

УДК 579.25

DOI: 10.31040/2222-8349-2021-0-4-52-56

**ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕДСТАВИТЕЛЯ РОДА *CELLULOSIMICROBIUM*
КАК ДЕСТРУКТОРА 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ****© Н.В. Жарикова, Е.Ю. Журенко, В.В. Коробов,
Т.Р. Ясаков, Т.В. Маркушева, С.Н. Абрамов**

На основе культурально-морфологических и физиолого-биохимических характеристик уточнено таксономическое положение штамма NPZ-121, выделенного из почвы, загрязненной отходами химического производства г. Уфы (Россия), как принадлежащего к роду *Cellulosimicrobium* виду *funkei*. В периодической культуре описана динамика роста штамма *C. funkei* NPZ-121 и утилизации им 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты в концентрации 100 мг/л. За 11 суток культура использовала до 69% субстрата от первоначального значения. Так как ранее была выявлена способность штамма метаболизировать 2,4,5-трихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4,5-Т), то таким образом установлена полисубстратная активность изучаемой культуры по отношению к хлорированным феноксиуксусным кислотам.

Ключевые слова: штамм-деструктор, 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), биодegradация, *Cellulosimicrobium*.

Введение. Род *Cellulosimicrobium* в семействе *Promicromonosporaceae* был предложен путем реклассификации вида *Cellulomonas cellulans*, ранее выделенного из почвы пастбища, на основе его филогенетических и хемотаксономических характеристик. Позднее в рамках этого рода были описаны еще три вида: *Cellulosimicrobium variabile*, полученный из содержимого кишечника австралийского термита, *Cellulosimicrobium funkei*, изолированный из крови человека, и *Cellulosimicrobium terreum*, выделенный из почвенного образца. Однако затем на основании отличного филогенетического положения и аминокислотного состава пептидогликана вид *C. variabile* был переклассифицирован как *Isoptericola variabilis* в новый род *Isoptericola* того же семейства. Новые виды: *Cellulosimicrobium marinum* был выделен из морских отложений Индонезии, *Cellulosimicrobium*

arenosum – из морского осадочного песка острова Модо (Республика Корея) и *Cellulosimicrobium aquatile* – из пресноводного водоема Индии [1, 2].

Актиномицеты широко известны как деструкторы различных сложно утилизируемых соединений, таких как нафталин, фенантрен, антрацен, хлорфенолы и хлорфеноксиуксусные кислоты, однако в основном это представители родов *Rhodococcus* [3] и *Arthrobacter*, выделенные из загрязненных этими соединениями местообитаний. Принадлежащие к роду *Cellulosimicrobium* бактерии в большинстве случаев являются обитателями чистых природных экотопов и только *C. funkei* был изолирован из крови человека и, возможно, вызывает инфекции у людей [1, 2].

2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), так же как и 2,4,5-Т, принадлежит к группе

ЖАРИКОВА Наталья Владимировна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,
e-mail: puzzle111@yandex.ru

ЖУРЕНКО Евгения Юрьевна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,
e-mail: zhurenkoe@gmail.com

КОРОБОВ Владислав Викторович – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,
e-mail: vacikk@anrb.ru

ЯСАКОВ Тимур Рамилевич – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,
e-mail: iasakovtimur@gmail.com

МАРКУШЕВА Татьяна Вячеславовна – д.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,
e-mail: tvmark@anrb.ru

АБРАМОВ Сергей Николаевич – к.б.н., Институт развития образования Республики Башкортостан,
e-mail: abramov-67@mail.ru

синтетических ауксинов, которые с конца второй мировой войны широко используются в качестве действующих агентов селективных гербицидов. Долговременное и масштабное использование таких агрохимикатов привело с одной стороны к загрязнению сельскохозяйственных почв, а с другой – к адаптации и селекции бактерий, способных к их активной деградации.

Целью работы является уточнение таксономического положения штамма NPZ-121, выделенного из почвы, загрязненной отходами химического производства, а также изучение осуществляемого им процесса конверсии 2,4-Д.

Материалы и методы. Объектом исследования служил природный бактериальный штамм NPZ-121, изолированный из образца почвы, загрязненной отходами химического производства (Уфа, Россия).

Выделение геномной ДНК, амплификация частичной последовательности гена 16S рРНК и секвенирование были описаны ранее [4, 5].

