

**ЖАРИКОВА Н.В., КОРОБОВ В.В., АНИСИМОВА Л.Г., ЯСАКОВ Т.Р.,  
ЖУРЕНКО Е.Ю., МАРКУШЕВА Т.В.**

*Учреждение РАН Институт биологии УНЦ РАН,*

*Россия, 450054, Уфа, ул. Проспект Октября, 61, e-mail: tvmark@anrb.ru*

## **ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КУЛЬТУРЫ *GLUCONOBACTER OXYDANS* 2Т В ОБЛАСТИ РЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ ОТ ГЕРБИЦИДА 2,4,5-Т**

2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота (2,4,5-Т) — синтетическое соединение, используемое в качестве гербицида для борьбы с древесной и кустарниковой растительностью, обработки газонов, лесных угодий, пастбищ. Вместе с тем в ряде работ было показано, что 2,4,5-Т способна оказывать значительный мутагенный и канцерогенный эффект на живые системы [1]. Отмечено, что 2,4,5-Т является недоступным или малодоступным источником углерода и энергии для большинства микроорганизмов, что ведет к накоплению и постепенному распространению этого ксенобиотика по пищевым цепям [2]. Анализ работ, касающихся поиска и исследования особенностей деструкторов, показал, что интерес к микроорганизмам-деструкторам 2,4,5-Т связан с возможностью использовать их на практике при создании биологических технологий очистки почвы от экологически опасных соединений.

Объектом исследований служил бактериальный штамм, выделенный из образца почвенных популяций микроорганизмов.

В эксперименте использовали минимальную солевую среду следующего состава в г/л:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  — 1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 5;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,05;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,005;  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  — 0,001;  $\text{ZnSO}_4$  — 0,008; pH — 6,8–7,0. В качестве единственного источника углерода и энергии добавляли 2,4,5-Т до конечной концентрации 100 мг/л.

Определение количества 2,4,5-Т в культуральной жидкости проводили согласно методам определения микроколичеств 2,4,5-Т с небольшими модификациями [3].

Для идентификации продуктов катаболизма 2,4,5-Т метилированные экстракты метаболитов подвергали анализу на хроматомасс-спектрометрической системе хроматограф HP 5890 с масс-селективным детектором HP 5972A.

В опытах с почвой посевной материал культуры вносили из расчета  $10^5$ – $10^6$  КОЕ на 1 г почвы, содержащей 2,4,5-Т в концентрации 100 мг/кг. Обработку проводили в течение 48 суток в лабораторных условиях при естественном суточном колебании температур летнего периода.

Исследуемый штамм был идентифицирован согласно культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам как *Gluconobacter oxydans* [4]. Клетки штамма представляют собой подвижные коккоба-

циллы, одиночные и двоянные, на МПА колонии беловатые, блестящие, непрозрачные. Окраска клеток по Граму отрицательная. Аэроб, оптимальный рост наблюдался в диапазоне температур от +22 °С до +41 °С и значениях рН, близких к нейтральным — 6,8–7,2. Депонирование штамма *G. oxydans* было произведено в ВКПМ под номером В-7170.

Исследование динамики роста штамма *G. oxydans* 2Т в условиях использования им 2,4,5-Т в качестве единственного источника углерода и энергии в периодической культуре показало, что существенное изменение значений оптической плотности ( $OD_{590}$ ) клеточной суспензии *G. oxydans* 2Т наблюдалось уже в течение первых суток культивирования (рис. 1).

Далее значение  $OD_{590}$  продолжало возрастать и его снижение наблюдалось только после 5-х суток культивирования. Анализ динамики изменения концентрации 2,4,5-Т в культуральной жидкости штамма *G. oxydans* 2Т позволяет констатировать, что в течение 5 суток происходило заметное уменьшение концентрации 2,4,5-Т примерно до 58,25%. К седьмым суткам она снижалась до 19,04%.

С целью выявления этапов метаболизма 2,4,5-Т *G. oxydans* исследован характер промежуточных продуктов превращения ксенобиотика, обнаруживаемых в среде культивирования штамма в условиях периодической культуры. Среди метаболитов были выявлены продукты неполного дегалогенирования молекул 2,4,5-Т, в частности, 2,4-дихлорфеноксиуксусная и 4-хлорфеноксиуксусная кислоты.

