

УДК 579. 631

## ФЕНОЛОКСИДАЗНА АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДІВ *PSEUDOMONAS* ТА *KLEBSIELLA*, ЇХ ЗДАТНІСТЬ ДО ДЕТОКСИКАЦІЇ ФЕНОЛУ

Копча Н. М., Садляк А. М., Бокшан О. Я.

**Фенолоксидазна активність бактерій родів *Pseudomonas* та *Klebsiella*, їх здатність до детоксикації фенолу.** — Н. М. Копча, А. М. Садляк, О. Я. Бокшан. — Досліджено фенолоксидазну активність бактерій родів *Pseudomonas* та *Klebsiella*. Встановлено здатність бактерій родів *Pseudomonas* та *Klebsiella* здійснювати деструкцію фенолу в широкому діапазоні концентрацій. Швидкість біодеструкції залежить від виду бактерій та концентрації фенолу. Найвищу здатність щодо детоксикації фенолу у концентраціях 20–500 мг/л проявили псевдомонади *P. fluorescens* 8607, *P. aeruginosa* 7, серед клебсіел – сапрофітні культури *Kl. terrigena* 8008 та *Kl. planticola* 33531.

**Ключові слова:** фенолоксидаза, біодеструкція, фенол, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Kl. terrigena*, *Kl. planticola*.

**Адреса:** Закарпатський територіальний центр карантину рослин ІЗР НААНУ, вул. Університетська, 21, Ужгород, Україна; e-mail: carantin@carantin.uzhgorod.ua

**Phenoloxydase activity of bacteria *Pseudomonas* and *Klebsiella* genes, their ability to degradation of phenol.** — N. Kopcha, A. Sadlyak, O. Bokshan. — Researches phenoloxydase activity by bacteria of *Pseudomonas* and *Klebsiella* genes. Ability of bacteria *Pseudomonas* and *Klebsiella* genes to degradation of phenol in wide range of concentrations is shown. The highest ability to degradation of phenol in concentrations of 20–500 mg/l showed *P. fluorescens* 8607 and *P. aeruginosa* 7, *Kl. terrigena* 8008 and *Kl. planticola* 33531.

**Key words:** phenoloxydase, degradation, phenol, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Kl. terrigena*, *Kl. planticola*.

**Address:** Transcarpathian territorial centre of plant quarantine IPP UAAS, Uzhgorod, Universytets'ka, 21, Uzhgorod, Ukraine; e-mail: carantin@carantin.uzhgorod.ua

### Вступ

У світі гостро постала проблема очищення довкілля від забруднювачів, що виробляються і використовуються у великих кількостях. До таких забруднювачів належить фенол та його похідні. Феноли потрапляють у біосферу з виробничими і побутовими відходами, вони містяться в стічних водах коксохімічного, металургійного, газового, лісопереробного, меблевого, целюлозопаперового виробництва, в продуктах переробки нафти, торфу та ін. [10]. Фенольні сполуки також широко застосовуються в сільському господарстві в якості діючих речовин великої кількості пестицидів (хлорпохідні, галагенопохідні та багато ін. [7, 4]. До пестицидів, що найбільш часто використовуються в сільськогосподарській практиці, належить 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота, при розкладі якої утворюється фенол [10, 2, 4]. Небезпека надходження сполук фенольної природи у довкілля пов'язана з їх токсичністю для біологічних об'єктів та значною стійкістю до розкладу [1].

У процесі деструкції фенолів в навколишньому середовищі головну роль відіграють мікроорганізми [1, 3]. Мікробіологічна детоксикація фенолів є одним з найбільш безпечних і перспективних методів очищення довкілля, в процесі якої відбувається розщеплення ароматичного кільця та утворення нетоксичних сполук, вуглекислоти та води, що в подальшому включаються в кругообіг елементів в біосфері [1, 4, 11]. В зв'язку з цим продов-

жується пошук найбільш активних мікроорганізмів-деструкторів, здатних розкласти фенол у довкіллі, ведуться роботи по розробці методів їх інтродукції на забруднені території [2].

Бактерії родів *Pseudomonas* та *Klebsiella* відіграють важливу роль у довкіллі: вони розповсюджені в ґрунтах та водоймах і є асоціантами широкого кола важливих сільськогосподарських та декоративних рослин. Багаточисельні за видовим складом бактерії роду *Pseudomonas* продукують біологічноактивні речовини, тому відіграють важливу роль у захисті рослин від бактеріальних і грибних захворювань. Вони широко використовуються у різних сферах народного господарства, зокрема, застосовуються у процесах мінералізації органічних сполук та очищення навколишнього середовища [9, 13]. Клебсієли здатні стимулююче впливати на ріст і розвиток вищих рослин, прискорювати регенераційні процеси тканин рослин та здатні фіксувати атмосферний азот [8].

