

ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ МИКРООРГАНИЗМОВ, СПОСОБНЫХ РАЗЛАГАТЬ ФОСФОНАТЫ

И.С. Кравцов¹, С.Н. Янов², И.В. Дармов², А.Л. Ковтун¹

¹ Федеральное государственное унитарное предприятие «Центральный научно-исследовательский институт химии и механики», Москва

² Биологический факультет ВятГУ, Киров

Из активного ила станции очистки сточных вод выделены 4 новых штамма микроорганизмов, которые могут использовать в качестве единственного источника фосфора изопропиловый эфир метилфосфоновой кислоты (ИПЭ МФК) – нетоксичный аналог зарина. На основании изучения культурально-морфологических и биохимических свойств выделенных микроорганизмов проведена их видовая идентификация: все они являются грамотрицательными прокариотами и отнесены к видам *Chryseomonas luteola* – 2 штамма и *Aeromonas salmonicida subsp. achromogenes* – 2 штамма. На плотной минимальной среде с ИПЭ МФК один из штаммов *Chryseomonas luteola* диссоциирует с образованием нового морфологического типа. Из клеток штаммов *Chryseomonas luteola* и морфологического варианта удалось выделить плазмидную ДНК. В результате их электрофоретического разделения показано, что в клетках штаммов и варианта присутствуют по три плазмиды различной молекулярной массы, причем у морфологического варианта выявлено достоверное отличие от исходного штамма по молекулярной массе одной из плазмид, средней по размерам. Исследование газовой фазы культуральной среды методом газовой хроматографии показало, что выделенные микроорганизмы используют ИПЭ МФК не только в качестве источника фосфора, но и углерода. С целью разработки скрининговой ПЦР-системы для быстрого выявления микроорганизмов, содержащих фосфонатный оперон (*phn*-оперон), проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей фосфонатных оперонов трех бактерий (*Escherichia coli*, *Pseudomonas stutzeri* и *Rhizobium meliloti*). Выявлены протяженные консервативные участки в генах *phnI*, *phnJ*, *phnK*, что позволило подобрать четыре пары универсальных праймеров.

From an activated sludge of station of sewage treatment are isolated 4 new bacterial strains which can use as a unique source of phosphorus isopropyl ether of methylphosphonic acid (IPE MPA) – nontoxic analogue of sarin. On the basis of studying cultural-morphological and biochemical properties of the isolated microorganisms their specific identification is carried out. All of them are gram-negative procaryotes. 2 strains are subsumed to the *Chryseomonas luteola* and 2 strains – to the *Aeromonas salmonicida subsp. achromogenes*. On dense minimal medium with IPE MPA one of the *Chryseomonas luteola* strains dissociates with formation of new morphological type. From cells of *Chryseomonas luteola* and the morphological variant it was possible to extract plasmid DNA. Their electrophoresis shows that cells of the strains and the morphological type have in threes plasmids of various molecular mass, and at the morphological variant authentic distinction in molecular mass of one of plasmids which has the mediate dimensions is revealed. Research of culture medium gas phase by gas chromatography shows that the isolated microorganisms use IPE MPA as a source both of phosphorus, and of carbon. With the purpose of creation screening pcr-system for fast detection of microorganisms having phosphonate operon (*phn*-operon) relative analysis comparative analysis of nucleotide sequences of phosphonate operons of three bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas stutzeri* and *Rhizobium meliloti*) was carried out. There are taped lengthy conservative sites in genes *phnI*, *phnJ*, *phnK*, that allowed to design four pairs of universal primers.

Введение

Интерес к путям деструкции соединений с устойчивой С–Р-связью вызван тем, что она входит в состав многих фосфорорганических веществ, находящихся широкое применение в различных отраслях хозяйственной деятельно-

сти человека. Это и гербициды (глифосат, раундап ультра), инсектициды (хлорофос, афос), антибиотики, полимерные добавки, ингибиторы коррозии, а также отравляющие вещества (ОВ) (зарин, зоман, табун и VX) и продукты их химической нейтрализации [1–6]. Многие из этих веществ проявляют выраженные токсические

свойства, способны годами сохраняться в природных условиях без заметных признаков разложения, тем самым надолго отравляя окружающую среду [6].

