

УДК 579.25

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КОНВЕРСИИ ХЛОРФЕНОКСИУКСУСНЫХ КИСЛОТ ШТАММА *Serratia* sp. 22S

© 2024 г. Н. В. Жарикова^{1, *}, Е. Ю. Журенко¹, В. В. Коробов¹, Л. Г. Анисимова²,
Г. Э. Актуганов¹

¹Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, 450054 Россия

²Научно-исследовательский технологический институт гербицидов и регуляторов роста растений
с опытно-экспериментальным производством АН РБ, Уфа, 450029 Россия

*e-mail: puzzle111@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.07.2023 г.

После доработки 18.08.2023 г.

Принята к публикации 31.08.2023 г.

Из образцов почвы, загрязненной отходами химического производства, был изолирован природный бактериальный штамм 22S, относящийся к роду *Serratia*. На основании исследования его вирулентности, токсичности, инфективности и инвазивности изучаемый штамм был признан непатогенным. В периодической культуре *Serratia* sp. 22S была способна отдельно утилизировать хлорфеноксиксусные кислоты (100 мг/л) в качестве единственного источника углерода и энергии. На основании найденных в среде культивирования соединений (2,4-дихлор-6-метилфеноксиксусной, феноксиксусной и 2-гидрокси-2-гексендионовой кислот) был предположен путь катаболизма хлорфеноксиксусных кислот посредством полного восстановительного дехлорирования субстрата с последующим *мета*-разрывом ароматического кольца катехола. Эксперименты с интактными клетками подтвердили данное предположение. В модельных системах была выявлена хорошая адаптагенность и приживаемость штамма 22S в почве, причем содержание хлорфеноксиксусных кислот до определенной концентрации оказывало положительное влияние на динамику роста культуры, скорее всего вследствие селективного воздействия.

Ключевые слова: 2,4-дихлорфеноксиксусная кислота, 2,4,5-трихлорфеноксиксусная кислота, хлорфеноксигербициды, 2-гидроксимуконный полуальдегид, *Serratia*

DOI: 10.31857/S0555109924010059, **EDN:** HCSHTO

2,4-Дихлорфеноксиксусная (2,4-Д) и 2,4,5-трихлорфеноксиксусная (2,4,5-Т) кислоты представляют собой синтетические ауксины, соли и эфиры которых с 1940 гг. широко применялись в сельском хозяйстве как гербициды для борьбы с широколиственными сорняками, а также в качестве регулятора роста растений. Кроме того, они использовались как дефолианты во время чрезвычайного положения в Малайзии в 1948–1960 гг. и во время вьетнамской войны 1961–1971 гг. Однако в 1980 гг. 2,4,5-Т была запрещена во всем мире вследствие ее токсичности для животных [1].

Оба гербицида являются загрязнителями подземных вод, поскольку, с одной стороны, они хорошо растворимы в воде, а с другой стороны, медленно разлагаются [2]. Биоремедиация загрязненных почв и подземных вод микроорганизмами в последние годы вызывает большой интерес, так как этот метод безопасен, относительно эффективен, экологичен и экономичен [3].

К настоящему времени известны бактериальные штаммы, способные утилизировать 2,4-Д в аэробных

условиях, такие как *Cupriavidus pinatubonensis* (первоначально *Alcaligenes eutrophus*) JMP 134, *Sphingomonas* sp. TFD44, *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* EST4002, *Bradyrhizobium* sp. HW13, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1c и *Halomonas* sp. EF43 [4–10]. Вышеперечисленные штаммы в основном были изолированы из загрязненных гербицидами почв, а их характерной особенностью являлось наличие у них единого пути конверсии 2,4-Д через 3,5-дихлоркатехол с последующим расщеплением его ароматического кольца (рис. 1а).

В отличие от разнообразия аэробных бактерий, разлагающих 2,4-Д, сообщалось лишь о нескольких подобных культурах, осуществляющих конверсию 2,4,5-Т. Наиболее известны представители родов *Burkholderia*, *Nocardioides*, *Sphingomonas* и *Bradyrhizobium*. Все они способны использовать 2,4,5-Т в качестве основного источника углерода и энергии [11–16]. Полный путь разложения 2,4,5-Т известен для штамма *Burkholderia phenoliruptrix* (первоначально *Pseudomonas cepacia*) AC1100 (рис. 1б), который протекает через центральный

