



УДК 579.57.04

РАЗРАБОТКА СХЕМЫ УСИЛЕНИЯ ДЕСТРУКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА АБОРИГЕННОГО ШТАММА *PSEUDOMONAS PUTIDA* SU12, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ ФЕНОЛЬНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ



Н. А. Ильина, О. Ю. Ксенофонтова, С. Э. Третьякова, Е. И. Тихомирова

Ильина Наталья Анатольевна, доктор биологических наук, профессор, проректор по инновационному развитию, Ульяновский государственный университет, n-ilina@mail.ru

Ксенофонтова Оксана Юрьевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии и физиологии растений, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, ksenofontova64@mail.ru

Третьякова Светлана Эдуардовна, кандидат биологических наук, заведующий испытательной лабораторией ИЛЦ «ЭкоОС», Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А., tretse1@mail.ru

Тихомирова Елена Ивановна, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Экология», Саратовский государственный университет имени Гагарина Ю. А., tichomirova_ei@mail.ru

В статье представлена разработка методических подходов усиления деструктивного потенциала аборигенного штамма *Pseudomonas putida* SU12, выделенного из проб почвы, загрязненной фенольными соединениями. Описана схема циклического селективного метода поэтапного увеличения концентрации фенола в жидкофазной среде в сочетании с промежуточным этапом накопительной культуры. Авторами предложена методика увеличения показателей деструкции фенола путем повышения его концентрации в элективных средах дискретно цикл за циклом. Если в результате завершения цикла культивирования деструктивная активность отсутствовала или была меньше 50%, но клетки оставались жизнеспособными, то в следующем цикле концентрацию фенола не увеличивали. При условии активности деструкции от 50 до 80% концентрацию фенола повышали не более, чем на 25%. Если степень деструкции фенола составляла 85% и более от стартовой концентрации, то концентрацию фенола в последующем цикле увеличивали на 50%. В результате селекционной работы штамм *P. putida* SU12 приобрел способность снижать концентрацию фенола в жидкой среде на 92,6% от стартовой концентрации 340 мг/л за 7 дней. Разработанная схема процесса селекционирования штамма *P. putida* SU12 позволила значительно усилить его природный деструктивный потенциал. Исследуемый штамм-деструктор фенола не проявляет факторов патогенности и является аборигенным для Ульяновской области. Совокупность этих признаков дает возможность позиционировать штамм *P. putida* SU12 как эффективный штамм-биодеструктор фенола с высоким биотехнологическим потенциалом для дальнейшего конструирования комплексного биопрепарата.

Ключевые слова: штамм-деструктор, деструкция фенола, селективный метод, биоремедиация, загрязнение почв.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-469-472>

Введение

На сегодняшний день фенол является одним из наиболее распространенных загрязнителей, который непрерывно поступает в окружающую среду и накапливается в ней [1]. В связи с этим разработка селекционных методик адаптации бактерий-деструкторов к высоким концентрациям фенола представляет собой важную часть исследований при создании биопрепаратов [2, 3].

Ранее из проб почвы в Ульяновской области, хронически загрязненной фенолом, авторами был выделен бактериальный штамм *P. putida* SU12, способный использовать фенол в качестве единственного источника углерода и энергии и не проявляющий факторов патогенности; была проведена его идентификация, а также исследована его способность к деструкции фенола в жидкофазных средах [4]. Стандартные приемы селекции по увеличению деструктивной активности штамма *P. putida* SU12 на предыдущих этапах работ заключались в пересевах культуры с жидкой на плотную элективную среду с пошаговым увеличением концентрации фенола [4]. В результате этих действий резистентность к фенолу у штамма *P. putida* SU12 на минеральной плотной среде достигла концентрации 270 мг/л фенола, что эквивалентно 2000 ПНЕС (ПНЕС фенола составляет 0,136 мг/кг почвы), или условных доз (у.д.). Однако в жидкой элективной среде степень деструкции фенола была не слишком велика (26%) и составляла максимально около 70 мг/л (500 ПНЕС, или 500 у.д.) за 9 суток. Дальнейшее увеличение концентрации фенола в жидкой среде действовало угнетающе как на рост данного штамма, так и на его деструктивную активность.

Целью работы являлась разработка методики усиления деструктивного потенциала аборигенного штамма *Pseudomonas putida* SU12 с применением циклического селективного метода поэтапного увеличения концентрации фенола в жидкофазной среде в сочетании с промежуточным этапом накопительной культуры.



