

УДК: 579.841.15:579.222.3

AGROMYCES SP. IBRB-34DCP – НОВЫЙ ШТАММ-ДЕСТРУКТОР ФЕНОЛА И 2,4-ДИХЛОРФЕНОЛА

©2013 В.В. Коробов¹, Н.В. Жарикова¹, Л.Г. Анисимова⁴, Т.Р. Ясаков¹, И.В. Кусова²,
Е.Ю. Журенко¹, Е.Г. Галкин³, Т.В. Маркушева¹

¹Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

²Уфимский государственный авиационный технический университет, г. Уфа

³Институт органической химии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

⁴ООО «Живое земледелие», г. Краснодар

Поступила 13.06.2013

Из смешанного консорциума почвенных бактерий, подвергавшихся воздействию факторов химического производства Уфимского промышленного узла, выделен штамм *Agromyces* sp. IBRB-34DCP, способный утилизировать фенол и 2,4-дихлорфенол (2,4-ДХФ). В периодической культуре *Agromyces* sp. IBRB-34DCP количество фенола в культуральной среде снижалось на 74%, 2,4-ДХФ - на 73%.

Ключевые слова: деструкция, фенол, 2,4-дихлорфенол, *Agromyces* sp.

Среди многочисленной группы токсичных синтетических соединений, поступающих в окружающую среду со стоками и отходами, существенное место занимает фенол и его галогениды [1, 2].

Судьба загрязнителей ароматического ряда в окружающей среде в значительной степени зависит от метаболической активности микроорганизмов [3]. Показано, что почвобитающие микроорганизмы – главные агенты детоксикации и утилизации загрязнителей. Микроорганизмы способны минерализовать от 10 до 70% общего объема поступающих в окружающую среду ксенобиотиков путем включения их в нормальные биосферные метаболические циклы [4-6].

Цель настоящей работы – выявить характеристики нового природного штамма-деструктора фенола и 2,4-дихлорфенола *Agromyces* sp. IBRB-34DCP.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлся штамм *Agromyces* sp. IBRB-34DCP. Штамм был выделен из образца смешанных популяций микроорганизмов, подвергавшихся воздействию факторов нефтехимического производства.

Посевной материал бактерий получали выращиванием в разбавленном мясопептонном бульоне (1МПБ:7H₂O) при температуре +30°C. Далее культуру засеивали в количестве 0,01% от объема в жидкую минеральную среду следующего состава в г/л: NH₄Cl – 1; K₂HPO₄ – 5; MgSO₄·7H₂O – 0,05; FeSO₄·7H₂O – 0,005; CuSO₄·5H₂O – 0,001; ZnSO₄ – 0,008; pH – 6,8–7,0. В данную минеральную среду

объемом 100 мл в качестве единственного источника углерода и энергии вносили фенол и 2,4-ДХФ в концентрации 100 мг/л. Суспензии инкубировали в термостатированных орбитальных встряхивателях УВМТ-12-250 при 115-120 об/мин. Рост культур контролировали по значению оптической плотности клеточной массы при длине волны 590 нм на фотоколориметре КФК-2.

Определение количества фенолов в культуральной жидкости проводили согласно стандартного фотометрического метода [7]. Для анализов отбирали 5 мл культуральной жидкости, которую освобождали от клеток бактерий центрифугированием при 5 тыс. об./мин в течение 30 мин. Далее к пробе последовательно добавляли 30 мкл 2% раствора 4-аминоантипирина, 100 мкл 2 н раствора аммиака и 100 мкл 2% раствора калия железосинеродистого. Смесь перемешивали после добавления каждого компонента реакции и через 10 мин измеряли коэффициент пропускания на фотоколориметре КФК-2 при длине волны 540 нм. Концентрацию фенолов определяли по градуировочному графику, построенному в стандартных условиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Среди микроорганизмов, способных к деградации хлорированных производных фенола, особое место принадлежит бактериям, которые часто способны трансформировать несколько органических соединений.

В ходе настоящей работы на селективных средах был выделен штамм *Agromyces* sp. IBRB-34DCP – деструктор фенола и 2,4-дихлорфенола. Идентифицирование изолята проводили согласно признакам культурально-морфологической и физиолого-биохимической дифференциации [8].