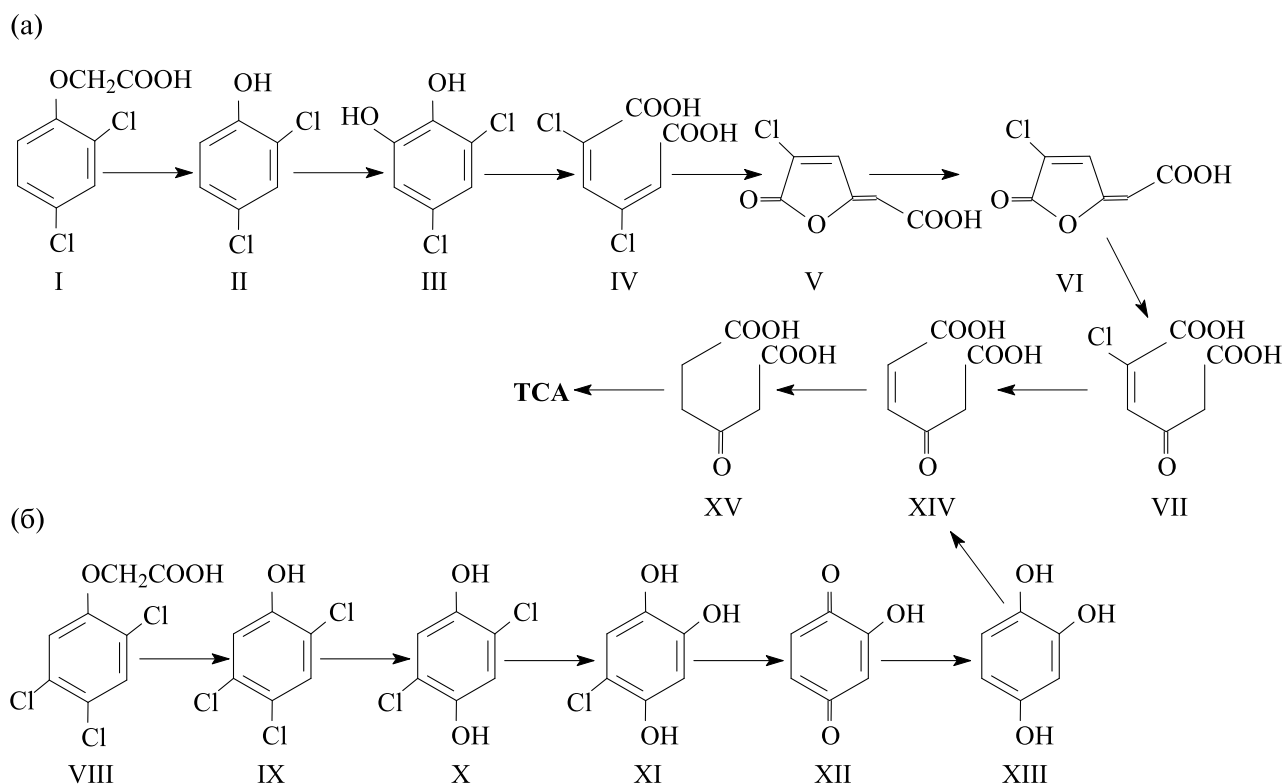


Рис. 1. Пути аэробной деградации хлорированных феноксиуксусных кислот у бактерий: а — 2,4-Д штамма *C. necator* JMP134 [4], б — 2,4,5-Т штамма *B. phenoliruptrix* AC1100 [11, 12]: I — 2,4-Д; II — 2,4-дихлорфенол; III — 2,4-дихлоркатехол; IV — 2,4-дихлор-*цис*, *цис*-муконат; V — *транс*-2-хлордиенлактон; VI — *цис*-2-хлордиенлактон; VII — 2-хлор-малеилуксусная кислота; VIII — 2,4,5-Т; IX — 2,4,5-трихлорфенол; X — 2,5-дихлоргидрохинон; XI — 5-хлоргидрокси-1,4-бензохинон; XII — 2-гидрокси-1,4-бензохинон; XIII — гидрокси-1,4-бензохинон; XIV — малеилуксусная кислота; XV — β-кетоадипат; TCA — цикл трикарбоновых кислот.

метаболит — 2,5-дихлоргидрохинон, и далее — с образованием гидрокси-1,4-бензохинона с последующим *орто*-расщеплением его ароматического кольца [11, 12]. Вероятно некоторая «избыточность» этого пути является следствием его происхождения — культура была получена в лаборатории методом «плазмид-ассоциированного молекулярного бридинга» [17].

Также через гидрокси-1,4-бензохинон с дальнейшим *орто*-расщеплением ароматического кольца происходит деструкция 2,4-Д и 2,4,5-Т у штамма *Nocardioides simplex* ЗЕ, для которого выделены и изучены ключевые ферменты конверсии — гидрокси-1,4-бензохинон- и 6-хлоргидрокси-1,4-бензохинон-1,2-диоксигеназы, а также малеилацетатредуктаза [18].

Несмотря на многочисленные попытки усилить биодegradацию хлорфеноксиуксусных кислот путем биоаугментации почв штаммами-деструкторами, часто не происходит значимого увеличения разложения загрязняющих веществ по сравнению с таковым в незагрязненной почве. Интродуцированные штаммы не всегда хорошо выживают в почвенной среде, несмотря на различные стрессы, в том числе конкуренцию с аборигенными микроорганизмами. Использование природных местных

микроорганизмов, разлагающих 2,4-Д, является реальной стратегией биоремедиации загрязненных участков [19].

Цель этой работы — выявление метаболического потенциала конверсии 2,4-Д и 2,4,5-Т у аборигенного бактериального штамма 22S, а также определение его таксономического положения, оценка безопасности его применения, адаптогенности и приживаемости в почве.

МЕТОДИКА

Объектом исследований был выбран природный бактериальный штамм, обозначенный нами 22S, изолированный из образцов почвы, загрязненной отходами химического производства (Уфа, Россия).

Морфометрические характеристики были изучены с помощью просвечивающей электронной микроскопии на микроскопе Н-300 («Hitachi», Япония) при увеличении 18000 (75 кВ).

Культуральные и физиолого-биохимические свойства изолята определяли согласно методическому руководству [20].

Геномную ДНК выделяли из бактерий методом Бирнбойма–Доли с модификациями [21]. Небольшое количество бактериальной биомассы — одна колония с чашки с агаризованной среды или 25 мкл осадка жидкой культуры — суспендировали в 100 мкл буфера I (50 мМ Трис-НСl, рН 8.0; 10 мМ ЭДТА; 50 мкг/мл панкреатической РНКазы) до получения однородной суспензии. Затем добавляли 125 мкл лизирующего буфера II (0.2 М NaOH; 1%-ный додецилсульфат натрия). Смесь обрабатывали ультразвуком на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т (Россия) на максимальной мощности 22 кГц в течение 2 мин при 4°C. Затем суспензию инкубировали при 65°C в течение 45 мин и охлаждали до комнатной температуры. После этого добавляли 125 мкл буфера III (2.5 мМ ацетат калия, рН 4.5), смесь встряхивали и центрифугировали 10 мин при 10000 g в миницентрифуге Eppendorff 5415C (“Eppendorff”, Германия). В супернатант добавляли 500 мкл смолы Wizard Maxi Preps (“Promega”, США) и продолжали экстракцию в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрация полученного препарата ДНК при использовании этого метода составляла 30–50 мкг/мл.

Для проведения ПЦР и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов частичной последовательности гена 16S рРНК была использована универсальная праймерная система [22]. Амплификационная смесь (50 мкл) имела следующий состав: буфер для ДНК-полимеразы BioTaq (“БиоМастер”, Россия) 17 мМ (NH₄)₂SO₄; 67 мМ трис-НСl, рН 8.8; 2 мМ MgCl₂; по 12.5 нмоль каждого из dNTP, 50 нг ДНК-матрицы; по 5 пмоль соответствующих праймеров и 3 ед. ДНК-полимеразы BioTaq (“Диалат”, Россия). Температурно-временной профиль ПЦР: первый цикл — 9 мин при 94°C, 1 мин при 55°C, 2 мин при 72°C; последующие 30 циклов — 1 мин при 94°C, 1 мин при 55°C, 2 мин при 72°C; завершающий цикл — 7 мин при 72°C. Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов генов проводили с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 (“Applied Biosystems”, США) на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730 (“Applied Biosystems”, США) согласно инструкциям производителя.

С использованием пакета программ BLAST проведен поиск гомологичных последовательности с опубликованными в базе данных GenBank, а с помощью CLUSTAL W и MEGA 5 произведено их множественное выравнивание и построение филогенетического дерева (рис. 2).

Бактериальный штамм выращивали в конических колбах (250 мл) на минимальной солевой среде M9 [23], содержащей в качестве единственного источника углерода 2,4-Д/2,4,5-Т в концентрации 100 мг/л. Культивирование проводили при температуре 28°C в термостатируемой установке УВМТ-12–250 (“Элион”, Россия) при 120 об./

мин. Интенсивность роста культуры оценивали по оптической плотности (ОП₅₉₀) клеточной суспензии с использованием фотокolorиметра КФК-2 (“ЗОМЗ”, Россия).

