

ШТАММЫ-ДЕСТРУКТОРЫ ХЛОРФЕНОКСИКИСЛОТ ГАММА – ПОДКЛАССА ПРОТЕОБАКТЕРИЙ

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

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 27.08.2011

В работе описываются новые штаммы -деструкторы хлорфеноксикислот, относящиеся к гамма-подклассу протеобактерий родов *Agrobacterium*, *Brenneria*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas*.

Ключевые слова: бактерии-деструкторы, хлорфеноксиуксусные кислоты

Известно, что прокариоты играют существенную роль в ассимиляции синтетических органических соединений.

Вместе с тем, обнаруживается недостаточное понимание участия представителей отдельных филогенетических групп бактерий в процессах конверсии стойких токсичных производных ароматического ряда.

Указанное обстоятельство является сдерживающим фактором развития выгодных технологий рационального использования природных ресурсов.

Целью настоящей работы являлось выявление роли представителей гамма – подкласса протеобактерий в конверсии хлорфеноксикислот.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись культуры бактерий, выделенные из образцов микробных популяций почвенной биоты Северного промузла города Уфы.

Чистые культуры выделяли по методу Коха с небольшими модификациями [2, 4]. При идентификации изолятов использовали 9-е издание руководства «Определитель бактерий Берджи» [3], а также применяли методы молекулярного типирования по последовательности 16S рРНК. Визуализацию микробных клеток осуществляли путем атомно-силовой микроскопии на сканирующем зондовом микроскопе Solver PRO-M фирмы NT-MDT (Россия).

Рост культур производили в термостатированных установках УВМТ-12-250 при 115-120 об/мин. Анализ содержания хлорфеноксикислот в культуральной жидкости проводили согласно руководству «Методы определения микроколичеств пестицидов» [1].

Маркушева Татьяна Вячеславовна, канд. биол. наук, e-mail: tvmark@anrb.ru., Журенко Евгения Юрьевна, канд. биол. наук, e-mail: tvmark@anrb.ru; Жарикова Наталья Владимировна, канд. биол. наук, e-mail: tvmark@anrb.ru; Коробов Владислав Викторович, 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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С применением селективных сред из образцов смешанных популяций почвенных микроорганизмов, подвергавшихся длительному воздействию факторов нефтехимического производства были выделены культуры деструкторов хлорфеноксикислот, включая, 4-хлорфеноксиуксусную (4-ХФУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусную (2,4-Д) и 2,4,5-трихлорфеноксиуксусную (2,4,5-Т) кислоты.

Изоляты были идентифицированы согласно совокупности морфометрических, культурально-морфологических, физиолого-биохимических признаков, а также в соответствии с принципами молекулярного типирования по последовательности генов 16S рРНК как штаммы *Agrobacterium tumefaciens* 21SG, *Brenneria salcis* 38P, *Citrobacter* sp. 36 4CPA, *Enterobacter asburia* 33D, *Pantoea agglomerans* 36P, *Pseudomonas fluorescens* 39D, *Raoultella planticola* 33 4CPA, *Stenotrophomonas* sp. 33T и *Xanthomonas* sp. 33DCP.

Результаты таксономического определения вновь выделенных культур позволили увидеть, что в составе биоты техногенной экосистемы присутствовали деструкторы нескольких филогенетических групп протеобактерий, а именно, бактерий родов: *Agrobacterium*, *Brenneria*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas*.

В модельной системе проведен анализ деградации хлорфеноксикислот в условиях использования ксенобиотиков в качестве источников углерода и энергии (табл. 1).

Из данных таблицы 1 видно, что штаммы имеют различия в уровнях утилизации 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т. Существенное снижение 4-ХФУК – до 90%, наблюдалось для культуры *P. agglomerans* 36P.

Меньший уровень использования данного субстрата был обнаружен для *Xanthomonas* sp. 33DCP (примерно 78%) и *P. fluorescens* 39D (81%).

Штаммы *P. fluorescens* 39D и *Stenotrophomonas* sp. 33T утилизировали 82% – 88% 2,4-Д от начальной концентрации.

Наиболее активной по отношению к 2,4,5-Т являлась культура *A. tumefaciens* 21SG, утилизировавшая 82% субстрата. Высокий уровень конверсии 2,4,5-Т также показал *Citrobacter* sp. 36 4CPA (около 76%).

