

## ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ МИКРОБИОТЫ ТЕХНОГЕННОЙ ЭКОСИСТЕМЫ СЕВЕРНОГО ПРОМУЗЛА РБ: БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ ФЕНОЛА И 2,4-ДИХЛОРФЕНОЛА

© 2011 г. Е.Ю. Журенко, В.В. Коробов, Н.В. Жарикова, Т.Р. Ясаков, Л.Г. Анисимова, Т.В. Маркушева

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 15.05.2011

Выделены новые деструкторы фенола и 2,4-дихлорфенола, классифицированные как представители родов *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Agromyces*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Brenneria*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Gluconobacter*, *Pantoea*, *Raoultella* и *Rhodococcus*. Полученные данные расширяют существующие представления о разнообразии деструкторов ароматического ряда современных техногенных экосистем.

**Ключевые слова:** фенол, 2,4-дихлорфенол, бактерии-деструкторы.

Фенол и его хлорированные производные составляют значительную часть поллютантов, поступающих в окружающую среду со стоками и отходами предприятий нефтехимического производства. Известно, что в окружающей среде молекулы загрязнителей подвергаются воздействию микробных консорциумов. В настоящее время изучение структуры микробиоты техногенных сообществ, особенно той ее части, которая обладает способностью к ассимиляции экотоксикантов, привлекает все большее внимание в связи с тем, что понимание особенностей ее строения и функционирования становится необходимым условием для реализации процессов эффективной ремедиации нарушенных экотопов.

Цель данной работы – выявить бактерии-деструкторы фенола и 2,4-дихлорфенола, входящие в состав микробиоты, подвергавшейся долговременному воздействию факторов нефтехимического производства.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись образцы смешанных популяций микроорганизмов почвы Северного промузла Республики Башкортостан. Отбор проб почвы и выделение культур деструкторов производили согласно стандартным методикам с небольшими модификациями [16]. Для выявления спорообразующих форм микроорганизмов применяли смешанный агар (МПА+сусло в соотношении 1:1). Почвенную суспензию пастеризовали перед посевом при +70°C в течение 15 мин. Идентификацию штаммов осуществляли согласно принципам фенотипической и физиолого-биохимической дифференциации бактерий [13].

Культивирование бактерий проводили в термостатированных условиях при +30°C. Рост контролировали по изменению плотности клеточной суспензии (OD<sub>590</sub>). Определение количества фенола и 2,4-дихлорфенола (2,4-ДХФ) в культуральной жидкости проводили согласно стандартного фотометрического метода [10].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По положительным оценкам роста в селективных условиях были выявлены изоляты, обладавшие способностью использовать фенол и 2,4-ДХФ в качестве источника углерода и энергии.

Штаммы деструкторы фенола и 2,4-ДХФ были классифицированы следующим образом: *Achromobacter xyloxidans* 33P, *Agrobacterium tumefaciens* 21SG, *Agromyces* sp. 34DCP, *Azospirillum irakense* 38D, *Bacillus cereus* 33T, *Bacillus subtilis* 16, *Brenneria salcis* 38P, *Citrobacter* sp. 36 4CPA, *Enterobacter cloacae* 34 4CPA, *Gluconobacter oxydans* 2T, *Pantoea agglomerans* 36P, *Raoultella planticola* 33 4CPA и *Rhodococcus rubropertinctus* 5D.

Результаты определения филогенетического положения вновь выделенных культур показали, что в составе микробиоты техногенной экосистемы присутствовали деструкторы фенола и его хлорированных производных, входящие в таксономические кластеры нескольких родов протеобактерий, а именно: *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Agromyces*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Brenneria*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Gluconobacter*, *Pantoea*, *Raoultella* и *Rhodococcus*.

В ходе сравнительного анализа процессов утилизации фенола и 2,4-ДХФ в модельных системах было показано, что исследуемые штаммы обнаруживают различный уровень деградации субстратов.

Из данных, приведенных в таблице 1, видно, что фенол способны метаболизировать все культуры. Штаммы *Azospirillum irakense* 38D и *Bacillus cereus* 33T существенно снижали количество фенола в периодической культуре.