Определение количества хлорфеноксиуксусных кислот в культуральной жидкости проводили согласно руководству [24] с небольшими модификациями, описанными ранее в статье Жариковой с соавт. [25].

Продукты метаболизма хлорфеноксиуксусных кислот определяли на хромато-масс-спектрометре NERMAG R-30-10 с хроматографом Carlo Erba MEGA 536010 (“Hewlett-Packard”, США), условия определения описаны в работе Жариковой с соавт. [25].

Интермедиаты идентифицировали с использованием системы обработки данных MS HP ChemStation, содержащей библиотеку из 138000 масс-спектров Base Date WILEY138L.

Изучение этапов промежуточного метаболизма хлорфеноксиуксусных кислот проводили в экспериментах с интактными клетками [26, 27]. Предварительное определение пути расщепления ароматического кольца выполняли качественными методами, в основе которых лежит желтое окрашивание среды инкубации при формировании полуальдегида гидроксимуконной кислоты (мета-путь), либо положительная реакция Ротера (орта-путь).

Бактериальные клетки выращивали до конца экспоненциальной фазы на солевой среде M9, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии 2,4-Д или 2,4,5-Т в концентрации 100 мг/л. Затем клетки отделяли центрифугированием при 3630 g 20 мин, дважды промывали 50 мМ натрий-фосфатным буфером (рН 7.0) и суспендировали (1 г сырой биомассы) в том же буфере.

Далее выращенные на хлорфеноксиуксусных интактные клетки суспендировали в 20 мл 50 мМ натрий-фосфатного буфера (рН 7.5) и инкубировали в течение 3 ч в присутствии 100 мМ катехола в темноте при 25°C. Контролем служила смесь без добавления интактных клеток.

Ферментативную активность катехол-1,2-диоксигеназы и катехол-2,3-диоксигеназы оценивали по изменению оптической плотности реакционной смеси на спектрофотометре СФ-46 (ООО “ЛОМО”, Россия) в кварцевых кюветках объемом 4 мл с длиной оптического пути 1 см. Поглощение контрольной и опытной смеси до и после инкубации измеряли при длинах волн 260, 274 и 375 нм, соответствующих пикам поглощения муконовой кислоты, катехола и гидроксимуконного полуальдегида. Наличие активности диоксигеназ, расщепляющих ароматическое кольцо катехола, определяли по сдвигу пика поглощения катехола в более коротковолновую или, наоборот, в длинноволновую область спектра.

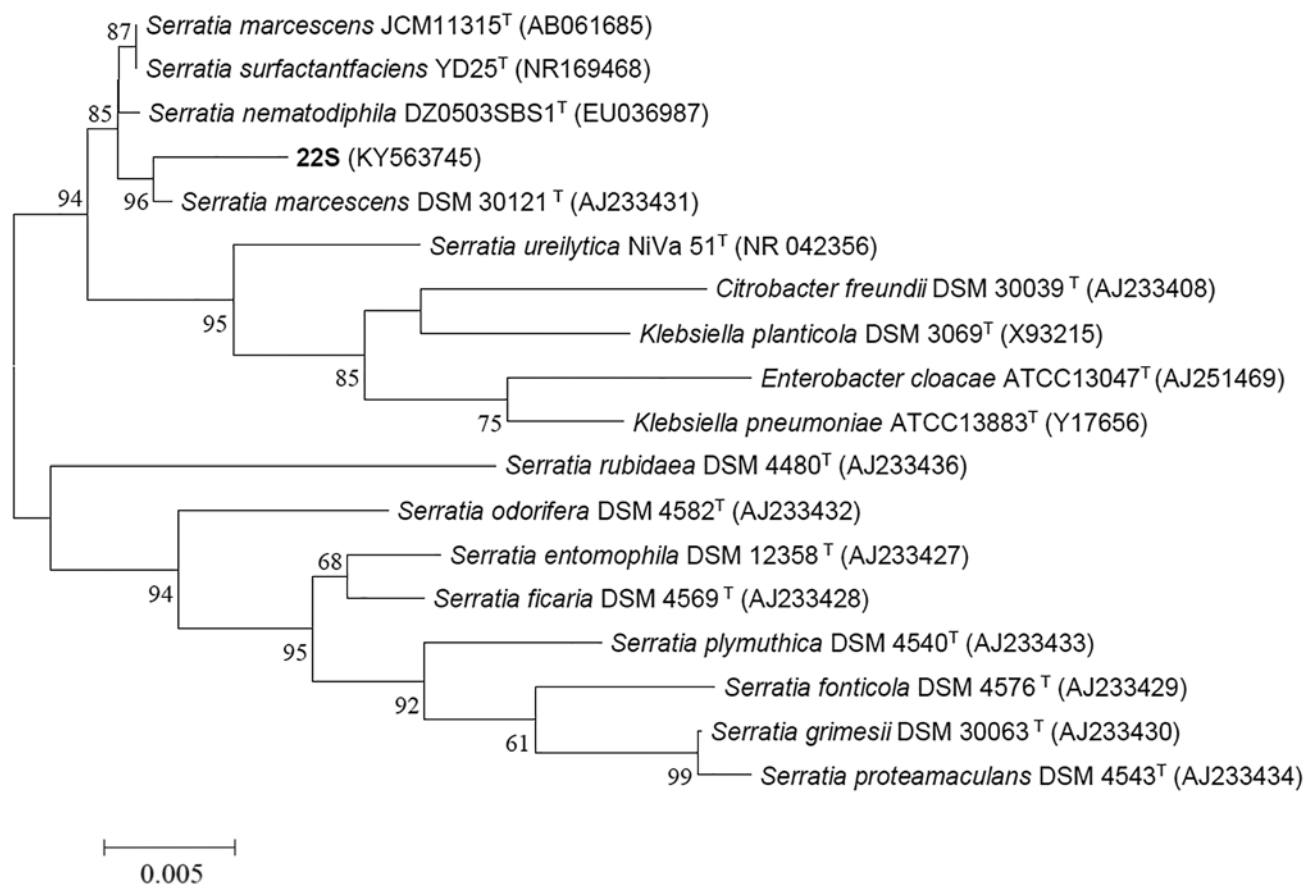


Рис. 2. Филогенетическое дерево 16S рНК штамма 22S и гомологичных ему последовательностей типовых видов бактерий близких к роду *Serratia*, построенное методом “Neighbor-Joining”. Цифрами указана достоверность ветвления, рассчитанная с помощью “bootstrap”-анализа (значимыми признаются величины больше 50). Масштаб отражает эволюционное расстояние, соответствующее 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов. В скобках указаны номера последовательностей в базе данных (GenBank).