Культура *Agromyces* sp. IBRB-34DCP при росте на МПА образовывала колонии лимонно-желтого цвета пастообразной консистенции. После снятия колоний петлей в агаре оставался четкий след в виде пятна. Клетки, составлявшие колонии, имели форму палочек и положительную окраску по Гра-

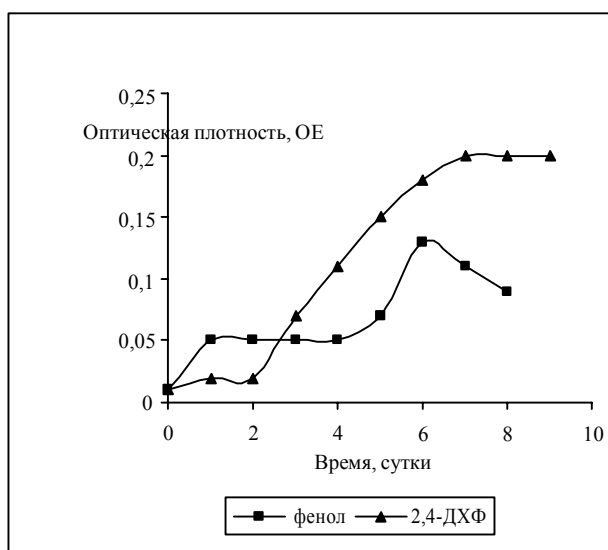
Коробов Владислав Викторович, к.б.н., старший научный сотрудник; Жарикова Наталья Владимировна, к.б.н., старший научный сотрудник; Анисимова Лилия Георгиевна, микробиолог; Ясаков Тимур Рамилевич, к.б.н., научный сотрудник; Кусова Ирина Валерьевна, к.т.н., доцент; Журенко Евгения Юрьевна, к.б.н., старший научный сотрудник; Галкин Евгений Григорьевич, к.х.н., старший научный сотрудник; Маркушева Татьяна Вячеславовна, д.б.н., руководитель группы, e-mail: tvmark@anrb.ru

му. Для штамма был характерен аэробный рост в диапазоне температур от +22°C до +41°C, с оптимумом рН среды - 6,8, использование в качестве источника углерода глюкозы, галактозы, рамнозы, маннозы и ксилозы и отсутствие каталазной и оксидазной активности.

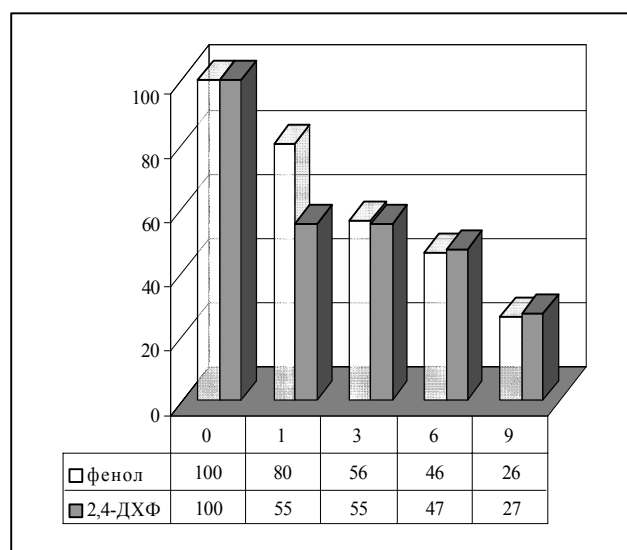
Штамм способен использовать в качестве источника углерода и энергии фенол и дихлорфенол. Динамика роста и минерализации фенола и его хлорированных производных культуры *Agromyces* sp. IBRB-34DCP в модельных условиях приведены на рис. (А, В). Из рисунка видно, что *Agromyces* sp IBRB-34DCP накапливает массу клеток в условиях использования фенола в качестве источника пита-

ния и энергии в периодической культуре в течение шести суток. Значение оптической плотности клеточной суспензии достигало максимума (0,13 ОЕ) и в дальнейшем оно плавно снижалось. Концентрация фенола менялась к 3-м суткам на 44%, к 9-м - на 74% от исходного значения.

На среде с 2,4-ДХФ изменение значений оптической плотности отмечалось с первых суток культивирования *Agromyces* sp IBRB-34DCP. Максимальное значение составляло на 7-е сут инкубации 0,2 ОЕ, затем после 3-суточной стационарной фазы культура заканчивала свой рост. Количество 2,4-ДХФ уменьшалось к 3-м сут на 45%, к 9-м - на 73% от начального состояния.



А



В

Рис. Зависимость значений оптической плотности клеточной суспензии OD₅₉₀ (А) и динамика содержания субстратов в среде культивирования (В) от времени инкубации *Agromyces* sp IBRB-34DCP в условиях использования фенола и 2,4-ДХФ в качестве источников углерода и энергии

Полученные данные показывают, что штамм *Agromyces* sp IBRB-34DCP способен утилизировать фенол и 2,4-ДХФ в водной среде. Из приведенного видно, что уровень ассимиляции фенола и 2,4-ДХФ штамма *Agromyces* sp IBRB-34DCP в ходе культивирования был примерно одинаков (73-74%).