Связь С–Р отличается крайней устойчивостью к химическому гидролизу, термическому расщеплению и фотолизу [7]. Это свойство является причиной экономической нерентабельности и малой эффективности химической переработки стабильных фосфонатов. Так, например, продукты химической нейтрализации таких ОВ, как VX и табун, лишь незначительно уступают по токсичности последним [6].

Эти обстоятельства заставляют искать альтернативные методы разрушения С–Р-связи, среди которых технология микробной деструкции кажется наиболее перспективной, так как она протекает в мягких, естественных условиях и позволяет снижать содержание химикатов в промышленных выбросах до концентраций, не превышающих предельно допустимых значений. Перспективным видится и направление биологического восстановления почв, загрязненных фосфонатами и продуктами их распада.

Созданию таких технологий предшествует поиск и генетическое усовершенствование штаммов микроорганизмов, обладающих способностью по возможности максимально ассимилировать фосфонаты в присутствии конкурентных неорганических источников фосфора в полевых или приближенных к ним условиях. Несмотря на активные работы западных исследователей по изучению и модификации генетической системы *phn*-оперона [8], на сегодняшний день таких микроорганизмов нет. В России, к сожалению, этой проблемой занимаются лишь немногие коллективы [1, 9].

На сегодняшний день известны отдельные группы микроорганизмов, для которых точно установлено разложение фосфонатов по С–Р-лиазному механизму. В большинстве случаев это грамотрицательные бактерии, однако, есть отдельные сообщения и о грамположительных [10]. Выделение из окружающей среды новых микроорганизмов (первичный скрининг), обладающих способностью разрушать фосфонаты, с помощью культуральных методов (на минимальных солевых средах) – длительный и трудоемкий процесс. В связи с этим актуальной является разработка методики прямой и быстрой

идентификации фосфонат-утилизирующих микроорганизмов из различных природных источников с целью создания обширной базы данных таких бактерий, что, в свою очередь, позволит провести систематизированную селекцию, направленную на получение штамма, пригодного для применения в полевых условиях.

В данной работе с использованием минимальных солевых сред нами были выделены и охарактеризованы четыре новых штамма микроорганизмов, способных ассимилировать изопропиловый эфир метилфосфоновой кислоты (ИПЭ МФК). Кроме того, в работе рассматривается возможность создания скрининговой ПЦР-системы, выявляющей наличие *phn*-оперона в бактериальном объекте, основанной на использовании вырожденных праймеров. Основной посылкой к этому является мнение о едином происхождении *phn*-оперона у предковых форм микроорганизмов и, как следствие, предположение о наличии консервативных участков в этом опероне у различных таксономических групп прокариот.

Материалы и методы

Получение чистых культур микроорганизмов из активного ила. Из суточного илового отстоя городской станции очистки сточных вод делали по 3 разведения (10^{-1} , 10^{-2} и 10^{-3}) из образца надосадочной жидкости и осадка, соответственно. Цельные пробы и их разведения высевали на агар Хоттингера. Выращивание проводили в течение 12 суток, первые трое суток при комнатной температуре (18–20°C), остальной период – при 28°C. По мере формирования отдельных колоний проводили их отсев с целью получения чистых культур, как описано в [11].

Выявление микроорганизмов, способных использовать ИПЭ МФК в качестве единственного источника фосфора. Для выявления культур, способных утилизировать алкилфосфонаты, проводили их выращивание на плотных и жидких минимальных питательных средах (МПС), содержащих в 1 л дистиллированной воды [9]: NaCl – 4,2 г, KCl – 1,5 г, NH₄Cl – 1,0 г, трис-ОН – 12,1 г, глюкозы – 1,0 г, MgCl₂ – 95 мг, Na₂SO₄ – 14 мг, FeCl₃ – 163 мкг, CaCl₂ – 111 мг, ИПЭ МФК или K₂HPO₄ – 0,5±1 ммоль, тиамин – 1,0 мг.