Оценка патогенности бактерий проводилась на основании изучения их вирулентности, токсичности, инфективности и инвазивности. Оценку средневирulentной дозы, то есть дозы, которая вызывает смертельный эффект у 50% подопытных животных, проводили путем однократного введения взвеси изучаемого штамма микроорганизма в дозах 10^7 , 10^8 и 10^9 кл. на одно животное внутрибрюшинно. Для испытания каждой дозы использовали белых мышей по 6 животных в группе. Наблюдение за их выживаемостью проводили в течение 30 сут.

Для определения токсичности штамма 22S животным внутрибрюшинно вводили взвесь убитых клеток в физрастворе в дозе 10^9 кл./млпо бактериологическому стандарту. Фиксировали состояние животных в течение 48 ч. Контрольной группе белых мышей внутрибрюшинно вводили по 0.5 мл физраствора. Все животные содержались в условиях вивария.

В течение всего срока наблюдения за выживаемостью и общим состоянием животных отмечались

клинические проявления воздействия микроорганизмов и поведенческие реакции мышей. Для определения диссеминации изучаемых микроорганизмов во внутренних органах у всех контрольных и зараженных животных выполняли посев крови и брали отпечатки легких, сердца, печени, селезенки, почек и кишечника на МПА в чашках Петри.

Для оценки приживаемости культуры 22S в модельном опыте с почвой использовали выщелоченный нестерильный чернозем, помещенный в стеклянные сосуды. Предварительно почву просеяли, перебрали, удалили корни и увлажнили до 60% стерильной дистиллированной водой.

В системе “почва–интродуцент–гербицид” использовали 2,4-Д и 2,4,5-Т в концентрациях, равных 100 ПДК, 1000 ПДК и 10000 ПДК (ПДК для почвы у 2,4-Д составляет 0.1 мг/см^3 , а у 2,4,5-Т — 0.15 мг/см^3). Растворы 2,4-Д и 2,4,5-Т вносили в почву за 7–10 дней до внесения бактериальной культуры. Штамм предварительно выращивали на

богатой жидкой среде и вносили в концентрации 3.4×10^7 кл./г почвы.

Контроль (чистая почва) и все варианты опыта проводили в трех повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Грамотрицательные клетки штамма 22S представляли собой подвижные короткие палочки с перитрихальным жгутикованием, размером 0.63×1.05 мкм.

На МПА изолят образовывал красноватые колонии, пигментация которых являлась варьирующим признаком, зависимым от условий культивирования и присутствия сахаров в среде. В УФ-лучах наблюдалась флуоресценция культуры. Оптимальный рост бактерий происходил в аэробных условиях в диапазоне 22–37°C и pH 7–8.

В качестве единственного источника углерода культура использовала мальтозу, маннит, сахарозу, цитрат и глюконат, но не L-арабинозу, лактозу, малонат, фенилаланин и мочевины. Клетки штамма оказались положительными по реакции Фогес–Проскауэра, каталазной и лизиндекарбоксилазной активности, восстанавливали нитрат. В то же время у бактерий не выявили орнитиндекарбоксилазу и аргининдигидролазу, способности к гидролизу желатина, а также отрицательной была проба с метиловым красным.

Для выделенного изолята была определена практически полная последовательность (1400 п.н.) амплификата гена, кодирующего 16S рРНК, которая была депонирована в международную базу данных GenBank под номером KY563745.

Сходство с исследуемой культурой показали бактерии рода *Serratia*, такие как *Serratia marcescens* DSM 30121^T (уровень идентичности 98.5%), *S. marcescens* JCM11315^T (уровень идентичности

98.4%), *S. nematodiphila* DZ0503SBS1^T (уровень идентичности 98.4%), *S. surfactantfaciens* YD25^T (уровень идентичности 98.3%) и *S. ureilytica* NiVa 51^T (уровень идентичности 97.1%) (рис. 2).

Необходимо отметить, что *S. marcescens* DSM 30121^T и *S. marcescens* JCM11315^T ранее считались типовыми штаммами двух подвидов данного вида: *marcescens* и *sakuensis* соответственно. Первоначально на основании данных ДНК–ДНК-гибридизации и факта обнаружения спор в клетках культуры штамм KREDT= DSM 17174^T был описан как подвид *S. marcescens* subsp. *sakuensis* [28]. Однако более поздние исследования показали, что штамм DSM 17174^T не удовлетворял геномным критериям для определения подвида, и наличие спор в его клетках не было подтверждено. Таким образом, на основании исследования спорообразования и геномного анализа был сделан вывод, что *S. marcescens* subsp. *sakuensis* является более поздним гетеротипическим синонимом подвида *S. marcescens* subsp. *marcescens* [29, 30].

С типовым штаммом *S. marcescens* DSM 30121^T исследуемая культура образует кластер с высоким уровнем достоверности — значение бутстреп анализа равно 96 и уровнем идентичности — 98.5%. Последний сопоставим по значению (98.4 и 98.3% соответственно) с уровнями идентичности штамма 22S и типовых штаммов двух других видов *S. nematodiphila* DZ0503SBS1^T и *S. surfactantfaciens* YD25^T.

Суммируя филогенетические и физиологическо-биохимические признаки, штамм 22S мы отнесли к роду *Serratia* и обозначили как штамм *Serratia* sp. 22S.

Поскольку известно, что бактерии рода *Serratia* могут вызывать оппортунистические инфекции у госпитализированных больных, была проведена оценка патогенности клеток штамма 22S на

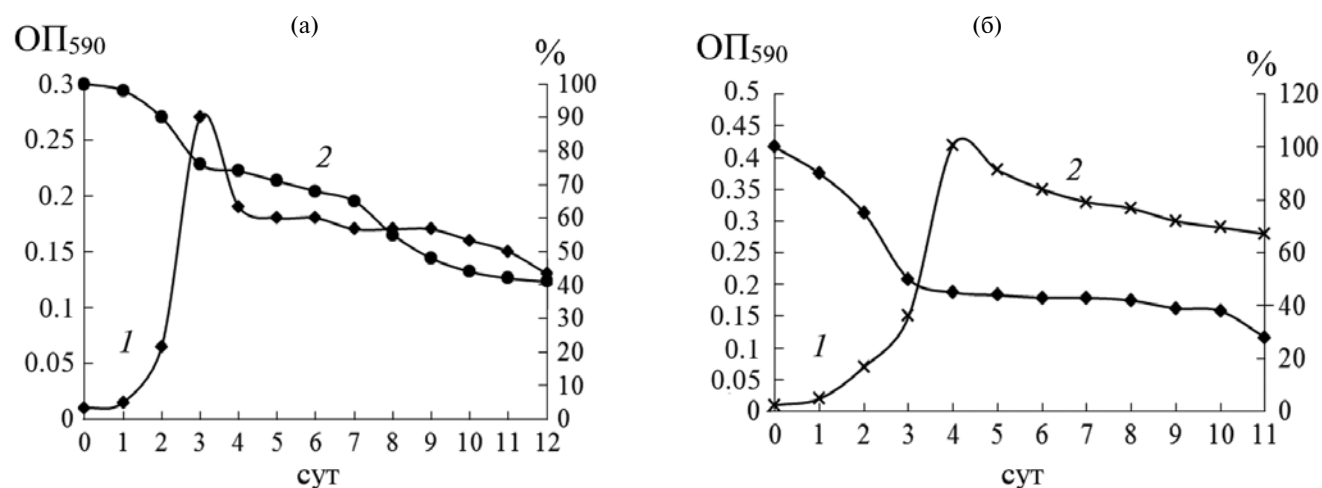


Рис. 3. Зависимость ОП₅₉₀ (I) культуральной жидкости и концентрации 2,4-Д (а, 2) и 2,4,5-Т (б, 2) от времени культивирования *Serratia* sp. 22S в периодической культуре:

основании изучения его вирулентности, токсичности, инфективности и инвазивности.