Материалы и методы

В работе использовали аборигенный штамм *P. putida* SU12, растущий на агаризованной элективной среде с содержанием фенола в количестве 270 мг/л, полученный с использованием стандартной методики пересева на плотную элективную среду с пошаговым увеличением концентрации фенола [4]. Селекция штамма по стандартной методике заключалась в последовательных пассажах культуры на агаризованных средах М9 с постепенно увеличивающимися концентрациями фенола. Агаризованную среду М9 получали добавлением в базовый состав 2 мас.% бактериального агара, стерилизовали в автоклаве при 1 атм. в течение 20 мин, после чего вносили стерильный раствор фенола [5]. Максимальная концентрация фенола в среде, при которой клетки сохраняли жизнеспособность, соответствовала 2000 PNEC (270 мг/л).

В сравнительном аспекте использовали этот же штамм *P. putida* SU12, селекционированный по разработанной нами схеме усиления деструктивного потенциала.

Концентрацию бактериальных клеток в культуральной жидкости измеряли на спектрофотометре СФ-102 при длине волны $\lambda = 630$ нм, в кювете 10 мм (ОП₆₃₀) и определяли по калибровочному графику, выражающему зависимость оптической плотности от количества клеток, определенного по стандарту мутности БАК-10 (ООО «ОРМЕТ»).

Определение концентрации фенольных соединений проводили на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies (GH 7820A, MS 5975). Пробоподготовку и экстракцию осуществляли в соответствии со стандартными методиками [6]. Степень биodeградации фенола рассчитывали как отношение разности между начальным и конечным содержанием углеводорода в пробе к его начальному содержанию и выражали в процентах.

Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica 10 при доверительной вероятности $P = 0,95$. Повторность всех экспериментов трехкратная.

Результаты и их обсуждение

В процессе работы с аборигенным штаммом *P. putida* SU12, выделенным из хронически загрязненной фенолом почвы в Ульяновской области, появилась необходимость в усилении его деструктивного потенциала для последующего использования при конструировании биопрепарата. Нами был разработан селективный метод поэтапного увеличения концентрации фенола в жидкофазной среде в сочетании с промежуточным этапом накопительной культуры по схеме, представленной на рис. 1.

Отдельные колонии культуры деструктора, растущие на агаризованной элективной среде с содержанием фенола в количестве 270 мг/л, петлей засевают в пробирку с 5–10 мл полупитательной

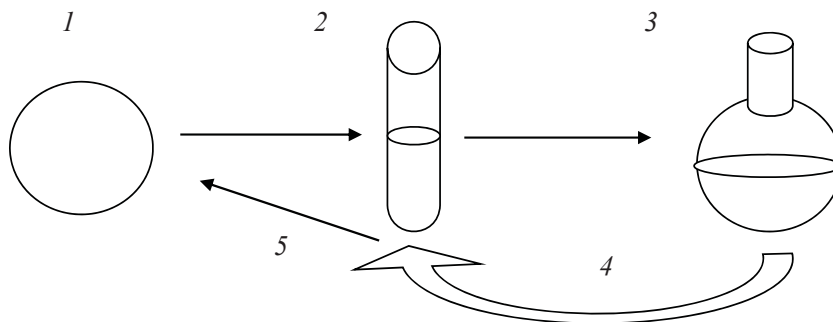


Рис. 1. Схема циклического селективного метода с промежуточным этапом накопительной культуры:

1 – пересев изолированной колонии с плотной элективной среды с фенолом в пробирку с жидкой полупитательной средой без фенола;

2 – культивирование в течение суток на круговой качалке при 170 об/мин при температуре 28–30°C. Перенос суточной культуры (инокулят) в колбу с жидкой элективной средой с фенолом;

3 – стартовая концентрация клеток 10^8 кл/мл. Концентрация фенола подбирается эмпирически и зависит от деструктивного потенциала популяции предшествующего цикла селекции. Культивирование в течение 7 суток на круговой качалке при 170 об/мин при температуре 28–30°C, определение остаточного содержания фенола;

4 – пересев на полупитательную среду без фенола, получение накопительной культуры;

5 – пассаж на плотную элективную среду М9, содержащую фенол



среды (мясопептонный бульон в разведении 1:6) без фенола (см. рис. 1, шаг 1) и помещали на роторную качалку при температуре 28–30°C при скорости вращения 220 об/мин на одни сутки (см. рис. 1, шаг 2). Выросшая накопительная культура служила инокулятом для засева в 200 мл жидкой фенолсодержащей селективной среды в колбу Эрленмейера. Инокулят с концентрацией 10^8 клеток/мл выращивали в течение 7 сут. на роторной качалке, после чего определяли концентрацию клеток и остаточного фенола в культуральной жидкости (см. рис. 1, шаг 3). Затем цикл селекции повторяли, начиная его со стадии роста в пробирке (см. рис. 1, шаг 4).