Каждую из депонированных на скошенном агаре Хоттингера культур ресуспендировали в 2,5 мл физраствора (ФР) до достижения концентрации 0,5 млрд. клеток на 1 мл по стандарту мутности. Полученную клеточную суспензию в количестве 0,1 мл вносили в каждую из трех параллельных пробирок: 1) с МПС, содержащей источник фосфора в виде ИПЭ МФК, – экспериментальная среда, 2) с МПС, содержащей неорганический фосфат в виде K_2HPO_4 , – положительный контроль, 3) с МПС, лишенной фосфора, – отрицательный контроль. Пробирки закрывали ватно-марлевыми пробками и культивирование вели в термостате при $t = 28^\circ C$. Через двое суток с момента появления первых признаков роста культуры (помутнение либо хлопьеобразование) в среде с ИПЭ МФК ее повторно пересевали из пробирки с ИПЭ МФК по вышеуказанной схеме. Всего было проведено три таких посева. Оценку роста культур в указанных средах проводили с использованием четырехбалльной шкалы переменных оценок.

При выращивании культур на плотной МПС с ИПЭ МФК проводили обессоливание агара, промывая его деионизированной водой до тех пор, пока в последних двух промывочных водах не обнаруживались фосфат-ионы (P_i). Обнаружение P_i проводили по реакции с молибдатом аммония [12].

Оценка глубины биодеструкции ИПЭ МФК. 0,5 мл суспензии изолятов (с концентрацией по стандарту мутности 10^7 КОЕ/мл), сохранивших способность роста на МПС с ИПЭ МФК после трех последовательных пассажей, инокулировали во флаконы объемом 150 мл, заполненные 9,5 мл МПС с ИПЭ МФК. Подращивали в течение 48 часов при $t = 30^\circ C$. Контролем на присутствие абиогенного метана служили флаконы со средой без культуры, а контролем на присутствие метана, образуемого не из ИПЭ МФК, – культура, инкубируемая на среде с K_2HPO_4 . Метан для контрольных определений получали по реакции сплавления уксуснокислого натрия с гидроокисью натрия. Выделяющийся в ходе реакции газ растворяли в 95%-ном этаноле.

Пробы газовой фазы (по 1 см^3) отбирали из флаконов шприцем и сразу растворяли в спирте. 1 мкл раствора метана в спирте анализировали на газожидкостном хроматографе 5830А «New-

lett Packard» (США) со стеклянной насадочной колонкой, заполненной 10% Silar 10С на газ-хроме Q. Газовый носитель – гелий, расход 30,0 мл/мин. Температура колонки $30^\circ C$, 1 мин, град $10^\circ C/\text{мин}$ до $150^\circ C$. Температура детектора (ПВД) $300^\circ C$, инжектора – $250^\circ C$.

Видовая идентификация отобранных микроорганизмов проводилась с учетом культурально-морфологических свойств (в соответствии с [11]), микроскопических и биохимических тестов. Определение особенностей обмена веществ выделенных культур проводили с использованием панели диагностических сред Api-test фирмы bioMerieux (Франция), определение отношения изолятов к лактозе проводили на дифференциально-диагностической питательной среде для микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* – Difco-агаре Mac Conkey [13].

Выделение плазмид из клеток проводили методом щелочного лизиса, как описано в [14].

Оценка возможности конструирования универсальных праймеров для ПЦР-детекции *phn*-оперона проводилась на основе выявления консервативных областей фосфонатных оперонов трех микроорганизмов (*Escherichia coli*, *Pseudomonas stutzeri* и *Rhizobium meliloti*), для которых имеются данные о секвенированных генах *phn*-оперона, доступные в базе данных NCBI. Подбор вырожденных праймеров проводили с помощью программы OLIGO. Данная часть работы носила информационно-аналитический характер.