Опыты на белых мышах показали, что изолят не обладал токсическими свойствами, а средне-вирулентную дозу установить не удалось (т.е. она превышает 10^9 кл./мл). Клинические проявления развития заболевания также не отмечались, а на вскрытии при визуальном осмотре патологических изменений внутренних органов не выявлено. В крови и внутренних органах опытных мышей исследуемого микроорганизма также не обнаружено.

На основании вышеизложенного следует, что изучаемый штамм не является патогенным.

В периодической культуре штамм *Serratia* sp. 22S был способен раздельно утилизировать хлорфеноксиуксусные кислоты в качестве единственного источника углерода и энергии (рис. 3).

При выращивании на 2,4-Д (рис. 3а) значение оптической плотности клеточной суспензии достигало максимальной величины (0.27 ОЕ) на 3 сут культивирования, при этом потребление субстрата составило 24% от исходного. Далее наблюдалось резкое снижение ОП клеточной суспензии и переход культуры в стадию отмирания. Остаточное количество субстрата на 12 сут культивирования составило 42 мг/л.

При использовании 2,4,5-Т максимальное значение ОП наблюдалось на 4 сут культивирования — 0.42, а количество субстрата снижалось за это время до 45 мг/л. К концу культивирования (на 11 сут) количество 2,4,5-Т уменьшалось на 72% от исходного и составило 28 мг/л.

Конверсия 2,4-Д как единственного источника углерода и энергии у бактериальных штаммов исследовалась в различных концентрациях от нескольких мг/л до г/л [18, 31, 32]. В то же время стоит отметить, что штаммов, способных к метаболизму 2,4,5-Т, изолировано значительно меньше. Один из них — *Burkholderia phenoliruptrix* AC1100 — в течение 6 сут утилизировал более 97% 2,4,5-Т в концентрации 1 мг/мл [17]. Другой штамм, *Nocardioideis simplex* 3E, был способен полностью конвертировать 2,4,5-Т в концентрации 0.04 мМ [14]. Около 200 штаммов, изолированных из почв Вьетнама, оказались деструкторами 2,4,5-Т, их способность тестировалась на солевой среде, содержащей это соединение в концентрации 100 мг/л [13].

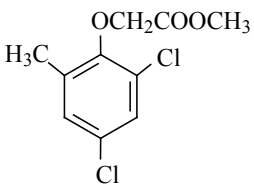
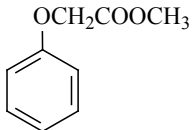
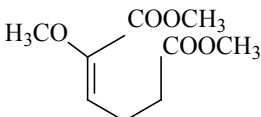
Таким образом, штамм *Serratia* sp. 22S активен в отношении вышеуказанных хлорфеноксиуксусных кислот, причем 2,4,5-Т по сравнению с 2,4-Д являлась более предпочтительным субстратом для данной культуры, несмотря на большее количество атомов хлора в молекуле.

Следует отметить, что штамм 22S также раздельно утилизировал фенол и 2,4-дихлорфенол в концентрации 100 мг/л, что было показано ранее в работе [33].

В среде культивирования штамма *Serratia* sp. 22S было определено присутствие трех соединений, вероятно являющихся интермедиатами пути деградации хлорфеноксиуксусных кислот (табл. 1).

Одной из ключевых стадий аэробной деградации хлорароматических соединений, в отличие от их незамещенных аналогов, является элиминация атома хлора из молекулы субстрата. По классическому пути деградации 2,4-Д, гены

Таблица 1. Масс-спектрометрический анализ метаболитов, образующихся в результате конверсии 2,4,5-Т штаммом *Serratia* sp. 22S

Интермедиат	Основные пики в масс-спектре m/z , %	Наименование
	M^+ 264 (30), 233 (30), 19 (100), 175 (25), 147 (30), 87 (15), 59 (20)	2,4-Дихлор-6-метилфеноксиуксусная кислота, метиловый эфир
	M^+ 166 (50), 107 (120), 77 (80)	Феноксиуксусная кислота, метиловый эфир
	M^+ 45 (100), 55 (20), 59 (8), 87 (5), 115 (6), 129 (20), 125 (2), 188 (0.1)	2-Гидрокси-2-гексендионовая кислота, метиловый эфир

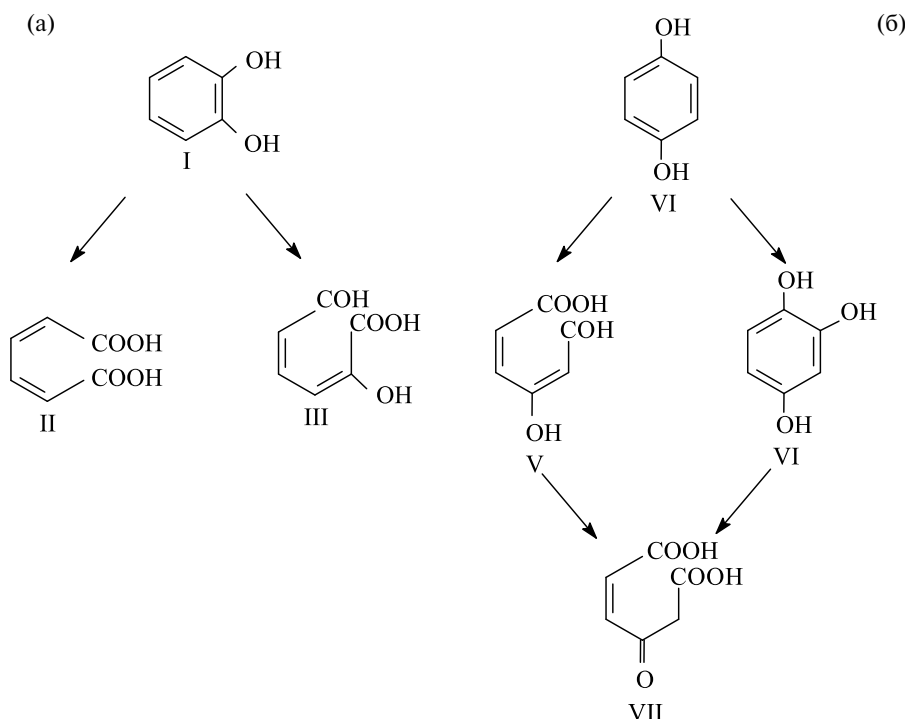


Рис. 4. Основные пути аэробного расщепления ароматического кольца катехола (а) и гидрохинона (б) [35, 36]: I — катехол, II — муконовая кислота, III — 2-гидроксимуконовый полуальдегид, IV — гидрохинон, V — 4-гидроксимуконовый полуальдегид, VI — гидроксигидрохинон, VII — 4-малеилуксусная кислота.