В том случае, если культура в предыдущем цикле проявила способность к росту на соответствующей концентрации фенола, и при этом происходил процесс деструкции фенола, в колбе последующего цикла в жидкой селективной среде концентрацию фенола увеличивали. Однако, если деструктивная активность отсутствовала или была меньше 50%, но клетки оставались жизнеспособными, то в колбу следующего цикла вносили фенол в такой же концентрации или ниже. При условии активности деструкции от 50 до 80% концентрацию фенола увеличивали не более, чем на 25%. Если степень деструкции фенола составляла 85% и более от стартовой концентрации, то концентрацию фенола в последующем цикле увеличивали на 50%. Кроме того, из каждой накопительной культуры делали пассаж на плотную селективную среду, содержание фенола в которой также соответственно увеличивалось (см. рис. 1, шаг 5). Это дополнительно повышало резистентность культуры, и создавался ресурс для ее воспроизведения с уже достигнутым уровнем деструктивного потенциала.

Применение циклического селективного метода поэтапного увеличения концентрации фенола в жидкофазной среде в сочетании с промежуточным этапом накопительной культуры по разработанной схеме позволило нам получить в процессе работы популяцию клеток штамма *P. putida* SU12 с повышенным фенол-деструктивным потенциалом. Прием разового пересева на полупитательную среду давал возможность культуре увеличить численность клеток, закрепив генетически значимый признак в данной популяции. Отсутствие фенола в полупитательной среде было обосновано необходимостью исключить внесение неизвестного дополнительного количества фенола, оставшегося в составе накопительной культуры, к известной стартовой концентрации его в составе жидкой селективной среды следующего цикла селекции. При этом такое кратковременное отсутствие лимитирующего компонента на активности популяции не отражалось.

Для исходной культуры деструктора лимитирующим было содержание фенола в количестве 270 мг/л (2000 PNEC), поэтому цикл селекции начинали с концентрации фенола равной 70 мг/л (500 PNEC), и увеличивали в последующих циклах согласно разработанной методике. В результате такой селекционной работы повысилась резистентность штамма *P. putida* SU12 к фенолу до 340 мг/л. Эту концентрацию использовали в качестве стартовой для оценки его деструктивной активности.

Далее были проведены исследования по сравнению степени деструкции фенола вариантами штамма *P. putida* SU12, селекционированного по стандартной методике и разработанной схеме усиления деструктивного потенциала; результаты представлены на рис. 2. Установлено, что аборигенный штамм *P. putida* SU12, селекционированный по стандартной методике, при стартовой концентрации фенола 270 мг/л снижал концентрацию в среде на 26% в течение 9 сут. (см. рис. 2, 1). Использование селекции штамма по разработанной схеме с промежуточным этапом накопительной культуры позволило увеличить степень деструкции фенола до 92% за 7 сут. (см. рис. 2, 2) при стартовой концентрации 340 мг/л.

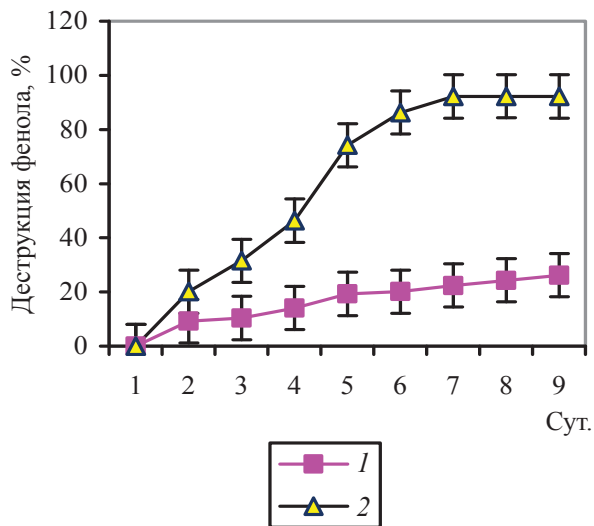


Рис. 2. Деструктивная активность штамма *Pseudomonas putida* SU12 в жидкой селективной среде с фенолом, селекционированного по методике: 1 – стандартной, 2 – разработанной

Заключение

Таким образом, предложенная селекционная схема с промежуточным этапом накопительной культуры позволила не только увеличить де-



структивный потенциал штамма *P. putida* SU12 и стартовую концентрацию фенола в среде до 340 мг/л, но и сократить время его деструкции с 9 до 7 суток.

Поскольку данный штамм является аборигенным для Ульяновской области, не проявляет факторов патогенности и является биодеструктором фенола с высоким биотехнологическим потенциалом, это дает возможность рекомендовать его для дальнейшего использования в качестве биологического компонента в комплексном био-препарате.