Бактериальную культуру выращивали в конических колбах (250 мл) на минимальной солевой среде М9 [6], содержащей в качестве единственного источника углерода 2,4-Д в концентрации 100 мг/л. Культивирование проводили при температуре 28°C в термостатируемой установке УВМТ-12-250 («Элион», Россия) при 120 об/мин, а интенсивность роста оценивали по оптической плотности (ОП₅₉₀) клеточной суспензии с использованием фотокolorиметра КФК-2 (Россия).

Определение количества 2,4-Д в культуральной жидкости проводили согласно руководству [7] с небольшими модификациями. Для анализов отбирали по 5 мл культуральной жидкости, освобождали от клеток центрифугированием при 3600 g в течение 30 мин. Супернатант подкисляли 2 н соляной кислотой до pH 2.0, после чего в пробы добавляли в качестве внутреннего стандарта 2,4,5-Т до конечной концентрации метки 100 мг/л. Затем из проб трехкратно экстрагировали хлорфеноксиуксусные кислоты равными объемами хлороформа. После испарения хлороформа экстракты переводили в гексан и фракционировали методом тонкослойной хроматографии на пластинах силуфол UV-254 («Chemapol», Чехия). Сканирование образцов проводили при длине волны 260–280 нм в камере Хромоскана («Jouze-Loebl», Великобритания). Содержание хлорфеноксиуксусных кислот определяли по калибровочному графику для чистого стандарта.

Результаты и обсуждение. Сравнительный анализ последовательности гена 16S рРНК показал, что изолят филогенетически родственен представителям рода *Cellulosimicrobium*, где наиболее близок к видам *Cellulosimicrobium funkei* и *Cellulosimicrobium aquatile* (рис. 1). Уровень сходства генов 16S рРНК между NPZ-121 и типовыми штаммами *C. funkei* W6122 (AY501364) и *C. aquatile* 3bp (LN812019) составлял 99.79 и 99.31%, соответственно.

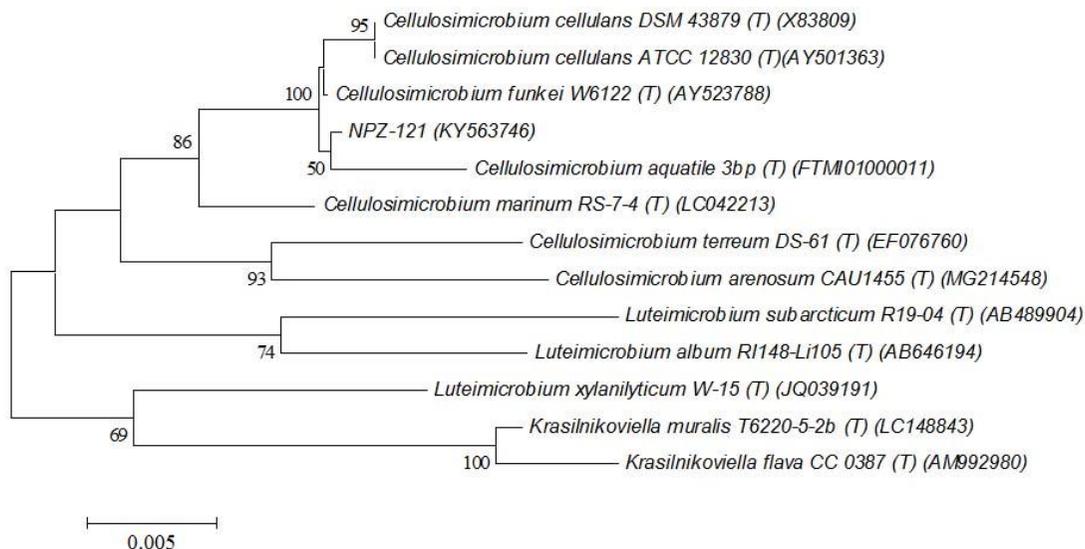


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнительного анализа практически полной последовательности (1477 нуклеотидов) амплификата гена 16S рРНК изучаемого штамма и гомологичных ему типовых штаммов. Цифрами обозначена достоверность ветвления, определенная с помощью bootstrap-анализа 1000 альтернативных деревьев (показаны значения более 50). Масштаб отображает 5 нуклеотидных замен на каждые 1000 нуклеотидов. В скобках указан номер последовательности гена 16S рРНК в GenBank

Поскольку согласно современным представлениями внутривидовое сходство последовательностей гена 16S рНК у представителей рода *Cellulosimicrobium* должно составлять 99.8–100%, а со штаммами других близкородственных видов – 99.5–99.8% [1], то данные филогенетического анализа позволяют идентифицировать штамм только до рода *Cellulosimicrobium*.