Результаты и обсуждение

Из образцов активного ила были выделены 4 штамма бактерий, способные утилизировать ИПЭ МФК (P_n) в качестве единственного источника фосфора (табл. 1).

Несмотря на быстрый и выраженный рост микроорганизмов во флаконах в среде с P_n , в образцах газовой фазы метан не обнаруживался (результаты не показаны). Это может свидетельствовать о полной ассимиляции клетками микроорганизмов алкильного радикала ($-CH_3$) изопропилового эфира метилфосфоновой кислоты, на что также указывают работы [15–17].

При выращивании штаммов на средах с источником фосфора в виде неорганического

фосфата (Pi) (агар Хоттингера, минимальная среда с Pi) все они способны расти как в аэробных, так и в микроаэробных условиях (в герметично закупоренных пробирках).

При выращивании на плотных минимальных средах с Pn была выявлена диссоциация колоний клеток штамма С2. Новый морфологический вариант обозначили как С2' (рис. 1). Этот морфотип, вероятно, является адаптивным мутантом. Для него характерен быстрый рост на плотных и жидких средах с Pn в сравнении с исходным вариантом. Штаммы С3 и С4 не способны расти на плотных МПС с ИПЭ МФК (данные не приведены).

Ни один из выделенных штаммов не способен расти на средах с Pn при недостатке кислорода, хотя в идентичных условиях все они росли

в контрольных средах с Pi. Это указывает на явную кислородную зависимость метаболизма ИПЭ МФК в клетках исследуемых культур в противоположность штаммам *Escherichia coli* [9].

По результатам тестов на дифференциально-диагностической питательной среде для микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* – Difco-агаре Mac Conkey, – все четыре штамма не являются представителями кишечной группы. Штаммы С1, С2 и С2' являются лактозоположительными, штаммы С3 и С4 не растут на этой среде – они лактозоотрицательные.

Определение особенностей обмена веществ выделенных культур с использованием панели диагностических сред Api-test фирмы bioMérieux (Франция) [13] показало высокую ферментативную активность клеток культур С1 и С2, в

Таблица 1. Оценка способности микроорганизмов к росту на минимальных средах с различными источниками фосфора (четвертая серия культивирования)

Условное обозначение культуры*	Жидкая МПС	Интенсивность роста микроорганизмов на ... сутки					
		1	2	3	4	5	6
С1	Pn	+	++	+++	+++	+++	+++
	Pi	–	+++	+++	++++	++++	++++
	К	–	–	–	–	–	–
С2	Pn	++	+++	+++	++++	++++	++++
	Pi	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	К	–	–	–	–	–	–
С3	Pn	–	+	+	++	++	++
	Pi	+	++	++	++++	++++	++++
	К	–	–	–	–	–	–
С4	Pn	+	+	+	+	++	++
	Pi	+	++	++	++++	++++	++++
	К	–	–	–	–	–	–

Примечания:

- * – рост штаммов С3 и С4 сопровождался не помутнением, а хлопьеобразованием (характеризовалось по аналогии с помутнением).
- «+» – едва заметное помутнение среды, «++» – легкое помутнение среды, «+++» – умеренное помутнение, «++++» – сильное помутнение, соответствующее 0,5–1 млрд. кл./мл по стандарту мутности ГИСКА им. Л.А. Тарасевича.
- «–» – отсутствие видимых изменений.
- Pn – минимальная солевая питательная среда с ИПЭ МФК.
- Pi – минимальная солевая питательная среда с неорганическим фосфатом в виде K_2HPO_4 – положительный контроль.
- К – минимальная солевая питательная среда, не содержащая источников фосфора – отрицательный контроль.