Вказане вище робить актуальним дослідження здатності бактерій родів *Pseudomonas* та *Klebsiella* до детоксикації сполуки фенольної природи з метою подальшого їх використання для біоремедиції забруднених територій.

Нашим завданням було дослідити наявність ферменту фенолоксидازی у бактерій родів *Pseudomonas*, *Klebsiella* та встановити рівень їх деструктивної активності щодо фенолу.

## Матеріали та методи досліджень

В дослідженнях використовували колекційні штами бактерій, отримані з відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Заболотного НАН України та кафедри мікробіології медичного факультету УжНУ НАН України – *P. fluorescens* (V. Trevisan) Migula, шт. 8655; *P. aeruginosa* (V. Trevisan) Migula, шт. 7; *Kl. planticola* V. Trevisan, шт. 33531; *Kl. terrigena* V. Trevisan, шт. 8008; *Kl. oxytoca* V. Trevisan, шт. ATCC 13183; *Kl. pneumonia* subsp. *pneumonia* V. Trevisan, шт. 3785, вирощені протягом доби на ПА.

Для вивчення фенолоксидазної активності та здатності бактерій до деструкції фенолу використовували рідке синтетичне середовище такого складу:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 2,0 г;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2,0 г;  $\text{NaCl}$  – 0,5 г;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  – 0,5 г;  $\text{MgSO}_4$  – 0,5 г; вода водопровідна – 1000 мл. Джерелом вуглецю та ростовим субстратом для бактерій був фенол, який додавали в середовище в діапазоні концентрацій від 20 мг/л до 10000 мг/л. Культивування бактерій здійснювали при температурі 24–26°C. Контролем слугувало середовище з фенолом без додавання бактерій.

Досліджували фенолоксидазну активність бактерій за методом Sunaga Takashi із співавторами [12]. Наявність фенолоксидази в культуральній рідині визначали на 10 добу (спостерігали зміну ко-

льору культуральної рідини внаслідок додавання реагентів у середовище).

Здатність бактерій до деструкції фенолу досліджували при вихідних концентраціях фенолу 20, 100, 200 та 500 мг/л. Для кількісного визначення залишків фенолу у середовищі використовували кольорову реакцію взаємодії 4-аміно-антипірина з фенолом і щоденно, протягом 10 діб, вимірювали оптичну густину розчинів на фотоелектрокалориметрі КФК-2 при  $\lambda$ -540 нм. [6]. Побудову калібрувального графіка проводили згідно Лурьє і Рибнікової [5].

## Результати досліджень та їх обговорення

Здатність бактерій до деструкції фенолу пов'язана із наявністю у них ферменту фенолоксидази. В наших дослідженнях наявність фенолоксидази відмічали у культуральній рідині після 10 діб культивування бактерій родів *Klebsiella* та *Pseudomonas* в присутності фенолу в межах 20–500 мг/л (табл. 1). При збільшенні концентрації фенолу у середовищі до 1000 мг/л фенолоксидазну активність проявили тільки *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* та *Kl. terrigena*. В присутності 10000 мг/л фенолу в культуральній рідині, де були внесені досліджувані бактерії, наявність фенолоксидази не спостерігали у жодного виду. Така висока концентрація фенолу у синтетичному середовищі проявляла бактерицидну дію на досліджувані бактерії.

Таблиця 1. Фенолоксидазна активність бактерій

Вихідна концентрація фенолу, мг/л	Види бактерій						Контроль
	<i>Kl. planticola</i>	<i>Kl. terrigena</i>	<i>Kl. pneumonia</i>	<i>Kl. oxytoca</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
20	+	+	+	+	+	+	–
100	+	+	+	+	+	+	–
200	+	+	+	+	+	+	–
500	+	+	+	+	+	+	–
1000	–	+	–	–	+	+	–
10000	–	–	–	–	–	–	–

Примітка: "–" – відсутність фенолоксидази в культуральній рідині; "+" – наявність фенолоксидази в культуральній рідині

Згідно санітарного законодавства, ГДК фенолу становить 0,001 мг/л, а у водоймах господарсько-побутового призначення допускається присутність фенолів не більше 0,05 мг/л [10]. У наших дослідженнях, бактерії родів *Pseudomonas* та *Klebsiella* проявляли фенолоксидазну активність у концентраціях, які перевищували гранично-допустимі у тисячі разів, що вказувало на їх потенційну здатність до деструкції сполук фенолу.