В дальнейшем были получены культурально-морфологические и физиолого-биохимические характеристики изолята. Штамм NPZ-121 после 2-дневной инкубации при 28°C образовывал желтые, круглые и гладкие колонии диаметром около 2 мм. Грамположительные клетки не включали эндоспор, располагались одиночно, в парах и цепочках, имели формы кокков и овалов размером 0.3–0.4 × 0.4–0.6 мкм (рис. 2), были подвижны за счет перитрихального жгутикования.

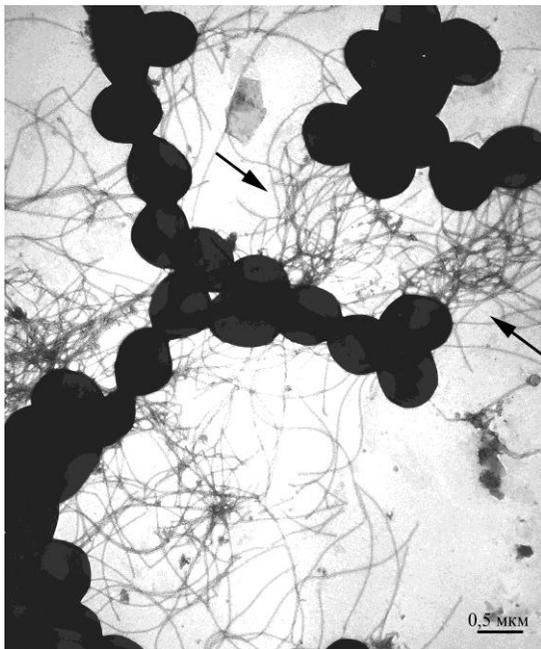


Рис. 2. Электронно-микроскопические изображения клеток *C. funkei* NPZ-121Т при разрешении 24000X, стрелкой указаны жгутики. Шкала 0.5 мкм

Для штамма был характерен аэробный рост в диапазоне температур от 22 до 41°C и значениях pH, близких к нейтральным, – 6.8–7.2. В качестве единственного источника углерода культура использовала D-глюкозу, D-ксилозу, лактозу, D-фруктозу и мальтозу. Образовывала кислоту из L-арабинозы, D-целлобиозы, глицерина, D-маннозы, но не из инулина и рафинозы.

Необходимо отметить, что два наиболее близких к изоляту NPZ-121 типовых представи-

телей *Cellulosimicrobium funkei* W6122 и *Cellulosimicrobium aquatile* Збр также обладают рядом сходных ключевых фенотипических признаков, таких как отсутствие способности образовывать кислоту из инулина и рафинозы [2]. Однако подвижность – это ключевой признак, свойственный только культурам вида *C. funkei*. Следует отметить, что ранее данные фенотипические признаки позволяли дифференцировать представителей вида *C. funkei* и другого, близкого ему в филогенетическом отношении, вида *Cellulosimicrobium cellulans* [1, 8]. Поэтому штамм NPZ-121 был идентифицирован нами как принадлежащий к виду *Cellulosimicrobium funkei*.

В дальнейшей работе *C. funkei* NPZ-121 был испытан на способность использовать 2,4-Д в качестве единственного источника углерода и энергии в периодической культуре. Максимальное значение оптической плотности культуры достигло к 10 суткам (0.68 о.е.), при этом содержание 2,4-Д уменьшилось к 5-м суткам на 30%, а к 11-м – на 69% от контроля (рис. 3).

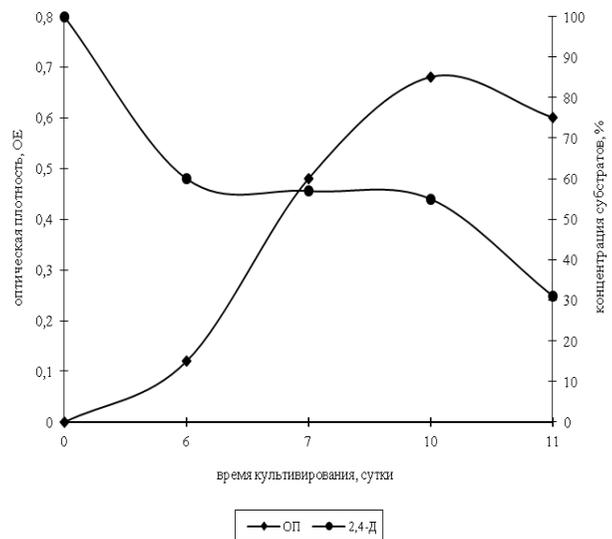


Рис. 3. Зависимость концентрации 2,4,5-Т от времени инкубации штамма *Cellulosimicrobium* sp. NPZ-121Т в периодической культуре