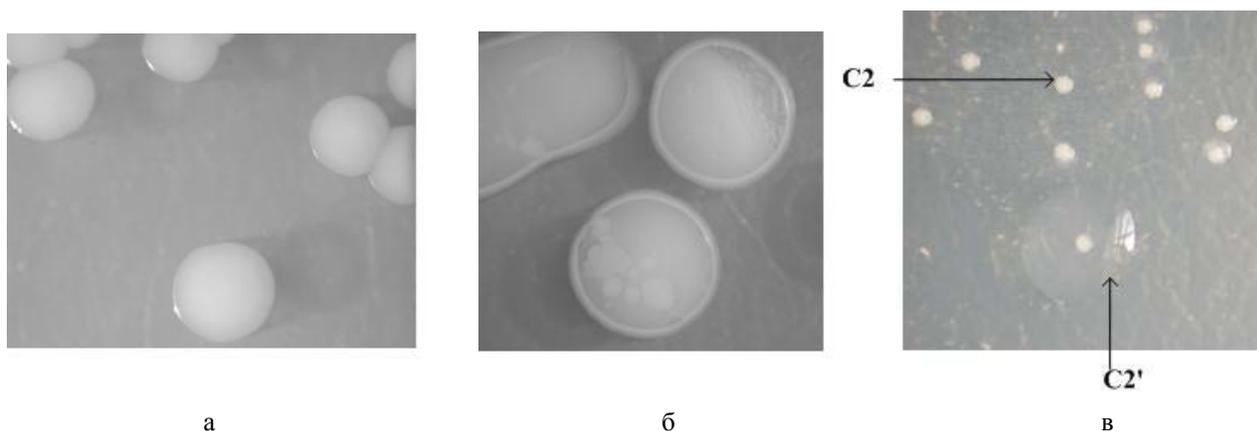


Рис. 1. Вид колоний штаммов C2 и C2' на плотных питательных средах:
а) C2 на агаре Хоттингера, б) C2' на агаре Хоттингера, в) C2 на среде с ИПЭ МФК

противоположность им штаммы C3 и C4 имеют очень низкий уровень метаболизма. На основе результатов этих тестов по базе данных bioMerieux была проведена видовая идентификация изолятов. Установлено, что штамм C1 – это *Chryseomonas luteola* (достоверность 99%), C2 – *Chryseomonas luteola* (99%), C3 – *Aeromonas salmonicida subsp. achromogenes* (55,3%) либо *Pasteurella* (40,9%), C4 – *Aeromonas salmonicida subsp. achromogenes* (84,3%) либо *Brevundimonas vesicularis* (14,9%).

При первом пересеве культуры со среды, содержащей Pi, на среду с Pn в качестве единственного источника фосфора наблюдается длительная задержка роста (до 1–2 суток). Это косвенно подтверждает тот факт, что в обычных условиях фосфонатный оперон находится в состоянии репрессии и микроорганизмам требуется время на дерепрессирование регуляторных элементов *phn*-оперона, биосинтез ферментной системы деградации и транспорта фосфонатов. Адаптированные штаммы C1 и C2 проявляют одинаковую скорость роста на минимальных средах с Pn и с Pi.

У штаммов C1, C2 и C2' выявлено по три криптических плазмиды различного размера (115±3; 90,0±1,5; 87±1 т.п.н. – для C1, 100±3; 59±1; 5,5±0,5 т.п.н. – для C2, 100±3; 56,5±1,5; 5,5±0,5 т.п.н. – для C2'). По результатам проведения электрофоретического разделения плазмидной ДНК (5 повторов) наблюдалось различие в молекулярной массе средних плазмид

штаммов C2 и C2' (рис. 2). Это указывает на возможную связь между появлением нового морфологического варианта C2' и изменением размера его средней плазмидной ДНК.

