

## НОВЫЙ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ШТАММ-ДЕСТРУКТОР 2,4,5-ТРИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

©2011 Т.Р. Ясаков<sup>1</sup>, Е.Е. Куликов<sup>2</sup>, А.В. Летаров<sup>2</sup>, Е.Ю. Журенко<sup>1</sup>, В.В. Коробов<sup>1</sup>,  
Н.В. Жарикова<sup>1</sup>, Л.Г. Анисимова<sup>1</sup>, Р.Р. Гарафутдинов<sup>3</sup>, Т.В. Маркушева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

<sup>2</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, г. Москва

<sup>3</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 19.08.2011

В статье приведены культурально-морфологические и физиолого-биохимические характеристики нового бактериального штамма-деструктора 2,4,5-Т рода *Pseudomonas*, выделенного из смешанных популяций почвенных микроорганизмов, подвергавшихся воздействию факторов нефтехимического производства.

**Ключевые слова:** 2,4,5-Т, штаммы-деструкторы, *Pseudomonas* sp. 34Т.

Известно, что представители рода *Pseudomonas* имеют широкое распространение в биосфере, включая почвенный покров и воду. Псевдомонады обладают удивительной жизнеспособностью, имеются указания на то, что бактерии рода *Pseudomonas* способны участвовать в конверсии синтетических соединений. Так в литературе описан ряд штаммов рода *Pseudomonas*, осуществляющих утилизацию бифенилов и их хлорированных производных [9]. Среди представителей рода *Pseudomonas* обнаружены штаммы, способные осуществлять деструкцию летучих органических соединений [2], ПАУ [5-7], ДДТ [1, 3, 8]. Вместе с тем, имеется мало данных об участии псевдомонад в деградации молекул пестицидов, и, в частности, 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты, обладающей высокотоксичными и канцерогенными свойствами. Отсутствие сведений об особенностях процессов конверсии галогенсодержащих ксенобиотиков ароматического ряда во многом ограничивает возможности использования псевдомонад в качестве действующих элементов технологий защиты окружающей среды.

Цель настоящей работы – выявить культурально-морфологические и физиолого-биохимические характеристики штамма-деструктора 2,4,5-Т рода *Pseudomonas*.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлся природный изолят 34Т, выделенный из образца почвенных по-

---

Ясаков Тимур Рамилевич, канд. биол. наук, e-mail: yasakovt@gmail.com; Куликов Евгений Евгеньевич, канд. биол. наук, e-mail: eumenius@gmail.com; Летаров Андрей Викторович, канд. биол. наук, e-mail: letarov@gmail.com; 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; Анисимова Лилия Георгиевна, e-mail: anisimovalilya@gmail.com; Гарафутдинов Равиль Ринатович, канд. биол. наук, e-mail: rhmab@mail.ru; Маркушева Татьяна Вячеславовна, канд. биол. наук, e-mail: tvmark@anrb.ru.

пуляций микроорганизмов Северного промышленного узла г. Уфы.

Определение морфометрических характеристик клеток осуществляли с помощью электронной атомно-силовой микроскопии на сканирующем зондовом микроскопе Solver PRO-M фирмы NT-MDT (Россия).

Сканирование вели в контактном режиме по методу постоянной силы с использованием кантиллеров CSG01 фирмы NT-MDT с радиусом кривизны зонда 10 нм.

Фотографические изображения колоний были получены в режимах макросъемки в проходящем и отраженном свете.

Классификацию культуры проводили согласно принципам фенотипической дифференциации бактерий 9-го издания руководства «Определитель бактерий Берджи» (1997).

Секвенирование ПЦР-продуктов последовательности гена 16S рРНК производили на автоматическом секвенирующем устройстве Avant 3150 (Applied Biosystems, США) со стандартным набором реактивов в прямом и обратном направлениях согласно рекомендациям производителя.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение индивидуальных морфологических и морфометрических характеристик клеток, а также исследование структуры их популяции показало, что культура 34Т была представлена клетками палочковидной формы (рис. 1 В и С).