В разное время активность штаммов-деструкторов 2,4-Д различные исследователи изучали в условиях использования 2,4-Д как единственного источника углерода и энергии в концентрации от нескольких мг/л до нескольких сотен мг/л или даже г/л (см. обзор [9]).

C. funkei NPZ-121 показал себя эффективным деструктором 2,4-Д в концентрации 100 мг/л, которая была взята нами для работы

как наиболее соответствующая норме внесения гербицида на 1 м² почвы в перерасчете на активное начало. Кроме того, ранее изучаемый штамм был описан нами как способный к утилизации другой хлорфеноксисукусной кислоты 2,4,5-Т [10].

Таким образом, в результате проведенной работы уточнено филогенетическое положение штамма и установлено, что *C. funkei* NPZ-121 обладает полисубстратной активностью по отношению к хлорфеноксисукусным кислотам.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098-9 с использованием оборудования центра коллективного пользования УФИЦ РАН «Агидель».

Литература

1. Brown J.M., Steigerwalt A.G., Morey R.E., Daneshvar M.I., Romero L.-J., McNeil M.M. Characterization of clinical isolates previously identified as *Oerskovia turbata*: proposal of *Cellulosimicrobium funkei* sp. nov. and emended description of the genus *Cellulosimicrobium* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56. P. 801–804. doi: 10.1099/ij.s.0.63882-0
2. Sultanpuram V.R., Mothe T., Chintalapati S., Chintalapati V.R. *Cellulosimicrobium aquatile* sp. nov., isolated from Panagal reservoir, Nalgonda, India // Antonie van Leeuwenhoek 2015. V. 108. P. 1357–1364. doi: 10.1007/s10482-015-0588-y
3. Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Маркушева Т.В. Возможность использования штамма-деструктора фенола и 2,4-дихлорфенола, *Rhodococcus erythropolis* 17s, для очистки промышленных стоков // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2017. Т. 72, № 4. С. 235–240.
4. Ясаков Т.Р., Анисимова Л.Г., Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Маркушева Т.В. Эволюция и сравнительная геномика плазмиды pSM22 группы IncF/МОВF₁₂ // Молекулярная биология. 2019. Т. 53, № 4. С. 600–612. doi: 10.1134/S0026898419040177
5. Zharikova N.V., Iasakov T.R., Bumazhkin B.K., Patutina E.O., Zhurenko E.I., Korobov V.V., Sagitova A.I., Kuznetsov B.B., Markusheva T. V. // Saudi J. Biol. Sci. 2018. V. 25, № 4. P. 660–671. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.02.014
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
7. Методы определения микроколичеств пестицидов / под ред. Клисенко М.А. М.: Медицина, 1984. 256 с.
8. Antony R., Krishnan K.P., Thomas S., Abraham W.P., Thamban M. Phenotypic and molecular identification of *Cellulosimicrobium cellulans* isolated from Antarctic snow // Antonie van Leeuwenhoek, 2009, vol. 96, pp. 627–634.
9. Zharikova N.V., Iasakov T.R., Zhurenko E.Yu., Korobov V.V., Markusheva T.V. Bacterial genes of

tification of *Cellulosimicrobium cellulans* isolated from Antarctic snow // Antonie van Leeuwenhoek. 2009. V. 96. P. 627–634.

9. Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Маркушева Т.В. // Успехи современной биологии. 2017. Т. 137, № 5. С. 514–528. doi: 10.7868/S0042132417050076.

10. Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Галкин Е.Г., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Стариков С.Н., Сагитова А.И., Маркушева Т.В. Новый штамм *Cellulosimicrobium* sp. NPZ-121 – деструктор 2,4,5-трихлорфеноксисукусной кислоты // Микробиология. 2018. Т. 87, № 1. С. 93–96. doi: 10.7868/S002636561801010X

References

1. Brown J.M., Steigerwalt A.G., Morey R.E., Daneshvar M.I., Romero L.-J., McNeil M.M. Characterization of clinical isolates previously identified as *Oerskovia turbata*: proposal of *Cellulosimicrobium funkei* sp. nov. and emended description of the genus *Cellulosimicrobium* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006, vol. 56, pp. 801–804. doi: 10.1099/ij.s.0.63882-0
2. Sultanpuram V.R., Mothe T., Chintalapati S., Chintalapati V.R. *Cellulosimicrobium aquatile* sp. nov., isolated from Panagal reservoir, Nalgonda, India // Antonie van Leeuwenhoek, 2015, vol. 108, pp. 1357–1364. doi: 10.1007/s10482-015-0588-y
3. Korobov V.V., Zhurenko E.I., Zharikova N.V., Iasakov T.R., Markusheva T.V. Possibility of using phenol- and 2,4-dichlorophenol-degrading strain, *Rhodococcus erythropolis* 17s, for treatment of industrial wastewater // Moscow University Biological Sciences Bulletin, 2017, vol. 72, no. 4, pp. 201–205. doi: 10.3103/S0096392517040083
4. Iasakov T.R., Anisimova L.G., Zharikova N.V., Zhurenko E.I., Korobov V.V., Markusheva T.V. Evolution and comparative genomics of the pSM22 plasmid of the IncF/МОВF₁₂ // Molecular Biology, 2019, vol. 53, no. 4, pp. 535–546. doi: 10.1134/S0026893319040162
5. Zharikova N.V., Iasakov T.R., Bumazhkin B.K., Patutina E.O., Zhurenko E.I., Korobov V.V., Sagitova A.I., Kuznetsov B.B., Markusheva T.V. // Saudi J. Biol. Sci., 2018, vol. 25, no. 4, pp. 660–671. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.02.014
6. Maniatis, T., Fritsh, E.E., and Sambrook, J., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, 545 p.
7. Metody opredeleniya mikrolichestv pestitsidov (Methods for Microscale Pesticide Determination), Klisenko M.A., Ed., Moscow: Meditsina, 1984, 256 p.
8. Antony R., Krishnan K.P., Thomas S., Abraham W.P., Thamban M. Phenotypic and molecular identification of *Cellulosimicrobium cellulans* isolated from Antarctic snow // Antonie van Leeuwenhoek, 2009, vol. 96, pp. 627–634.
9. Zharikova N.V., Iasakov T.R., Zhurenko E.Yu., Korobov V.V., Markusheva T.V. Bacterial genes of

2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation encoding α -ketoglutarate-dependent dioxygenase activity // *Biology Bulletin Reviews*. 2018. vol. 8. P. 155–167.

10. Korobov V.V., Zhurenko E.Y., Galkin E.G., Zharikova N.V., Iasakov T.R., Starikov S.N., Sagito-

va A.I., Markusheva T.V. *Cellulosimicrobium* sp. strain NPZ-121, a degrader of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid // *Microbiology (Mikrobiologiya)*, 2018, vol. 87, no. 1, pp. 147-150. doi: 10.1134/S0026261718010101

**CHARACTERISATION OF A MEMBER OF THE GENUS *CELLULOSIMICROBIUM*
AS A DEGRADER OF 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID**

© N.V. Zharikova¹, E.I. Zhurenko¹, V.V. Korobov¹,
T.R. Yasakov¹, T.V. Markusheva¹, S.N. Abramov²

¹ Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
69, prospekt Oktyabrya, 450054, Ufa Russian Federation

² Institute of Education Development of the Republic of Bashkortostan,
120, ulitsa Mingazheva, 450005, Ufa, Russian Federation

On the basis of the cultural, morphological, physiological and biochemical features, the taxonomic position of the NPZ-121 strain (isolated from the soil contaminated with chemical waste in Ufa (Russia)) as belonging to the species *Cellulosimicrobium funkei* was specified. In a batch culture the dynamics of growth of the strain *C. funkei* NPZ-121 and utilization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid at a concentration of 100 mg/l were described. For 11 days the culture used up to 69% of the substrate from the initial value. The ability of the strain to metabolize 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) was revealed previously. Thus, the polysubstrate activity to chlorinated phenoxyacetic acids of the NPZ-121 strain was established.

Key words: degrader strain, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), biodegradation, *Cellulosimicrobium*.