

УДК 579.64

ПОТЕНЦИАЛ БАКТЕРИЙ РОДОВ *HALOMONAS* И *PSEUDOMONAS* В ДЕГРАДАЦИИ СИСТЕМНОГО ГЕРБИЦИДА 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Л.М. Нурушева, А.М. Васильева, Е.А. Гильванова

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия, gelena@anrb.ru

Twelve haloalkaliphilic bacteria of family *Halomonadaceae* and *Pseudomonadaceae* from the collection of the Ufa Institute of Biology were tested for the ability to utilize the herbicide 2,4-D as a sole carbon source on M9 minimal agar medium. For the two most active strains I6 and И6с cultivation conducted in batch culture in minimal medium with phenoxyacetic acid at a concentration of 100 mg /l. It was studied the dynamic of growth, revealed a different pattern of cultural growth of I6 and И6с in the model system. It shows that both strains actively accumulates biomass at the disposing 2,4-dichlorophenoxyacetic acid as a power source. Similarity I6 to the *Halomonas desiderata* and И6с to *Pseudomonas stutzeri* was confirmed by analysis of gene 16S rRNA. For representatives *Halomonas* and *Pseudomonas stutzeri* has not been previously established the possibility of assimilation 2,4-D. The studied strains-destructors can be used in biotechnology for the bioremediation of contaminated and saline soils.

Ключевые слова: 2,4 Д, ксенобиотики, гербициды, *Halomonas*, *Pseudomonas*.

Открытие ауксина и его синтетических аналогов (их известно в настоящее время более ста) было использовано в растениеводстве в двух направлениях: для регулирования и развития растений и избирательного уничтожения сорной растительности. Применительно к 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) основным оказалось второе направление. В последние годы вызывают тревогу экологические проблемы, создаваемые производством и применением 2,4-Д. Это, прежде всего образование диоксинов при получении феноксиуксусной кислоты и загрязнение окружающей среды и пищевых продуктов самим 2,4-Д и продуктами ее превращений [Вајај et al., 2008]. Известно, что бактерии играют основную роль в разложении (хлор) ароматических углеводов в природе и, таким образом, становятся все более перспективными объектами для создания биотехнологий восстановления природной среды. Микробные клетки способны осуществлять ассимиляцию разнообразных химических субстанций, в ходе которых они выполняют процессы конверсии молекул ксенобиотиков до экологически безопасных продуктов, тем самым способствуют биоремедиации почв [Ka et al., 1994, Sorensen et al, 2006. Kumar et al., 2016]. Именно поэтому в настоящее время применение микроорганизмов рассматривается как основа наиболее выгодных способов поддержания качества окружающей среды.

Объектами исследований служили γ -протеобактерии из коллекции микроорганизмов Уфимского Института биологии. Большую часть культур (9 штаммов) составили галоалкалофильные бактерии семейства *Halomonadaceae*, два изолята бензоатустойчивых бактерий и штамм И6с, выделенный при скрининге продуцентов циклодекстрин-глюканотрансферазы. Все штаммы таксономически охарактеризованы по результатам анализа морфологических, физиолого-биохимических признаков и отнесены предварительно к грамтрицательным бактериям семейств *Halomonadaceae* и *Pseudomonadaceae*. В качестве модельных штаммов были отобраны культуры И6с и I6, продемонстрировавшие хороший рост на минимальной агаризованной среде М9 [Маниатис и др., 1984] с небольшими изменениями, содержащей 2,4-Д в качестве единственного источника углерода.

На примере наиболее активных в отношении к 2,4-Д штаммов было проведено культивирование в периодической культуре на минимальной среде с феноксиуксусной кислотой в концентрации 100 мг/л. Оптическую плотность бактериальной суспензии измеряли методом нефелометрии при длине волны 590 нм. Профили роста штаммов И6с и I6 в периодической культуре при 28 °С и 160 об/мин в течении 7 суток представлены на рисунке. Культивирование обоих штаммов проводили в оптимальных для роста каждого условиях (рН, концентрация NaCl).