Список литературы

1. Горячева В. Н., Ратуев Е. А., Елисеева Е. А., Хаустов В. В., Карнюшкин А. И. Обеспечение экологической безопасности при использовании фенолов в различных отраслях промышленности // Изв. Юго-Запад. гос. ун-та. Сер. Техника и технологии. 2018. Т. 8, № 2 (27). С. 129–137.
2. Соколова И. В., Кочеткова Е. А., Никонорова С. П. Выделение, идентификация и подбор условий культивирования микроорганизмов-деструкторов фенольных загрязнений производственных сточных вод // Науч. тр. Кубан. гос. технол. ун-та. 2017. № 7. С. 26–33.
3. Макаренко А. А. Биосенсоры для детекции сульфороароматических и фенольных соединений на основе бактерий родов *Comamonas* и *Pseudomonas* – деструкторов *p*-толуолсульфата и фенола. Саратов, 2007. 144 с.
4. Ильина Н. А., Андропова Т. В., Казакова Н. А. Выделение штаммов-деструкторов фенольных соединений из хронически загрязненных почв и при экспериментальном загрязнении в лабораторных условиях // Экологические проблемы промышленных городов : сб. науч. тр. по материалам 8-й междунар. науч.-практ. конф. Саратов : СГТУ, 2017. С. 253–256.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Д. Молекулярное клонирование. М. : Мир, 1984. 477 с.
6. МУК 4.1.1062-01 Методические указания. Хромато-масс-спектрометрическое определение труднолетучих органических веществ в почве и отходах производства и потребления. М., 2001.

Developing the Algorithm of Increasing the Destructive Potential of *Pseudomonas putida* SU12 Native Strain Extracted From Phenol-Contaminated Soils

N. A. Ilyina, O. Yu. Ksenofontova,
S. E. Tretyakova, E. I. Tikhomirova

Natalya A. Ilyina, <https://orcid.org/0000-0002-3724-4661>, Ulyanovsk State University, 42, Leo Tolstoy Str., Ulyanovsk, 432017, Russia, n-ilina@mail.ru

Oksana Yu. Ksenofontova, <https://orcid.org/0000-0003-1833-1038>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, ksenofontova64@mail.ru

Svetlana E. Tretyakova, <https://orcid.org/0000-0001-7576-7212>, Yuri Gagarin State Technical University, 77, Politekhnicheskaya Str., Saratov, 410054, Russia, tretse1@mail.ru

Elena I. Tikhomirova, <https://orcid.org/0000-0001-6030-7344>, Yuri Gagarin State Technical University, 77, Politekhnicheskaya Str., Saratov, 410054, Russia, tikhomirova_ei@mail.ru

The article presents the development of methodological approaches to increasing destructive potential of *Pseudomonas putida* SU12 native strain extracted from phenol-contaminated soils. The cyclic selective method on gradual increase of phenol concentration in optoelectronics environment in combination with intermediate stage of accumulative culture is described. The authors proposed a discrete, stepwise increase in the concentration of phenol in elective media depending on degree of its destruction. If, following a completed cultivation cycle, the destructive activity was absent or lower than 50%, but the cells remained viable, then in the next cycle, we were did not increase the phenol concentration. If the degree of phenol destruction was equal or over 85% of the starting concentration, then we increased the phenol concentration in the subsequent cycle by 50%. Provided destruction rate 50 to 80%, we were by 25% or less. As a result of such stepwise routine, *P. putida* SU12 strain was able to reduce phenol concentration in a liquid medium over a time span of 7 days by 92.6% of the starting concentration of 340 mg/l. The developed scheme of the *P. putida* SU12 strain selection process allowed significant strengthening of its natural destructive potential and its consolidation in its population. The studied strain of the phenol destructor showed no factors of pathogenesis and is native to the Ulyanovsk region. The combination of these features gives the possibility to position *P. putida* SU12 strain as an effective biological destructor of phenol with high biotechnological potential for developing complex biological preparation.

Key words: bioremediation, strain-destructor, *Pseudomonas putida*, phenol destruction, bioremediation, soil contamination.

Образец для цитирования:

Ильина Н. А., Ксенофонтова О. Ю., Третьякова С. Э., Тихомирова Е. И. Разработка схемы усиления деструктивного потенциала аборигенного штамма *Pseudomonas putida* SU12, выделенного из почв, загрязненных фенольными соединениями // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 469–472. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-469-472>

Cite this article as:

Ilyina N. A., Ksenofontova O. Yu., Tretyakova S. E., Tikhomirova E. I. Developing the Algorithm of Increasing the Destructive Potential of *Pseudomonas putida* SU12 Native Strain Extracted From Phenol-Contaminated Soils. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 469–472 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-469-472>