которого локализируются на плазмиде pJP4 штамма *C. pinatubonensis* JMP134, 2,4-Д через 2,4-дихлорфенол конвертируется до 3,5-дихлоркатехола, а затем происходит орто-разрыв его ароматического кольца с последовательной элиминацией двух атомов хлора [4]. Такой путь, когда хлор удаляется после раскрытия ароматического кольца, свойственен подавляющему большинству штаммов, выполняющих конверсию 2,4-Д.

Однако устранение галогена может происходить и перед разрывом ароматического кольца, что особенно характерно для конверсии полихлорированного субстрата. Аэробное разложение 2,4,5-Т штаммом *B. phenoliruptrix* AC1100 инициируется удалением остатка уксусной кислоты с образованием 2,4,5-трихлорфенола (**2,4,5-ТХФ**). Далее происходит замена первых двух атомов хлора на гидроксильные группы, а последний третий атом хлора элиминируется во время реакции восстановительного дехлорирования, в результате чего происходит образование 2-гидрокси-1,4-бензохинона [11, 12].

Штамм *Nocardiodes simplex* 3E помимо классической деградации 2,4,5-Т через образование 2,4,5-ТХФ, вероятно, имеет альтернативный вариант превращения первоначального субстрата, так как среди метаболитов пути были обнаружены 4-хлор- (**4-ХФУК**) и 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислоты [14].

В пути деградации 2,4-Д у штамма *Azotobacter chroococcum* MSB-1 происходит трансформация первоначального субстрата до 4-ХФУК с элиминацией молекулы хлора и заменой ее на водород [34].

Необходимо отметить, что исследованные ранее штаммы *Raoultella planticola* 33-4ch, *Raoultella planticola* 36D, *Raoultella planticola* 36T и *Cellulosimicrobium* sp. NPZ-121 также осуществляли восстановительное дехлорирование 2,4,5-Т с образованием 2,4-Д [35], 4-ХФУК и далее феноксиуксусной кислоты (ФУК) [25, 35].

Присутствие среди метаболитов катаболизма 2,4,5-Т у штамма 22S метильных производных 2,4-Д, а также ФУК, свидетельствовало о том, что культура осуществляла полное восстановительное дехлорирование субстрата перед разрывом ароматического кольца.

Второй ключевой стадией конверсии (хлор) ароматических соединений является расщепление ароматического кольца. Сначала в молекулу субстрата вводится один или два атома кислорода, в результате чего происходит формирование дигидроксильного бензольного кольца с образованием центрального метаболита пути — катехола, либо гидрохинона или их производных. Далее происходит непосредственное раскрытие ароматического кольца, которое катализируется диоксигеназами. Когда субстратом реакции является катехол, расщепление может происходить как между

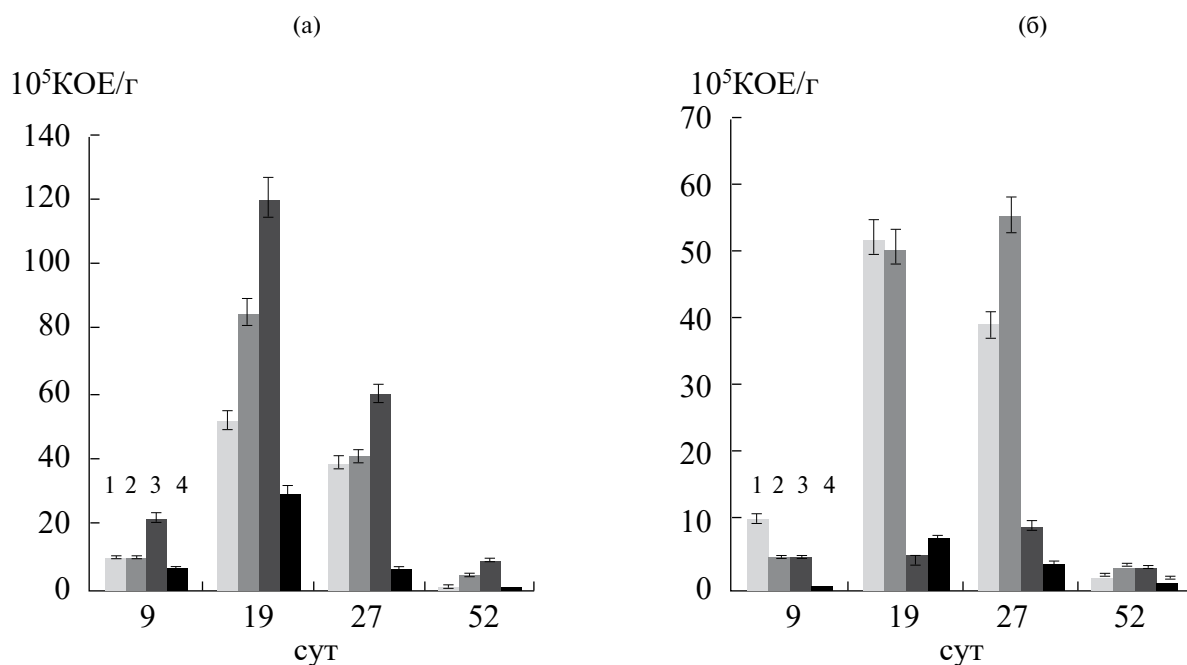


Рис. 5. Численность клеток штамма *Serratia* sp. 22S (KOE) в чистой (1) и загрязненной 2,4,5-Т (а) и 2,4-Д (б) почве при 100 ПДК (2), 1000 ПДК (3) и 10000 ПДК (4).

гидроксильными группами (*орто*-расщепление), так и по соседству с одним из гидроксильных групп (*мета*-расщепление, рис. 4) [36, 37].

Обнаруженное в среде культивирования штамма 22S соединение — 2-гидрокси-2-гексендионовая кислота, вероятно, является продуктом реакции расщепления ароматического кольца. Наличие гидроксильной группы при втором атоме углерода рядом с одной из карбоксильных групп интермедиата свидетельствовало о происходящем метараскрытии ароматического кольца катехола как вероятного центрального метаболита пути (рис. 4). При классическом *мета*-расщеплении катехола образуется 2-гидроксимуконный полуальдегид, альдегидная группа которого затем может подвергнуться окислению с образованием соответствующей кислоты, как это видно в пути расщепления гидрохинона.