При спостереженні у динаміці здатності бактерій розкласти фенол на початкових етапах культивування (в присутності фенолу) відмічали інгібування деструктивної активності культур, при цьому вміст фенолу у середовищі фактично не змінювався (рис.). Тривалість цього процесу зростала із збільшенням концентрації фенолу, що, ймовірно, пов'язане із затримкою росту бактерій у період їх адаптації до умов середовища (лаг-період) (рис.). Крім того, тривалість лаг-періоду варіювала в залежності від штама-деструктора.

Найбільш активними щодо деструкції фенолу були псевдомонади: *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*. Так, при інкубуванні цих бактерій у середовищі з початковою концентрацією 20 мг/л фенолу, вже на 3 добу відмічали лише слідові залишки фенолу у культуральній рідині, а на 4 добу – повну деструкцію фенолу. При вихідних концентраціях 100 та 200 мг/л повну деструкцію фенолу під дією культур спостерігали на 6 та 9–10 добу. З підвищенням початкової концентрації до 500 мг/л залишкова кількість фенолу на 10 добу становила 39,8% та 43,4% відповідно.

За деструктивною активністю сапрофітна *Kl. terrigena* фактично не відрізнялась від псевдомонад: відсутність фенолу у культуральній рідині фіксували також на 4 добу при початковій концентрації 20 мг/л, на 7 добу – при початковій концентрації 100 мг/л та на 10 добу – при 200 мг/л фенолу. При культивуванні бактерій у середовищі з 500 мг/л фенолу залишкова кількість фенолу на 10 добу становила 44,2%.

Високою деструктивною активністю характеризувалась і сапрофітна *Kl. planticola* в умовах інкубації у середовищі з початковими концентраціями 20 та 100 мг/л фенолу: відсутність фенолу у культуральній рідині відмічали на 5 та 9 добу відповідно. Лише при збільшенні вихідної концент-

рації фенолу деструктивний потенціал цих бактерій дещо знижувався: в умовах культивування бактерій у середовищі з 200 та 500 мг/л фенолу на 10 добу спостережень залишкова кількість фенолу становила 40% та 61,2% відповідно.