Кроме этого, было отмечено присутствие феноксиуксусной и 3-метил-2,6-диоксо-4-гексеновой кислот. Анализ природы интермедиатов катаболизма 2,4,5-Т *G. oxydans* позволяет заключить, что штамм осуществляет

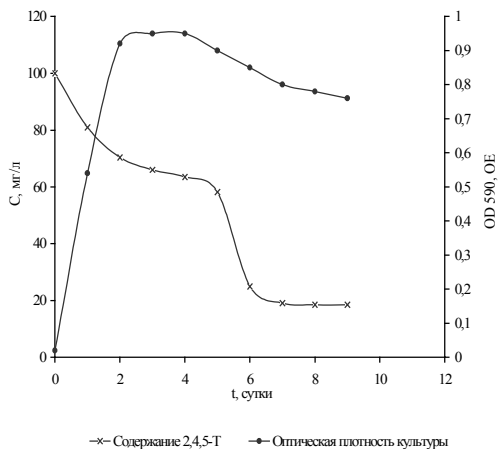


Рис. 1. Зависимость значений оптической плотности клеточной суспензии  $OD_{590}$  и концентрации 2,4,5-Т от времени инкубации штамма *Gluconobacter oxydans* IBRB-2Т в периодической культуре

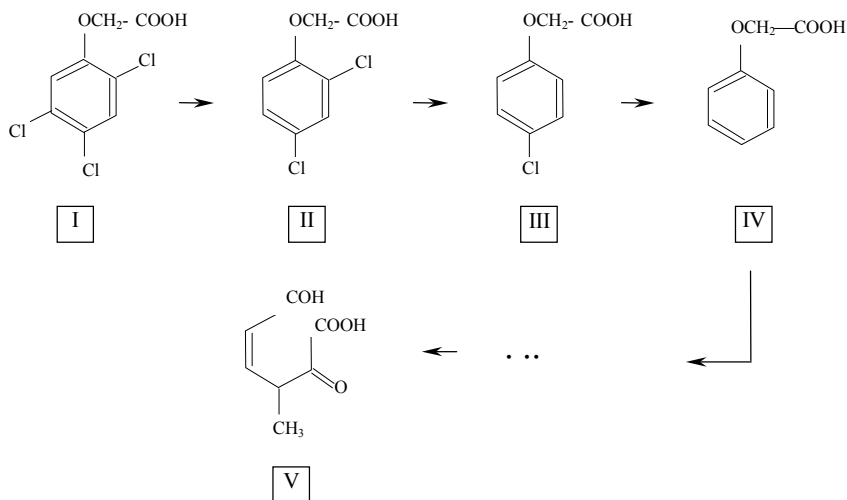


Схема 1. Метаболизма 2,4,5-Т штамма *Gluconobacter oxydans* 2Т. Условные обозначения: I — 2,4,5-Т; II — 2,4-Д; III — 4-хлорфеноксиуксусная кислота; IV — феноксиуксусная кислота; V — 3-метил-2,6-диоксо-4-гексеновая кислота

Таблица 1

Результаты анализа содержания 2,4,5-Т в почве

| Характеристика почвы             | Время обработки почвы, сут. |      |      |      |      |      |      |
|----------------------------------|-----------------------------|------|------|------|------|------|------|
|                                  | 1                           | 5    | 10   | 14   | 21   | 30   | 48   |
| Содержание 2,4,5-Т в почве, мг/г | 100                         | 95,0 | 87,6 | 85,0 | 72,6 | 68,1 | 33,5 |
| Степень очистки к контролю, %    | 0                           | 5,0  | 12,4 | 15,0 | 27,4 | 31,9 | 66,5 |

реакции дехлорирования молекул 2,4,5-Т с последующим их расщеплением до 3-метил-2,6-диоксо-4-гексеновой кислоты (схема 1).

Исследована динамика изменения концентрации 2,4,5-Т от времени инкубации штамма *G. oxydans* 2Т в почве, содержащей 2,4,5-Т (табл. 1, рис. 2).

Степень очистки почвы, достигаемая при использовании штамма *G. oxydans* 2Т, составляла соответственно: 27,4% на 21-е сутки культивирования, 31,9% на 30-е сутки и около 66,5% к 48-м суткам. Существенное изменение содержания 2,4,5-Т наблюдалось после 10–14 дней обработки (рис. 2).

Ранее было отмечено, что представители рода *Gluconobacter* встречаются в садовой почве, на цветах, фруктах, медоносных пчелах, в сидре, вине, южноафриканском пиве банту, пальмовом соке. Обнаружено, что *G. oxydans* трансформирует микотоксин пагулин в менее токсичное соединение — аскладиол [5]. В то же время, конверсия производных аромати-

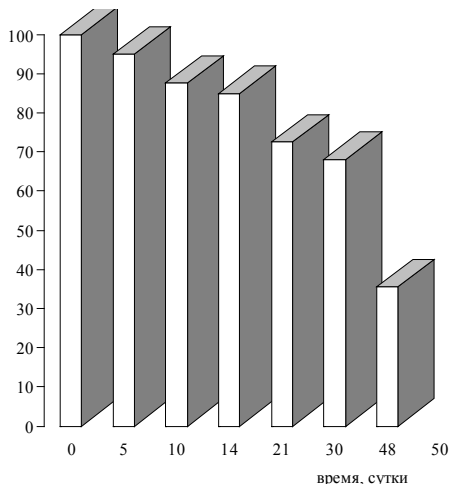


Рис. 2. Содержание 2,4,5-Т в почве в процессе очистки с использованием штамма *Gluconobacter oxydans* 2Т

ческого ряда, содержащих галогены, для представителей рода *Gluconobacter* ранее не была обнаружена.