Ассимиляцию 2,4-ДХФ лучше всего проводили культуры *Agromyces* sp. 34DCP, *Bacillus subtilis* 16

Журенко Евгения Юрьевна, канд. биол. наук, e-mail: tvmark@anrb.ru; Коробов Владислав Викторович, канд. биол. наук, e-mail: tvmark@anrb.ru; Жарикова Наталья Владимировна, канд. биол. наук, e-mail: tvmark@anrb.ru; Ясаков Тимур Рамилевич, канд. биол. наук, e-mail: yasakovt@gmail.com; Анисимова Лилия Георгиевна, e-mail: anisimovalilya@gmail.com; Маркушева Татьяна Вячеславовна, канд. биол. наук, e-mail: tvmark@anrb.ru

и *Raoultella planticola* 33 4CPA. Конверсия 2,4-ДХФ не обнаружена для *Achromobacter xyloxidans* 33P, *Agrobacterium tumefaciens* 21SG, *Bacillus cereus* 33T, *Brenneria salcis* 38P, *Gluconobacter oxydans* 2T и *Rhodococcus rubroperinctus* 5D.

Следует отметить, что полученные данные хорошо согласуются со сведениями о том, что для

микроорганизмов аэробная деградация хлорированных ароматических соединений является более сложной задачей, чем конверсия их незамещенных аналогов, вследствие того, что, помимо энзиматического расщепления ароматического кольца, добавляется еще необходимая стадия удаления из молекулы субстрата атома хлора.

**Таблица 1.** Остаточное содержание фенола и 2,4-дихлорфенола в среде культивирования

ШТАММ	ОСТАТОЧНОЕ КОЛИЧЕСТВО СУБСТРАТОВ, %	
	Фенол	2,4-ДХФ
<i>Achromobacter xyloxidans</i> 33P	80,3	100
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 21SG	21,8	100
<i>Agromyces</i> sp. 34DCP	26,4	27,0
<i>Azospirillum irakense</i> 38D	2,1	56,0
<i>Bacillus cereus</i> 33T	1,1	100
<i>Bacillus subtilis</i> 16	67,1	30,2
<i>Brenneria salcis</i> 38P	90,3	100
<i>Citrobacter</i> sp. 36 4CPA	84,2	46,4
<i>Enterobacter cloacae</i> 34 4CPA	85,4	41,2
<i>Gluconobacter oxydans</i> 2T	79,3	100
<i>Pantoea agglomerans</i> 36P	74,1	31,9
<i>Raoultella planticola</i> 33 4CPA	48,4	27,3
<i>Rhodococcus rubroperinctus</i> 5D	85,1	100

Следует отметить, что ранее среди деструкторов были описаны представители бактерий различных родов. Больше всего было обнаружено псевдомонад [3, 4, 12].

Отмечено, что родококки также активно осуществляли деградацию фенола [8, 14, 15].

Внутри представителей родов *Achromobacter* [7], *Acinetobacter* [1], *Arthrobacter* [2, 15], *Ralstonia* [6] и *Bacillus* было выделено несколько штаммов, способных осуществлять утилизацию фенола [6, 11].

Установлено, что 2,4-дихлорфенол катаболизируют представители родов *Achromobacter* [7] и *Pseudomonas* [9].

Принимая во внимание, что ранее среди бактерий, способных вовлекать в обмен веществ и энергии фенол и 2,4-ДХФ, не обнаруживались представители родов *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Agromyces*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Brenneria*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Gluconobacter*, *Pantoea*, *Raoultella* и *Rhodococcus*, следует сделать вывод о том, что присутствие в структуре техногенного сообщества в качестве деструкторов фенола и 2,4-ДХФ микроорганизмов указанных таксономических групп выявлено впервые.

Полученные в данной работе данные существенно расширяют представления о биоразнообразии штаммов-деструкторов фенола и 2,4-ДХФ промышленных экосистем.

Работа выполнена при поддержке гранта Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика гено-