На мясопептонном агаре культура образовывала блестящие, гладкие колонии белого цвета с неровным краем и слизистой консистенцией (рис. 1 А). На рисунке 1 (В и С) клетки штамма 34Т видны в скоплении. Размер клеток составляет 1,0-2,0 x 0,3-0,5 мкм. Из рис. 1В видно, что клетки обладают жгутиками. Окраска клеток по Граму отрицательная.

Для культуры был характерен аэробный рост. Оптимальный диапазон температуры варьировал от +22°C до +41°C. При +4°C, а также в интервале

температур от +45°C до +50°C, рост практически отсутствовал. При pH 5,7 наблюдался умеренный рост, а оптимум значений pH для роста составлял 6,8-7,0.

Филогенетическое положение штамма определялось на основе анализа последовательности гена

16S рРНК. Согласно результатам сравнения, осуществленного в формате программы MEGA4, было сделано заключение о том, что штамм принадлежит к филогенетически гетерогенному роду *Pseudomonas* (рис. 2).

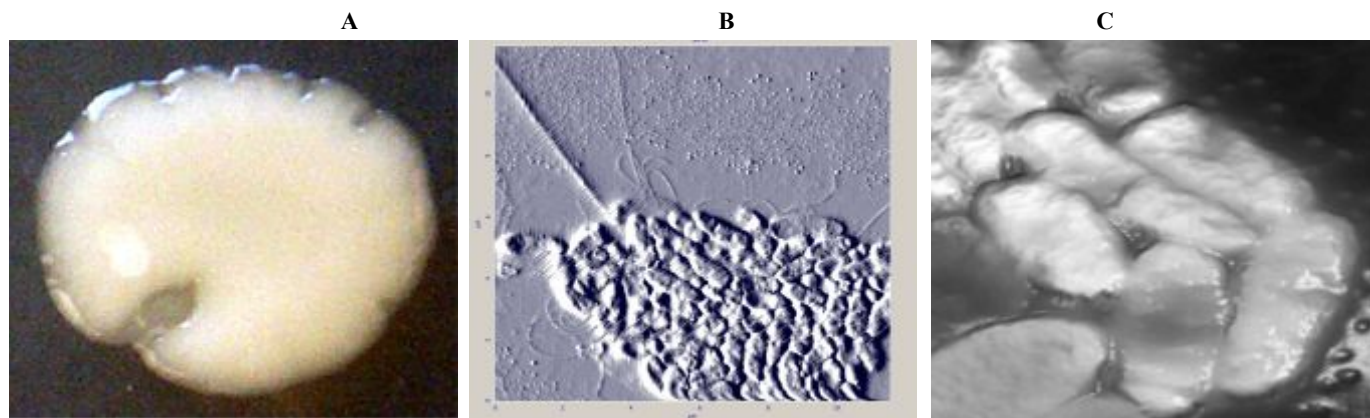


Рис. 1. Вид отдельной колонии бактериальной культуры 34Т на поверхности агаризированной среды (МПА) (А); АСМ-изображения клеток штамма 34Т (фрейм 10.5×10.5 мкм) (В, С).