Таким образом, можно сделать следующие выводы: культура *G. oxydans* способна использовать 2,4,5-Т в качестве единственного источника углерода и энергии, при этом она осуществляет совокупность процессов дегалогенирования молекул 2,4,5-Т с последующим образованием 3-метил-2,6-диоксо-4-гексеновой кислоты. Штамм *G. oxydans* 2Т осуществляет конверсию 2,4,5-Т в водной среде и почве. Приведенные данные показали, что применение штамма *G. oxydans* 2Т является перспективным для очистки почвы от 2,4,5-Т.

#### Литература

1. Grant W.F. The Genotoxic effects of 2,4,5-T Mutation Research, 1979. V.65. №2.— P. 83-119.
2. Маркушева Т.В., Журенко Е.Ю., Кусова И.В. Бактерии-деструкторы фенола и его хлорированных производных: поиск и применение.— Уфа: Гилем, 2002.— 108 с.
3. Методы определения микроколичеств пестицидов / Под ред. М.А. Клисенко.— М.: Медицина, 1984.— 256 с.
4. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. 9-е изд. В 2-х т.— М: Мир, 1997.— 799 с.
5. Ricelli A., Baruzzi F., Solfrizzo M., Morea M., Fanizzi F.P. Biotransformation of paltulin by *Gluconobacter oxydans* // Appl. Environ. Microbiol. 2007.— V.73.— P. 785–792.

#### Резюме

Штамм *Gluconobacter oxydans* 2Т был выделен из смешанных почвенных популяций бактерий. Культура способна утилизировать 2,4,5-Т как единственный источник углерода и энергии. В периодической культуре *G. oxydans* утилизировал

81% 2,4,5-Т за 9 дней. Среди метаболитов были выявлены 2,4-дихлорфеноксиуксусная, 4-хлорфеноксиуксусная и 3-метил-2,6-диоксо-4-гексеновые кислоты. Степень очистки почвы, достигаемая при использовании штамма *G. oxydans* 2Т, составила 66,5% к 48-м суткам.

The strain *Gluconobacter oxydans* 2Т has been isolated from a soil mixed bacterial populations. *G. oxydans* 2Т is capable of utilizing 2,4,5-Т as the sole source of carbon and energy. 2,4,5-Т quantity was reduced in a culture medium approximately on 81% by *G. oxydans* 2Т batch culture within 9 days. The strain produced processes of 2,4,5-Т dehalogenation to phenoxyactic acid, which then was transformed to 3-methyl-2,6-dioxo-4-hexenoic acid. The culture *G. oxydans* 2Т utilizes 2,4,5-Т in soil. The 2,4,5-Т concentration was reduced approximately on 67% within 48 day.

**ИВАНОВА Н.Н., МИТРОФАНОВА И.В., МИТРОФАНОВА О.В.**

*Никитский ботанический сад - Национальный научный центр, Украина, 98648, АР Крым, г. Ялта, нгт. Никита, e-mail: in\_vitro@ukr.net*

### **БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОРТОВ *BEGONIA RIGER ELATIOR***

Род бегония (*Begonia* L.) относится к семейству бегониевых (*Begoniaceae* С.А. Agardh.) и насчитывает около 1000 видов и разновидностей. Растения бегонии обладают большим разнообразием форм окрасок листьев и цветков, а также обильным и продолжительным цветением. Основной способ вегетативного размножения — черенкование. Для этих целей используют побеги, листья и его фрагменты. В цветоводстве в настоящее время получили распространение около 130 видов и около 2000 гибридов [1]. Исходя из биологических особенностей и использования, формы и сорта бегонии делят на две группы: красивоцветущие и декоративно лиственные. Бегония элатиор (*Begonia x elatior*, *B. hiemalis*), относящаяся к красивоцветущим бегониям — гибридная форма, которая получена в результате скрещивания *B. tuberhybrida* и *B. socotrana*. В Германии были созданы крупноцветковые мелколистные сорта, получившие название раса элатиор-Ригера или *Begonia riger elatior*.

О возможности клонального микроразмножения *Begonia x elatior* с использованием различных эксплантов, таких как верхушки побегов, сегменты цветоножки, ткани цветоноса и цветков, сегменты чашелистиков, лепестков, черешков, стеблевых отрезков описано в ряде публикаций [2–7]. Однако отсутствие универсальной питательной среды, обеспечивающей регенерацию разных сортов, создает определенные трудности при разработке способов клонального микроразмножения данной культуры.

Целью настоящего исследования было изучение особенностей регенерации растений пяти сортов *B. riger elatior* в условиях *in vitro* для разработки