Необходимо отметить, что классическим путем деградации хлорароматических соединений у бактерий считается модифицированный *орто*-путь расщепления хлоркатехола, а *мета*-путь больше характерен для метаболизма метилароматических углеводородов [36].

Ранее в культуральных средах штаммов *R. planticola* 33–4ch, *R. planticola* 36D, *R. planticola* 36T, а также *Cellulosimicrobium* sp. NPZ-121 было обнаружено соединение 2-кето-3-метилмуконный полуальдегид, которое также является производным 2-гидроксимуконного полуальдегида [25, 35]. На основании сходных промежуточных метаболитов можно предположить существование единого

для изучаемого штамма и вышеперечисленных де-структоров пути катаболизма хлорфеноксиуксусных кислот посредством полного восстановительного дехлорирования субстрата с последующим мета-разрывом ароматического кольца катехола.

Для проверки предположения о возможной роли катехола в качестве центрального метаболита пути деградации хлорфеноксиуксусных кислот у штамма *Serratia* sp. 22S был проведен опыт с бактериальными клетками, выращенными отдельно на 2,4-Д или 2,4,5-Т как единственных источниках углерода и энергии.

Инкубация интактных клеток в фосфатно-натриевом буфере, содержащем 100 мг/л катехола, с последующей спектрофотометрией показала, что по сравнению с контролем произошло смещение основного пика поглощения катехола (274.0 нм) в длинноволновую область спектра и появление нового пика при 375.0 нм. При этом среда инкубации окрашивалась в желто-оранжевый цвет, что указывало на формирование 2-гидроксимуконного полуальдегида, который образуется из катехола при мета-разрыве ароматического кольца. Следует отметить, что при формировании муконной кислоты, продукта орто-разрыва ароматического кольца катехола, наблюдалось бы смещение максимума поглощения в коротковолновый участок спектра. Отрицательный результат реакции Ротера, которая детектирует превращение муконной кислоты в β -кетоадипат, также показал отсутствие активности ферментов β -кетоадипатного пути.

Полученные результаты подтвердили предположение о том, что деградация 2,4-Д и 2,4,5-Т у штамма 22S идет единым путем через образование катехола с последующим мета-расщеплением его ароматического кольца.

Традиционное изучение бактерий-деструкторов на лабораторных питательных средах, важное для понимания различных аспектов их биологии, не объясняет поведения данных микроорганизмов в почвенных условиях. В связи с этим необходимым этапом исследований является изучение потенциальных интродуцентов в модельных экосистемах, позволяющее оценить их адаптенность и приживаемость в составе почвенного микробиоценоза.

В модельных системах “почва–интродуцент” и “почва–интродуцент–гербицид” была изучена приживаемость штамма 22S в нестерильной почве, а также адаптенность культуры к высоким концентрациям гербицидов 2,4-Д и 2,4,5-Т (рис. 5). Наличие маркера (способность к конверсии гербицидов) обеспечило возможность контроля за их развитием в почве путем высева почвенных суспензий на бедную агаризованную среду М9 с 2,4-Д/2,4,5-Т в качестве единственного источника энергии.

Анализ плотности популяции клеток штамма 22S в модельной системе “почва–интродуцент” показал, что численность штамма поддерживалась на достаточно высоком уровне — порядка 10^5 кл./г почвы на протяжении всего опыта (52 сут). При этом в начале опыта, по-видимому, происходила адаптация культуры к новым условиям, а после 9 сут титр штамма увеличился почти в 5 раз, а затем начал снижаться и к 27 сут стабилизировался на уровне $1.5–1.8 \times 10^5$ кл./г почвы и сохранялся таким до конца эксперимента.

В модельной системе “почва–интродуцент–гербицид” при содержании 2,4-Д в 100 ПДК с 9 по 37 сут наблюдался рост титра клеток более чем в 12 раз, затем происходило его снижение до уровня 3×10^5 кл./г почвы. В почвенных сосудах с концентрацией 2,4-Д в 1000 и 10000 ПДК не происходило увеличение титра клеток штамма, вероятно, такие высокие концентрации гербицида подавляли его рост.

При исследовании способности к адаптации и приживаемости штамма 22S при высоких концентрациях 2,4,5-Т наилучшие результаты наблюдались при использовании более высокой, чем для 2,4-Д, концентрации гербицида — 1000 ПДК, при этом титр штамма на 19 сут вырос до значения 1.3×10^7 . Далее происходило снижение и стабилизация биомассы культуры до 9×10^5 кл./г почвы.

Проведенные эксперименты выявили хорошую адаптенность и приживаемость штамма 22S

в почве, причем содержание хлорфеноксиуксусных кислот до определенной концентрации (2,4-Д не выше 100 ПДК, а 2,4,5-Т не выше 1000 ПДК) оказывали положительное влияние на динамику роста культуры, вероятно в результате их селективирующего воздействия.

Полученные результаты показали, что природный штамм *Serratia* sp. 22S способен использовать в своем метаболизме (хлор)ароматические соединения, включая хлорфеноксиуксусные кислоты. На основании идентифицированных промежуточных метаболитов предложен единый путь конверсии хлорфеноксиуксусных кислот у штамма 22S посредством полного восстановительного дехлорирования субстрата с последующим мета-разрывом ароматического кольца катехола. Эксперимент с интактными клетками подтвердил наличие активности фермента мета-расщепления ароматического кольца катехола. Была показана безопасность применения изучаемой культуры для человека и животных, а также ее высокая адаптенность и приживаемость в почве. Следовательно, штамм *Serratia* sp. 22S может быть перспективным для применения как агента ремедиации территорий, загрязненных хлорфеноксиуксусными кислотами.