На аэробных бактериях ранее было показано, что микроорганизмы, способные использовать молекулы фенола и его хлорированных производных в качестве единственного источника углерода и энергии относятся к родам *Arthrobacter* [9], *Bacillus* [10], *Pseudomonas* [11], *Rhodococcus* [12], *Sphingomonas* [13] и, несмотря на то, что бактерии рода *Agromyces* широко распространены и очень многочисленны в почве, ранее не было упоминаний о том, что представители рода *Agromyces* способны вовлекать в обмен веществ ксенобиотики ароматического ряда, содержащие хлор.

В результате данного исследования выделена новая культура рода *Agromyces*. Установлено, что штамм *Agromyces* sp IBRB-34DCP может утилизировать фенол и 2,4-ДХФ. Приведенные характеристики показали, что применение культуры *Agromy-*

ces sp IBRB-34DCP может позволить существенно снизить концентрацию фенола и его хлорпроизводных в водной среде.

Работа выполнена при поддержке гранта Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» и государственного контракта № 14.512.11.0077 ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маркушева Т.В., Журенко Е.Ю., Кусова И.В. Бактерии-деструкторы фенола и его хлорированных производных. Уфа: Гилем, 2002. 108 с.
2. Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Ясаков Т.Р., Анисимова Л.Г., Маркушева Т.В. Биоразнообразие бактерий-деструкторов хлорированных феноксикилот // Вестник ОГУ. 2009. № 6. С. 121-123.
3. Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Анисимова Л.Г., Маркушева Т.В. Особенности структуры микробиоты техногенной экосистемы Северного промузла РБ: бактерии-деструкторы фенола и 2,4-дихлорфенола // Изв. СамНЦ РАН. 2011. Т. 13. № 5(2).

4. Маркушева Т.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Коробов В.В., Ясаков Т.Р., Анисимова Л.Г. Штаммы-деструкторы хлорфеноксикислот гамма – подкласса протеобактерий // Известия СамНЦ РАН. 2011. Т. 13. № 5(2). С. 194-195.
5. Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Ясаков Т.Р., Анисимова Л.Г., Актуганов Г.Э., Маркушева Т.В. Характеристика консорциума бактерий-деструкторов 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты // Вестник Урал. мед. акад. науки. 2011. № 4/1 (38). С. 173-174.
6. Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Коробов В.В., Маркушева Т.В. Особенности антагонистических взаимодействий природных штаммов-деструкторов ароматических галогенидов // Известия УфНЦ РАН. 2012. № 3. С. 53-57.
7. Губен-Вейль И. Методы органической химии. М.: Госхимиздат, 1963. 1032 с.
8. Определитель бактерий Берджи. М.: Мир, 1997. 799 с.
9. Unell M. et al. Degradation of mixtures of phenolic compounds by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 // Biodegradation. 2008. V. 19. N. 4. P. 495-505.
10. Tallur P.N. et al. Biodegradation of p-Cresol by *Bacillus* sp. Strain PHN 1 // Curr. Microbiology. 2006. V. 53. N 6. P. 529-533.
11. Lin J. et al. Bacterial removal of toxic phenols from an industrial effluent // African J. Biotechnology. 2008. V. 7. N. 13. P. 2232-2238.
12. Ferraroni M. et al. Preliminary crystallographic analysis of 3-chlorocatechol 1,2-dioxygenase of a new modified ortho-pathway from the gram-positive *Rhodococcus opacus* 1CP grown on 2-chlorophenol // Acta Crystallographica. 2003. V. 59. P. 188-190.
13. Ederer M.M. et al. PCP degradation is mediated by closely related strains of the genus *Sphingomonas* // Mol. Ecol. 1997. V. 6. P. 39-49.

AGROMYCES SP. IBRB-34DCP - NEW STRAIN-DESTRUCTOR OF PHENOL AND 2,4-DICHLOROPHENOL

©2013 V.V. Korobov¹, N.V. Zharikova¹, L.G. Anisimova⁴, T.R. Yasakov¹, I.V. Kusova², E.Yu. Zhurenko¹, E.G. Galkin³, T.V. Markusheva¹

¹Institute of Biology, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

²Ufa State Aviation Technical University, Ufa

³Institute of Organic Chemistry, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

⁴LLC «Live agriculture», Krasnodar

The new bacterial strain *Agromyces* sp. IBRB-34DCP degrades phenol and 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP). Phenol and 2,4-DCP was reduced to 74% and 73% respectively under aerobic batch conditions.

Key words: destruction, phenol, 2,4-dichlorophenol, *Agromyces* sp.

Vladislav Korobov, Candidate of Biology, senior researcher; Natalya Zharikova, Candidate of Biology, senior researcher; Liliya Anisimova, microbiologist; Timur Yasakov, Candidate of Biology, researcher; Irina Kusova, Candidate of Technics, associate professor; Evgeniya Zhurenko, Candidate of Biology, senior researcher; Evgeniy Galkin, Candidate of Chemistry, senior researcher; Tatyana Markusheva, Doctor of Biology, team leader, e-mail: tvmark@anrb.ru