фондов» и программы «Участник молодежного научно-инновационного конкурса».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beadle C.A., Smith A.R.W. The purification and properties of 2,4-dichlorophenol hydroxylase from a strain of *Acinetobacter* species // Eur. J. Biochem. 1982. Vol.123. P.323–332.
2. Karigar Ch., Mahesh A., Nagenahali M., Yun D.J. Phenol degradation by immobilized cell of *Arthrobacter citreus* // Biodegradation. 2006. Vol.17. P.47–55.
3. Kotresha D., Vidyasagar G.M. Isolation and characterisation of phenol-degrading *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 4996 // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2008. Vol. 24, № 4. P. 541–547.
4. Lang E. Diversity of bacterial capabilities in utilizing alkylated benzenes and other aromatic compounds // Lett. Appl. Microbiol. 1996. Vol.23, №4. P.257–260.
5. Laxmi M.V., Reddy K.S., Himabindu, V., Vutukuru, S.S., Anjaneyulu, Y. Phenol degradation by pure and mixed cultures of *Arthrobacter*, *Mycobacterium* and *Psuedomonas* in flask cultures and spiked soil samples // Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences. 2007. Vol. 9, № 3. P. 607–613.
6. Li S., Chen Z., Qiu L., Wu J., Lai Z. Isolation and identification of *Bacillus cereus* strain Jp-A and its capability in phenol degradation // Chinese Journal of Applied Ecology. 2006. V. 17, № 5. P. 920–924.
7. Quan X., Shia H., Zhang Y., Wang J., Qiana Y. Biodegradation of 2,4-dichlorophenol and phenol in an airlift inner-loop bioreactor immobilized with *Achromobacter* sp. // Separation and Purification Technology. 2004. Vol.34, №1–3. P. 97–103.
8. Rehffuss M., Urban J. *Rhodococcus phenolicus* sp. nov., a novel isolated actinomycete with the ability to degrade chlorobenzene, di-chlorobenzene and phenol as sole carbon sources // Systematic and Applied Microbiology. 2005. Vol. 28. P. 695–701.

9. *Ziagova M., Liakopoulou-Kyriakides, M.* Kinetics of 2,4-dichlorophenol and 4-Cl-m-cresol degradation by *Pseudomonas* sp. cultures in the presence of glucose // *Chemosphere*. 2007. Vol. 68. № 5. P. 921–927.
10. *Губен-Вейль И.* Методы органической химии. М.: Госхимиздат, 1963. 1032 с.
11. *Козловский С.А., Наумов А.В., Цой Т.В.* Выделение и характеристика штаммов микроорганизмов, утилизирующих фенол // *Химия и технология воды*. 1993. Т.15, №5. С.383–389.
12. *Кулакова А.Н., Кулаков Л.А., Наумов А.В., Мальцева О.В., Головлева Л.А., Боронин А.М.* Клонирование генов деградации фенола из штамма *Pseudomonas* sp.5-T // *Генетика*. 1992. Т.28, №2. С.35–42.
13. *Определитель бактерий Берджи* / Под ред. Хоулта Дж. и др. 9-е изд. М.: Мир, 1997. 799 с.
14. *Плотникова Е.Г., Рыбкина Д.О., Ананьина Л.Н., Ястребова О.В., Демаков В.А.* Характеристика микроорганизмов, выделенных из техногенных почв Прикамья // *Экология*. 2006. № 4. С. 261–268.
15. *Соляникова И.П., Головлев Е.Л., Лисняк О.В., Головлева Л.А.* Выделение и характеристика пирокатехаз из штаммов *Rhodococcus rhodnii* 135 и *Rhodococcus rhodochrous* 89: сравнение с аналогичными ферментами обычного и модифицированного орто-пути // *Биохимия*. 1999. Т. 64. С. 982–989.
16. *Теплер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И.* Практикум по микробиологии. М.: МГУ. 1976. 307 с.

## STRUCTURE OF MIKROBIAL COMMUNITIES OF RB INDUSTRIAL ECOSYSTEM: PHENOL AND 2,4-DICHLOROPHENOL BACTERIA-DESTRUCTORS

© 2011 E.Yu. Zhurenko, V.V. Korobov, N.V. Zharikova, T.R. Yasakov,  
L.G. Anisimova, T.V. Markusheva

Institute of Biology, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

New destructors of the phenols and 2,4-dichlorophenol, classified as representatives of *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Agromyces*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Brenneria*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Gluconobacter*, *Pantoea*, *Raoultella* and *Rhodococcus* genera have been isolated. The results of this investigation increase the existing data about aromatic-degrading bacterial biodiversity of the modern industrial ecosystems.

**Key-words:** phenol, 2,4-dichlorophenol, bacteria-destructors.

---

*Zhurenko Eugene Yur'evna*, Candidate of Biology, e-mail: tvmark@anrb.ru; *Korobov Vladislav Viktorovich*, Candidate of Biology, e-mail: tvmark@anrb.ru; *Zharikova Natalia Vladimirovna*, Candidate of Biology, e-mail: tvmark@anrb.ru; *Yasakov Timur Ramilevich*, Candidate of Biology, e-mail: yasakovt@gmail.com; *Anisimova Lilya Georgievna*, e-mail: anisimovalilya@gmail.com; tvmark@anrb.ru; *Markusheva Tatiana Vyacheslavovna*, Candidate of Biology, e-mail: tvmark@anrb.ru