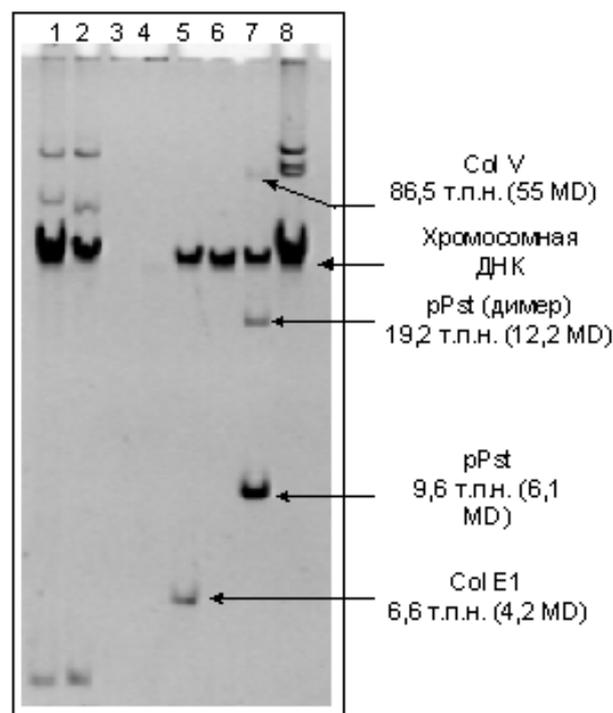


Рис. 2. Результаты электрофореза плазмидной ДНК: 1 – штамм C2; 2 – штамм C2' (адаптивный мутант); 3 – штамм C3; 4 – штамм C4; 5 – *Escherichia coli* 803 (Col E1) (маркер молекулярной массы); 6 – *Escherichia coli* 803 (отрицательный контроль); 7 – *Escherichia coli* 803 (Col V)(pPst) (стандарт молекулярной массы); 8 – штамм C1

Таблица 2. Основные свойства выбранных праймеров

№ пары	Обозначение праймера	Длина, п.н.	Температура плавления, °С	Длина амплификата, п.н.	Детектируемая область <i>phn</i> -оперона
1	phn 11	22	59,0	1553	<i>phnI</i>
	phn 12	23	66,6		<i>phnJ</i>
2	phn 13	23	61,0	628	<i>phnJ</i>
	phn 14	23	67,5		<i>phnJ</i>
3	phn 15	23	61,0	1365	<i>phnJ</i>
	phn 16	21	59,4		<i>phnK</i>
4	phn 13	23	60,0	1197	<i>phnJ</i>
	phn 16	22	61,0		<i>phnK</i>

Из клеток штаммов С3 и С4 не удалось выделить ДНК, что, возможно, объясняется наличием развитых клеточных капсул.

В пределах консервативных областей с помощью программы OLIGO подобраны четыре пары вырожденных праймеров для детекции фосфонатного оперона у широкого круга грамотрицательных бактерий (табл. 2). Данная часть работы носила информационно-аналитический характер.

В результате исследования гомологии фосфонатных оперонов трех микроорганизмов (*Escherichia coli*, *Pseudomonas stutzeri* и *Rhizobium meliloti*) были выявлены консервативные последовательности, что позволило выбрать праймеры для детекции *phn*-оперона у этих бактерий. Наличие таких областей среди микроорганизмов различных групп указывает на принципиальную возможность создания экспрессной скрининговой системы на основе ПЦР.

Таким образом, выявление способности какого либо микроорганизма утилизировать фосфонаты с использованием классических методов селекции на минимальных питательных средах наталкивается на определенные трудности, связанные с:

длительностью и трудоемкостью методики, из-за необходимости многократного пересева культуры, чтобы израсходовать внутриклеточ-

ный запас фосфора, адаптировать клетки к бедной питательной среде и активировать экспрессию *phn*-оперона;

жесткими требованиями к составу минимальных питательных сред и контролю отсутствия даже следов неорганического фосфата, так как он является конкурентным ингибитором *phn*-оперона;

сложностью культивирования микроорганизмов на МПС, а именно – при пересеве с жидкой минимальной питательной среды с фосфонатом на плотную такого же состава некоторые микроорганизмы могут вообще не расти;

одним микроорганизмам для разрушения фосфонатов требуется кислород, для других нет, причем это не зависит от метаболического статуса самого микроорганизма по отношению к кислороду;

необходимостью выбора методики оценки количественных показателей разрушения С–Р-связи в случае утилизации клеткой алкильного радикала.