При проведении исследований использовали оборудование ЦКП “Агидель” УФИЦ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России по теме № 220131100163-4 “Межвидовые взаимодействия в микробных сообществах и растительно-микробных ассоциациях естественных и техногенных экосистем (генетические, биохимические и биотехнологические аспекты)”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. Исследования на лабораторных мышах проводили в строгом соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей (European Treaty Series, № 123).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nguyen T. L. A., Dao A. T. N., Dang H. T. C., Koekkoek J., Brouwer A. de Boer T. E., van Spanning R. J. M.* // *Biodegradation*. 2022. V. 33. P. 301–316. <https://doi.org/10.1007/s10532-022-09982-1>
2. *Donald D. B., Cessna A. J., Sverko E., Glozier N. E.* // *Environ. Health Perspect.* 2007. V. 115. № 8. P. 1183–1191. <https://doi.org/10.1289/ehp.9435>
3. *Watanabe K.* // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001. V. 12. № 3. P. 237–241. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(00\)00205-6](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(00)00205-6)

4. Don R. H., Weightman A. J., Knackmuss H.J., Timmis K. N. // J. Bacteriol. 1985. V. 161. P. 85–90.
5. Fulthorpe R. R., McGowan C., Maltseva O. V., Holben W. E., Tiedje J. M. // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. P. 3274–3281.
6. McGowan C., Fulthorpe R., Wright A., Tiedje J. M. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 10. P. 4089–4092.
7. Cavalca L., Hartmann A., Rouard N., Soulas G. // FEMS Microb. Ecol. 1999. V. 29. P. 45–58.
8. Vallaeys T., Courde L., McGowan C., Wright A., Fulthorpe R. R. // FEMS Microb. Ecol. 1999. V. 28. P. 373–382.
9. Sakai Y., Ogawa N., Fujii T., Sugahara K., Miyashita K., Hasebe A. // Microbes Environ. 2007. V. 22. P. 145–156.
10. Baelum J., Jacobsen C. S., Holben W. E. // Syst. Appl. Microbiol. 2010. V. 33. P. 67–70.
11. Daubaras D. L., Saido K., Chakrabarty A. M. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 11. P. 4276–4279.
12. Zaborina O., Daubaras D. L., Zago A., Xun L., Saido K., Klem T., Nikolic D., Chakrabarty A. M. // J. Bacteriol. 1998. V. 180. № 17. P. 4667–4675.
13. Huong N. L., Itoh K., Suyama K. // Microbes Environ. 2007. V. 22. P. 243–256.
14. Golovleva L. A., Pertsova R. N., Evtushenko L. I., Baskunov B. P. // Biodegradation. 1990. V. 1. № 4. P. 263–271.
15. Rice J. F., Menn F.-M., Hay A. G., Sanseverino J., Sayler G. S. // Biodegradation. 2005. V. 16. P. 501–512. <https://doi.org/10.1007/s10532-004-6186-8>
16. Hayashi S., Sano T., Suyama K., Itoh K. // Microbiol. Res. 2016. V. 188–189. P. 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.014>
17. Kilbane J. J., Chatterjee D. K., Karns J. S., Kellogg S. T., Chakrabarty A. M. // Appl. Environ. Microbiol. 1982. V. 44. № 1. P. 72–78.
18. Соляникова И. П., Протопопова Я. Ю., Травкин В. М., Головлева Л. А. // Биохимия. 1996. Т. 61. № 4. С. 635–642.
19. Han L., Zhao D., Li C. // Braz. J. Microbiol. 2015. V. 46. № 2. P. 433–441. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140211>
20. Manual of Methods for General Bacteriology. / Ed. P. Gerhardt. Washington: American Society for Microbiology, 1981. 536 p.
21. Birnboim H. C., Doly J. // Nucleic Acids Res. 1979. V. 7. № 6. P. 1513–1523.
22. Lane D. J. 16S/23S Sequencing // Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. / Eds. E. Stackebrandt and M. Goodfellow. Chichester: John Wiley & Sons, 1991. P. 115–175.
23. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
24. Методы определения микроколичеств пестицидов. / Ред. Клисенко М. А. М.: Медицина, 1984. 256 с.
25. Zharikova N. V., Iasakov T. R., Zhurenko E. I., Korobov V. V., Markusheva T. V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. Т. 57. № 3. P. 335–343. <https://doi.org/10.1134/S0003683821030157>
26. Миронов А. Д., Крестьянинов В. Ю., Корженевич В. И. Евтушенко И. Я., Барковский А. Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 1991. Т. 27. № 4. С. 571–576.
27. Головлева Л. А., Перцова Р. Н. // Доклады Академии наук СССР. 1990. Т. 314. № 4. С. 981–983.
28. Ajithkumar B., Ajithkumar V. P., Iriye R., Doi Y., Sakai T. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. V. 53. P. 253–258. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02158-0>
29. Doijad. S., Chakraborty T. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2019. V. 69. P. 3924–3926.
30. Cho G. S., Stein M., Brinks E., Rathje J., Lee W., Suh S. H., Franz C. M.A.P. // Syst. Appl. Microbiol. 2020. V. 43. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126055>
31. Zabaloy M. C., Gómez M. A. // Argentina Annals of Microbiology. 2014. V. 64. P. 969–974. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0731-9>
32. 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. <https://doi.org/10.7868/S0042132417050076>
33. Коробов В. В., Маркушева Т. В., Кусова И. В., Журенко Е. Ю., Галкин Е. Г., Жарикова Н. В., Гафиятова Л. Р. // Биотехнология. 2006. № 2. С. 63–65.
34. Balajee S., Mahadevan A. // Xenobiotica. 1990. V. 20. № 6. P. 607–617. <https://doi.org/10.3109/00498259009046876>
35. Korobov V. V., Zhurenko E. Y., Galkin E. G., Zharikova N. V., Iasakov T. R., Starikov S. N., Sagitova A. I., Markusheva T. V. // Microbiology. 2018. Т. 87. № 1. С. 147–150. <https://doi.org/10.1134/S0026261718010101>
36. Harwood C. S., Parals R. E. // Ann. Rev. Microbiol. 1996. V. 50. P. 553–590. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.553>
37. Enguita F. J., Leitão A. L. // Biomed Res. Int. 2013. V. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/542168>

Metabolic Potential of *Serratia* sp. 22S for Chlorphenoxyacetic Acids Conversion

N. V. Zharikova^{a, *}, E. I. Zhurenko^a, V. V. Korobov^a, L. G. Anisimova^b, and G. E. Aktuganov^a

^aUfa Institute of Biology, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

^bResearch Technological Institute of Herbicides and Plant Growth Regulators with Pilot Production Academy of Sciences of Republic of Bashkortostan, Ufa, 450029 Russia

*e-mail: puzzle111@yandex.ru

A bacterial strain 22S belonging to the genus *Serratia* was isolated from soil samples contaminated with chemical production wastes. The strain was found to be non-pathogenic based on the study of its virulence, toxicity, infectivity and invasiveness. In batch culture, *Serratia* sp. 22S was able to separately utilize chlorophenoxyacetic acids (100 mg/L) as the sole source of carbon and energy. The catabolism pathway for chlorophenoxyacetic acids were suggested through complete reductive dechlorination of the substrate followed by *meta*-cleavage of the aromatic ring of catechol based on the compounds found in the culture medium (2,4-dichloro-6-methylphenoxyacetic, phenoxyacetic, and 2-hydroxy-2-hexenedioic acids). Intact cells experiments confirmed this assumption. In model systems, good adaptability and survival of the 22S strain in the soil was revealed, and the content of chlorophenoxyacetic acids up to a certain concentrations had a positive effect on the growth of the strain, most likely due to its selective effect.

Keywords: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, chlorophenoxy herbicides, 2-hydroxymuconic semialdehyde, *Serratia*