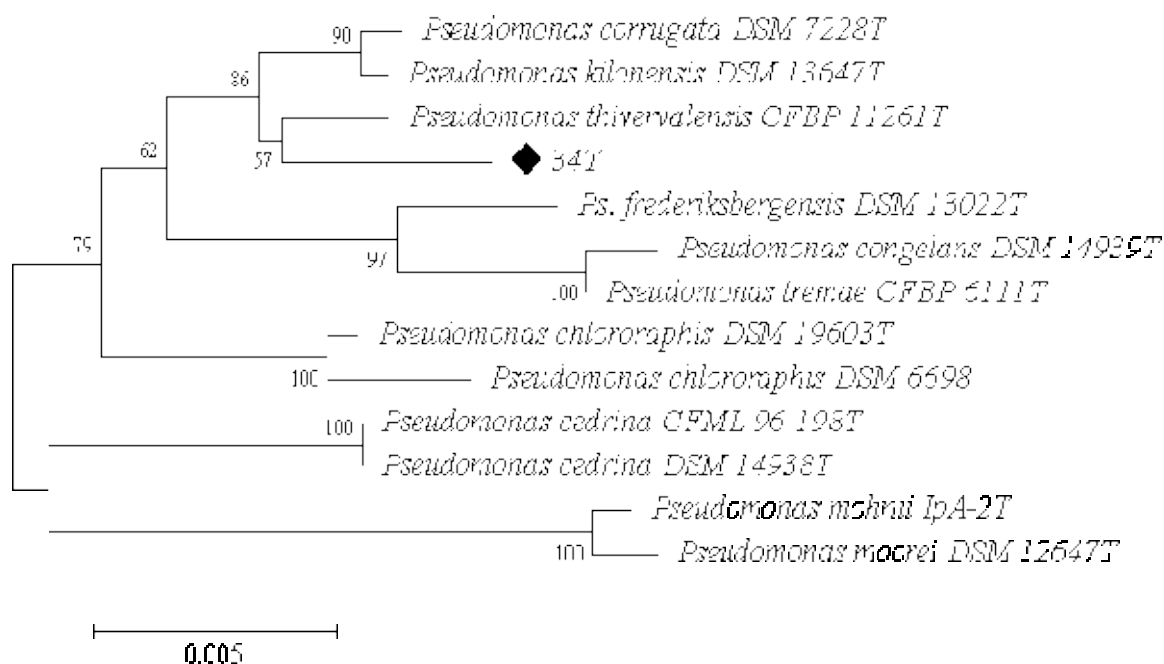


Рис. 2. Филогенетическое положение штамма 34Т согласно результатам сравнительного анализа последовательности гена 16S рРНК.

Прим. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью "bootstrap" – анализа (значимыми признаются величины показателя "bootstrap" более 50).

Последовательность гена 16S рРНК штамма 34Т образовывала кластер с тремя представителями рода *Pseudomonas*. Уровень гомологии генов 16S рРНК штамма 34Т и близких ему видов составлял около 99%. Наиболее близкими типовыми видами являлись *Pseudomonas thivervalensis* CFBP 11261Т (99,2%), *Pseudomonas corrugata* DSM 7228Т (99%) и *Pseudomonas kilonensis* DSM 13647Т (99%). Принимая во внимание то, что последовательности ге-

на 16S рРНК этих штаммов имели гомологию равную или превышающую 99%, было сделано заключение о том, что точное видовое типирование оказывается затруднительным вследствие одинаково высокой взаимной гомологии последовательностей 16S рРНК штаммов *Pseudomonas thivervalensis* CFBP 11261Т, *Pseudomonas corrugata* DSM 7228Т и *Pseudomonas kilonensis* DSM 13647Т. Согласно по-

лученным данным изучаемый изолят был классифицирован как штамм *Pseudomonas* sp. 34Т. Проведено исследование динамики накопления биомассы *Pseudomonas* sp. 34Т в условиях исполь-

зования 2,4,5-Т в качестве единственного источника углерода и энергии в периодической культуре (рис. 3).



**Рис. 3.** Динамика накопления биомассы и утилизации молекул 2,4,5-Т штаммом *Pseudomonas* sp. 34Т в периодической культуре.

Прим.: -■- —концентрация 2,4,5-Т, -х- — оптическая плотность.

Из рис. 4 видно, что фаза логарифмического роста культуры *Pseudomonas* sp. 34Т занимала около трех суток. Об этом свидетельствует возрастающий показатель значения оптической плотности, достигший 0,77 ОЕ. В это же время происходил активный процесс деструкции 2,4,5-Т: штамм утилизировал более 37,8% субстрата. Далее, почти на протяжении 3 суток, следовала фаза стационарного роста. Деградация 2,4,5-Т проходила постепенно в течение 9 суток, при этом было утилизировано 59,7% субстрата.

Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН «Поддержка молодых ученых», гранта «Биоразнообразию и динамика генофондов», гранта Роснауки «Поддержка сети ЦКП, мероприятие 5.2» и программы У.М.Н.И.К.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bhat M.A., Ishida T., Horiike K. et al. Purification of 3,5-dichlorocatechol 1,2-dioxygenase, a nonheme iron dioxygenase and a key enzyme in the biodegradation of a herbicide, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), from *Pseudomonas cepacia* CSV90 // Arch. Biochem. Biophys. 1993. V. 300 (2). P. 738-746.
2. Chen Y.M., Lin T.F., Huang C. et al. Degradation of phenol and TCE using suspended and chitosan-bead immobilized *Pseudomonas putida* // J. Hazard. Mater. 2007. V. 148 (3). P. 660-670.
3. Jacobsen C.S., Pedersen J.C. Mineralization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in soil inoculated with *Pseudomonas cepacia* DBO1(pRO101), *Alcaligenes eutrophus* AEO106(pRO101) and *Alcaligenes eutrophus* JMP134(pJP4): effects of inoculation level and substrate concentration // Biodegradation. 1992. V. 2 (4). P. 253-263.
4. Kielbane J.J., Chatterjee D.K., Chakrabarty A. Detoxication of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid from contaminated soil by *Pseudomonas cepacia* // Appl. Environ. Microbiology. 1983. V. 45. № 5. P. 1697-1700.

5. Li Q., Wang X., Yin G. et al. New metabolites in dibenzofuran cometabolic degradation by a biphenyl-cultivated *Pseudomonas putida* strain B6-2 // Environ. Sci. Technol. 2009. V. 43 (22). P. 8635-8642.
6. Pathak H., Kantharia D., Malpani A., Madamwar D. Naphthalene degradation by *Pseudomonas* sp. HOB1: in vitro studies and assessment of naphthalene degradation efficiency in simulated microcosms // J. Hazard. Mater. 2009. V. 166 (2-3). P. 1466-1473.
7. Puntus I.F., Filonov A.E., Akhmetov L.I. et al. Phenanthrene degradation by bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* in model soil systems // Mikrobiologiya. 2008. V. 77 (1). P. 11-20.
8. Santacruz G., Bandala E.R., Torres L.G. Chlorinated pesticides (2,4-D and DDT) biodegradation at high concentrations using immobilized *Pseudomonas fluorescens* // J. Environ. Sci. Health B. 2005. V. 40 (4). P. 571-583.
9. Sondossi M., Sylvestre M., Ahmad D. Effects of Chlorobenzoate Transformation on the *Pseudomonas testosteroni* Biphenyl and Chlorobiphenyl Degradation Pathway // Appl. Environ. Microbiology. 1992. V. 58. № 2. P. 485-495.

## NEW BACTERIAL STRAIN – DEGRADER OF 2,4,5-TRICHLOROPHENOXYACETIC ACID

© 2011 T.R. Yasakov<sup>1</sup>, E.E. Kulikov<sup>2</sup>, A.V. Letarov<sup>2</sup>, E.Yu. Zhurenko<sup>1</sup>, V.V. Korobov<sup>1</sup>, R.R. Garafutdinov<sup>3</sup>, N.V. Zharikova<sup>1</sup>, L.G. Anisimova<sup>1</sup>, T.V. Markusheva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biology, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

<sup>2</sup>Winogradsky Institute of Microbiology RAS, Moscow

<sup>3</sup>Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

In the present article cultural, morphological, physiological and biochemical properties of the new bacterial 2,4,5-T degrader of the *Pseudomonas* genera have been investigated. The strain was isolated from the samples of soil microorganisms which have been exposed by factors of the petrochemical industry.

**Key words:** 2,4,5-T, degrader, *Pseudomonas* sp. 34T.

---

Yasakov Timur Ramilevich, Candidate of Biology, e-mail: yasakovt@gmail.com; Kulikov Evgeny Evgen'evich, Candidate of Biology, e-mail: eumenius@gmail.com; Letarov Andrey Viktorovich, Candidate of Biology, e-mail: letarov@gmail.com; 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; Anisimova Lilya Georgievna, e-mail: anisimovalilya@gmail.com; Garafutdinov Ravil Rinatovich, Candidate of Biology, e-mail: tvmark@anrb.ru; Markusheva Tatiana Vyacheslavovna, Candidate of Biology, e-mail: tvmark@anrb.ru