации 2,4-Д, так и обратным разрушением ИУК клетками бактерий.

а

б

Рис. 2. Динамика убыли 2,4-Д (а) и продукции ИУК (б) при культивировании штамма *Enterobacter* sp. UOM-3 на среде с гербицидом «Октапон экстра»

а

б

Рис. 3. Динамика убыли 2,4-Д (а) и продукции ИУК (б) при культивировании штамма *Enterobacter* sp. UOM-3 на среде с гербицидом «Флоракс»

Рис. 4. Динамика роста штамма *Enterobacter* sp. UOM-3 при культивировании на среде с гербицидами «Октапон экстра» (1) и «Флоракс» (2).

Таким образом, бактериальный штамм *Enterobacter* sp. UOM-3 является активным деструктором 2,4-Д, а так же продуцентом ИУК и представляет интерес как перспективный компонент биопрепарата для удаления из почвы излишков 2,4-Д и стимуляции роста растений. Накопление ИУК ингибируется присутствием гербицидов «Октапон экстра» и «Флоракс» в высокой концентрации, однако по-прежнему остается значительным. Сравнение вариантов опыта с препаратами «Октапон экстра» и «Флоракс» показало, что препаративная форма гербицида может влиять на степень биодеструкции 2,4-Д и синтеза ИУК.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено в рамках Гос. задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А19-119021390081-1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Высоцкая Л.Б., Ахтямова З.А., Архипова Т.Н., Кузина Е.В., Рафикова Г.Ф., Феоктистова А.В., Тимергалина Л.Н., Четверикова Д.В., Бакаева М.Д. Влияние ассоциации растений ячменя с бактериями-деструкторами нефти на содержание гормонов и рост растений ячменя на фоне нефтяного загрязнения // Экобиотех. 2020. Т. 3 (1). С. 51–58. DOI: 10.31163/2618-964X2020-3-1-51-58
2. Четвериков С.П., Бакаева М.Д., Коршунова Т.Ю., Кузина Е.В., Рафикова Г.Ф., Четверикова Д.В., Высоцкая Л.Б., Логинов О.Н. Новый штамм *Enterobacter* sp. UOM 3 – деструктор нефти и продуцент индолилуксусной кислоты // Естественные и технические науки. 2019. № 7 (133). С. 37–40. DOI: 10.25633/ETN.2019.07.13
3. Ямборко Н.А., Леонова Н.О., Иутинская Г.А. Синтез фитогормонов почвенными микроорганизмами – деструкторами хлорорганических соединений // Мікробіологія і біотехнологія. 2016. № 4 (36). С. 96–107. DOI: 10.18524/2307-4663.2016.4(36).86777
4. Bakaeva M., Kuzina E., Vysotskaya L., Kudoyarova G., Arkhipova T., Rafikova G., Chetverikov S., Korshunova T., Chetverikova D., Loginov O. Capacity of *Pseudomonas* strains to degrade hydrocarbons, produce auxins and maintain plant growth under normal conditions and in the presence of petroleum contaminants // Plants. 2020. V. 9 (3). Article 379. DOI: 10.3390/plants9030379
5. Cycoń M., Żmijowska A., Piotrowska-Seget Z. Biodegradation kinetics of 2,4-D by bacterial strains isolated from soil // Cent. Eur. J. Biol. 2011. V. 6 (2). P. 188–198. DOI: 10.2478/s11535-011-0005-0

6. Gaultier J., Farenhorst A., Cathcart J., Goddard T. Degradation of [carboxyl-14C] 2,4-D and [ring-U-14C] 2,4-D in 114 agricultural soils as affected by soil organic carbon content // Soil Biol. Biochem. 2008. V. 40. P. 217–227. DOI: [10.1016/j.soilbio.2007.08.003](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.08.003)
7. Germaine K.J., Liu X., Cabellos G.C., Hogan J.P., Ryan D., Dowling D.N. Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid // FEMS Microbiol. Ecol. 2006. V. 57 (2). P. 302–310. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2006.00121.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00121.x)
8. Kearns J.P., Wellborn L.S., Summers R.S., Knappe D.R.U. 2,4-D adsorption to biochars: Effect of preparation conditions on equilibrium adsorption capacity and comparison with commercial activated carbon literature data // Water Research. 2014. V. 62. P. 20–28. DOI: [10.1016/j.watres.2014.05.023](https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.023)
9. Nayak S.K., Dash B., Baliyarsingh B. Microbial Remediation of Persistent Agro-chemicals by Soil Bacteria: An Overview. In: Microbial Biotechnology. Ed. by J. Patra, G. Das, H.S. Shin. Springer, Singapore. 2018. P. 275–301. DOI: [10.1007/978-981-10-7140-9_13](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7140-9_13)
10. Ordaz-Guillén Y., Galíndez-Mayer C.J., Ruiz-Ordaz N., Juárez-Ramírez C., Santoyo-Tepole F., Ramos-Monroy O. Evaluating the degradation of the herbicides picloram and 2,4-D in a compartmentalized reactive biobarrier with internal liquid recirculation // Environ. Sci. Pollut. Res. 2014. V. 21. P. 8765–8773. DOI: [10.1007/s11356-014-2809-8](https://doi.org/10.1007/s11356-014-2809-8)
11. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // Develop. Industr. Microbiol. 1961. V. 2. P. 23–32. DOI: [10.1038/sj.jim.2900633](https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900633)
12. Rodea-Palomares I., Makowski M., Gonzalo S., González-Pleiter M., Leganés F., Fernández-Piñas F. Effect of PFOA/PFOS pre-exposure on the toxicity of the herbicides 2,4-D, Atrazine, Diuron and Paraquat to a model aquatic photosynthetic microorganism // Chemosphere. 2015. V. 139. P. 65–72. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2015.05.078](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.078)
13. Schütte G., Eckerstorfer M., Rastelli V., Reichenbecher W., Restrepo-Vassalli S., Ruohonen-Lehto M., Saucy A.-G.W., Mertens M. Herbicide resistance and biodiversity: agronomic and environmental aspects of genetically modified herbicideresistant plants // Environ. Sci. Eur. 2017. V. 29. Article 5. DOI: [10.1186/s12302-016-0100-y](https://doi.org/10.1186/s12302-016-0100-y)
14. Shahid M., Khan M.S. Assessment of Glyphosate and Quizalofop Mediated Toxicity to Greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek], Stress Abatement and Growth Promotion by Herbicide Tolerant Bradyrhizobium and Pseudomonas species // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2017. V. 6 (12). P. 3001–3016. DOI: [10.20546/ijcmas.2017.612.351](https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.612.351)
15. Shareef K., Shaw G. Sorption kinetics of 2,4-D and carbaryl in selected agricultural soils of northern Iraq: Application of a dual-rate model // Chemosphere. 2008. V. 72 (1). P. 8–15. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2008.02.056](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.02.056)
16. Yang Z., Xu X., Dai M., Wang L., Shi X., Guo R. Combination of bioaugmentation and biostimulation for remediation of paddy soil contaminated with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid // J. Hazardous Materials. 2018. V. 353 (5). P. 490–495. DOI: [10.1016/j.jhazmat.2018.04.052](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.04.052)