Исследование динамики накопления биомассы в периодической культуре выявило разный характер роста тестируемых штаммов. Отсутствие лаг-фазы было существенным отличием в профиле роста культуры Ибс от роста галомонадного штамма И6. При культивировании штамма И6 лаг-фаза длилась сутки, после чего следовала экспоненциальная фаза роста с максимальным значением $OD_{590}=1.68$. Через 7 суток, после стационарной фазы роста для обоих вариантов наблюдали начало падения значений OD_{590} , что соответствовало периоду отмирания клеток.

Таксономический статус штаммов-деструкторов был уточнен с использованием метода сиквенса-анализа гена 16S рРНК, который показал, что для галомонадного штамма И6 филогенетически близким оказался *Halomonas desiderata* с уровнем сходства гена 98.95%. Видовая принадлежность штамма Ибс к *Pseudomonas stutzeri* подтверждена 100% гомологией гена. Представители рода *Pseudomonas* – наиболее часто упоминаемые биологические агенты трансформации различных (хлор)ароматических соединений, но *Pseudomonas stutzeri*, как впрочем, и

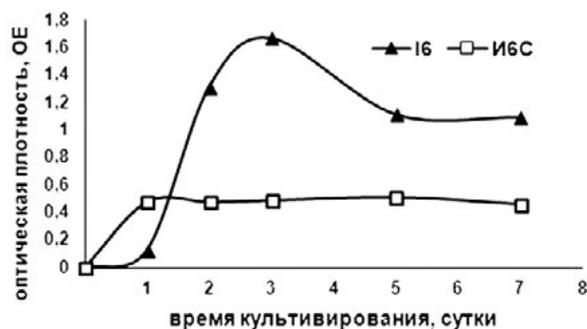


Рисунок. Зависимость значений оптической плотности OD_{590} биомассы деструкторов И6 и Ибс от времени культивирования в условиях использования 2,4-Д в качестве единственного источника углерода

бактерии рода *Halomonas* в качестве деструкторов 2,4-Д заявлены впервые. Изученные бактерии представляют несомненный интерес в плане утилизации системного гербицида 2,4-Д, особенно в условиях повышенной засоленности почв.

Библиографический список (References)

- Bajaj, M.; Gallert, C.; Winter, J. Biodegradation of high phenol containing synthetic wastewater by an aerobic fixed bed reactor // *Bioresour. Technol.*, 2008. V. 99, p.8376–8381
- Ka, J. O., W. E. Holben, J. M. Tiedje. Genetic and phenotypic diversity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-degrading bacteria isolated from 2,4-D-treated field soils // *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994. V. 60 p. 1106–1115
- Sorensen, S. R., A. Schultz, O. S. Jacobsen, J. Aamand. Sorption, desorption and mineralization of the herbicides glyphosate and MCPA in samples from Plant Protection News, 2016, 3(89), p. 122–123
- two Danish soil and subsurface profiles // *Environ. Pollut.*, 2006. V. 141 p. 184–194
- Kumar A., Trefault N., Olaniran A.O. Microbial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: Insight into the enzymes and catabolic genes involved, their regulation and biotechnological implications // *Critical Reviews in Microbiology*, 2016, V.42 N 2 p. 194–208
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.

DEGRADATION OF SYSTEMIC HERBICIDE 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID BY BACTERIA OF THE GENUS *HALOMONAS* AND *PSEUDOMONAS*

L.M. Nurusheva, A.M. Vasileva, E.A. Gilvanova

Institute of Biology Ufa Scientific Centre RAS, gelena@anrb.ru

Twelve haloalkaliphilic bacteria of family *Halomonadaceae* and *Pseudomonadaceae* from the collection of the Ufa Institute of Biology were tested for the ability to utilize the herbicide 2,4-D as a sole carbon source on M9 minimal agar medium. For the two most active strains И6 and Ибс cultivation conducted in batch culture in minimal medium with phenoxyacetic acid at a concentration of 100 mg /l. It was studied the dynamic of growth, revealed a different pattern of cultural growth of И6 and Ибс in the model system. It shows that both strains actively accumulates biomass at the disposing 2,4-dichlorophenoxyacetic acid as a power source. Similarity И6 to the *Halomonas desiderata* and Ибс to *Pseudomonas stutzeri* was confirmed by analysis of gene 16S rRNA. For representatives *Halomonas* and *Pseudomonas stutzeri* has not been previously established the possibility of assimilation 2,4-D. The studied strains-destructors can be used in biotechnology for the bioremediation of contaminated and saline soils.