Таблица 1. Остаточное содержание субстратов в среде культивирования периодических культур вновь выделенных штаммов-деструкторов

ШТАММ	ОСТАТОЧНОЕ СОДЕРЖАНИЕ СУБСТРАТОВ, %		
	4-ХФУК	2,4-Д	2,4,5-Т
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 21SG	37,6	34,1	18,0
<i>Brenneria salcis</i> 38P	53,3	62,7	–
<i>Citrobacter</i> sp. 36 4CPA	26,9	34,0	24,2
<i>Enterobacter asburia</i> 33D	38,2	30,3	37,0
<i>Pantoea agglomerans</i> 36P	10,1	62,0	26,6
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 39D	19,0	18,4	34,6
<i>Raoultella planticola</i> 33 4CPA	77,0	62,7	50,9
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 33T	58,1	16,3	27,0
<i>Xanthomonas</i> sp. 33DCP	21,4	40,1	35,3

Следует отметить, что ранее в исследованиях ряда авторов были описаны представители родов *Citrobacter* [8, 9] и *Pseudomonas* [5-7, 10], способные к деградации хлорированных производных феноксиуксусной кислоты.

Принимая во внимание то, что среди деструкторов не были описаны представители родов *Agrobacterium*, *Brenneria*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Raoultella*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas*, следует сделать вывод о том, что на примере вновь выделенных культур были впервые обнаружены способности микроорганизмов указанных таксонов гамма-подкласса протеобактерий вовлекать хлорфеноксиуксусной кислоты в обмен веществ и энергии.

Работа выполнена при поддержке гранта Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методы определения микроколичеств пестицидов / под ред. Клисенко М.А. М.: Медицина, 1984. 256 с.
2. Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. проф. Звягинцева Д.Г. М.: МГУ, 1980. 224 с.
3. Определитель бактерий Берджи / под ред. Хоулта Дж. и др. 9-е изд. М.: Мир, 1997. 799 с.
4. Практикум по микробиологии. М.: МГУ, 1976. 307 с.
5. Bhat M.A., Tsuda M., Horiike K., Nozaki M., Vaidyanathan C.S., Nakazawa T. Identification and characterization of a new plasmid carrying genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate from *Pseudomonas cepacia* CSV90 // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. №1. P. 307-312.
6. Friedrich B., Meyer M., Schlegel H.G. Transfer and expression of the herbicide-degrading plasmid pJP4 in aerobic autotrophic bacteria // Arch. Microbiol. 1983. V. 134. P. 92-97.
7. Herrmann H., Muller C., Schmidt I., Mahnke J., Petruchka L., Hahnke K. Localization and organization of phenol degradation genes of *Pseudomonas putida* strain H // Mol. Gen. Genet. 1995. V. 247. № 2. P. 240-246.
8. Martinez M., Baeza J., Freer J., Rodriguez J. Chlorophenol tolerant and degradative bacteria isolated from a river receiving pulp mill discharges // Toxicological and Environmental Chemistry. 2000. V. 77. P. 159-170.
9. Narde K., Kapley A., Purohit J. Isolation and characterization of *Citrobacter* strain HPC255 for broad-range substrate specificity for chlorophenols // Current Microbiology. 2004. V. 48. P. 419-423.
10. Radjendirane V., Bhat M.A., Vaidyanathan C.S. Affinity purification and characterization of 2,4-dichlorophenol hydroxylase from *Pseudomonas cepacia* // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1991. V. 288, №1. P.169-176.

CHLOROPHENOXYACETIC ACIDS BACTERIA-DESTRUCTORS OF PROTEOBACTERIA GAMMA - SUBCLASS

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

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

New chlorophenoxyacetic acids bacteria - destructors of *Agrobacterium*, *Brenneria*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Stenotrophomonas* and *Xanthomonas* genera of *Proteobacteria* gamma-subclass have been investigated in this work.

Key words: bacteria-destructors, chlorophenoxyacetic acid.

Markusheva Tatiana Vyacheslavovna, Candidate of Biology, e-mail: tvmark@anrb.ru.; Zhurenko Eugene Yur'evna, Candidate of Biology, e-mail: tvmark@anrb.ru; Zharikova Natalia Vladimirovna, Candidate of Biology, e-mail: tvmark@anrb.ru; Korobov Vladislav Viktorovich, 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