Применение для первичного отбора ПЦР-метода с вырожденными праймерами позволит избежать этих сложностей, значительно удешевит и сократит по времени саму процедуру. Сложность внедрения этого метода заключается в выборе праймеров, которые были бы универ-

сальны для любого микроорганизма. При решении этой задачи был проведен сравнительный анализ фосфонатных оперонов микроорганизмов трех различных групп (*Escherichia coli*, *Pseudomonas stutzeri* и *Rhizobium meliloti*). В результате были выявлены консервативные участки, что позволило спроектировать праймеры с вырожденными свойствами для детекции фосфонатного оперона у грамотрицательных бактерий методом ПЦР. Кроме того, высокая степень гомологии генов *phn*-оперона подтверждает предположение о его эволюционной консервативности и, возможно, едином происхождении у предковых форм микроорганизмов.

Литература

1. Кононова С.В., Несмеянова М.А. Фосфонаты и их деградация микроорганизмами // Биохимия. 2002. 67, № 2, с. 220–233.
2. Мельников Н.Н. Химия и технология пестицидов. М.: Химия. 1974, с. 768.
3. Химия и применение фосфорорганических соединений: Труды третьей конференции. Под ред. М.И. Кабачника. М.: Наука. 1972, с. 374.
4. Новые фосфорорганические инсектициды. Пер. с нем. Под ред. Н.Н. Мельникова. М.: Мир. 1965, с. 488.
5. Egli T. Superficial-active substances // Microbiol. Sci. 1988. № 5, с. 36–41.
6. Савельева Е.И., Зенкевич И.Г., Кузнецова Т.А. и др. Исследование продуктов превращений фосфорорганических отравляющих веществ методом газовой хроматографии–масс-спектрометрии // Рос. хим. ж. 2002. XLVI, № 6, с. 83–91.
7. Нифантьев Э.Е. Химия фосфорорганических соединений. М.: Изд-во МГУ. 1971.
8. Yakovleva G.M., Kim S.-K., Wanner B.L. Phosphate-independent expression of the carbon-phosphorus activity of *Escherichia coli* // Appl. Microbiol. and Biotechnol. 1998. 49, с. 573–578.
9. Матыс С.В., Лауринавичюс К.С., Несмеянова М.А. Разложение метилфосфоновой кислоты и его физиологическая регуляция у *Escherichia coli* // Микробиология. 1996. № 4, с. 481–487.
10. Pipke R., Schulz A., Amrhein N. Microbe capable to assimilate carbon-phosphorus bond // Appl. and Environ. Microbiol. 1987. 53, с. 974–978.
11. Практикум по микробиологии. Под ред. проф. Н.С. Егорова. М.: Изд-во МГУ. 1976, с. 308.
12. Крешков П.А. Основы аналитической химии. В 3-х т. Т. 1. М.: Химия. 1978, с. 489.
13. Analytical Profile Index API 20 NE: Catalogue. 6th ed. S.A.: BIO MERIEUX. 1997, p. 251.
14. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии: Молекулярное клонирование. М.: Мир. 1984, с. 480.
15. Ternan N.G., Quinn J.P. Phosphate starvation-independent 2-aminoethylphosphonic acid biodegradation in a newly isolated strain of *Pseudomonas putida*, NG2 // Syst. and Appl. Microbiol. 1998. 21, с. 346–352.
16. Ternan N.G., Quinn J.P. Use phosphonate as a source of phosphorus, carbon and nitrogen // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1998. 248, с. 378–381.
17. Haney R.L., Sensemans S.A., Hons F.M. Effect of Raundap Ultra on microbial activity and biomass from selected soils // J. Environ. Qual. 2002. 31, № 3, с. 730–735.