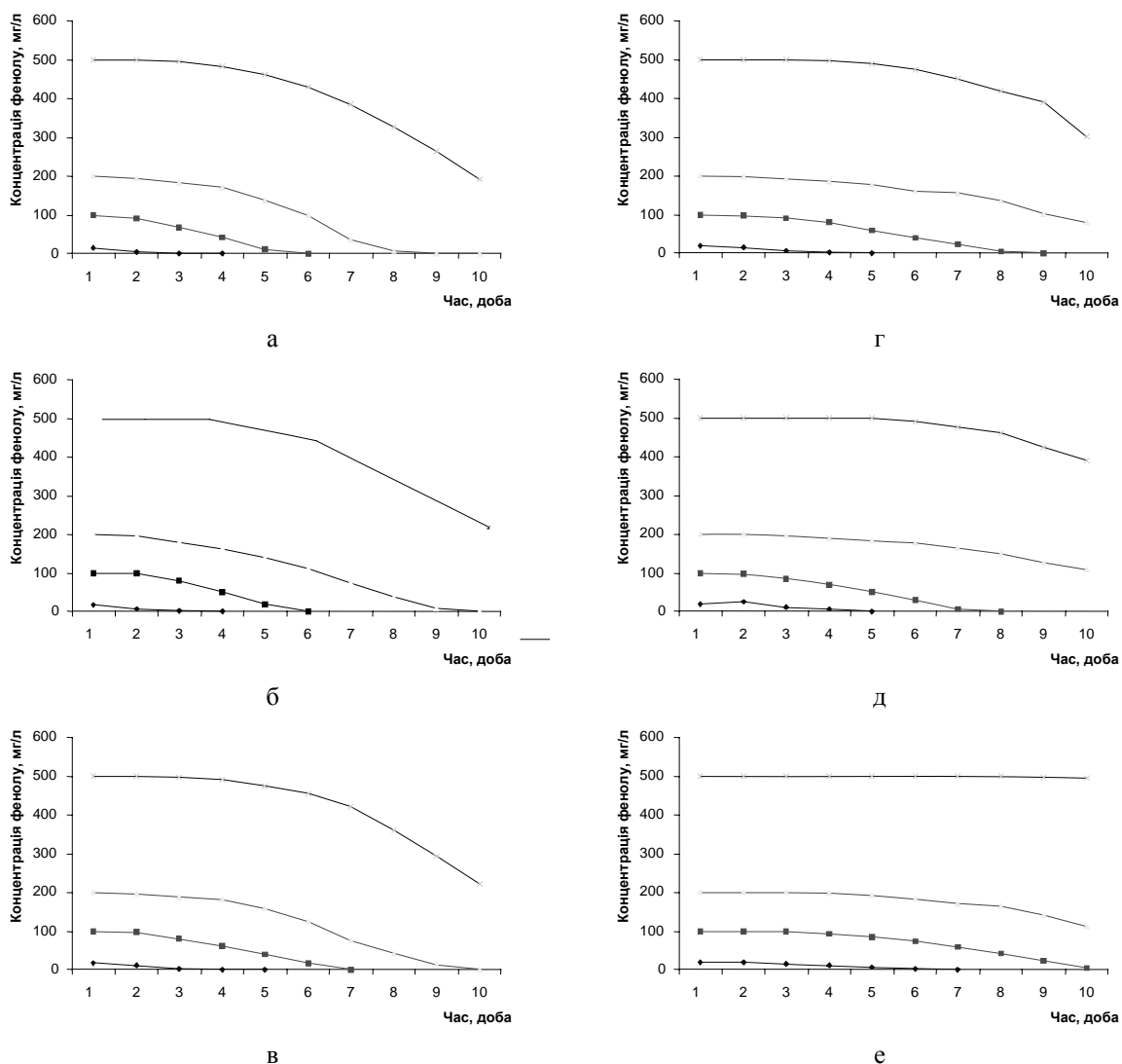


Рис. Динаміка деструкції фенолу бактеріями родів *Pseudomonas* та *Klebsiella*: а – *P. fluorescens*, б – *P. aeruginosa*, в – *Kl. terrigena*, г – *Kl. planticola*, д – *Kl. pneumonia*, е – *Kl. oxytoca*

Нижча здатність щодо деструкції фенолу серед клебсіел відмічена для *Kl. pneumonia* та *Kl. oxytoca*. При інкубації цих культур у середовищі з 20 мг/л фенолу відсутність фенолу у культуральній рідині фіксували на 6 та 7 добу. В умовах культивування з 100 мг/л фенолу під дією бактерій *Kl. pneumonia* спостерігали повну деструкцію фенолу у середовищі на 9 добу, а в присутності *Kl. oxytoca* залишкова кількість фенолу на 10 добу становила 5%. З підвищенням початкової концентрації до 200 мг/л залишкова кількість фенолу на 10 добу становила 54% та 56%; з підвищенням концентрації до 500 мг/л – 78% та 98,6% відповідно.

У контрольних пробірках рівень фенолу протягом періоду спостережень залишався без змін.

Як показали результати наших досліджень щодо динаміки біодеструкції фенолу, при різниці між вихідними концентраціями у 5 разів (20, 100, та 500 мг/л) тривалість процесу детоксикації фенолу в середовищі зростала приблизно у 1,5 – 2 рази (рис.). Г.Ю. Димитрієва з співавторами [3], на прикладі виділених з прибережної зони моря баціл, показують, що при високих концентраціях фенолу, коли культури існують в екстремальних умовах, вони до певної межі майже не реагують на різницю в концентраціях токсиканта, так як їх фізіологічна відповідь знаходиться далеко за межами норми і вони працюють в режимі не адаптації, а виживання. Цим, на нашу думку, можна пояснити і дану залежність у наших дослідженнях.

На основі результатів проведених досліджень можна сказати, що у синтетичному середовищі, яке за своїм складом є близьким до природного, досліджувані бактерії родів *Pseudomonas* та *Klebsiella* брали активну участь у детоксикації фенолу, процес біодеструкції фенолу залежав від виду бактерій-деструкторів та вихідної концентрації фенолу.

#### Висновки

Фермент фенолоксидазу виявлено у представників бактерій родів *Pseudomonas* та *Klebsiella* при концентрації фенолу 20 – 1000 мг/л у середовищі.

Швидкість біодеструкції фенолу залежить від виду бактерій-деструкторів та концентрації фенолу.

Найвищу здатність щодо детоксикації фенолу в концентраціях 20 – 500 мг/л проявили псевдомонади *P. fluorescens* 8607 та *P. aeruginosa* 7, серед клебсієл – сапрофітні культури *Kl. terrigena* 8008 та *Kl. planticola* 33531.

Представники бактерій з родів *Pseudomonas* та *Klebsiella* є стійкими до умов фенольного навантаження, що дозволяє вважати їх перспективними для розробки методів біоремедації забруднених ґрунтів та вод сполуками фенольної природи.

1. Гвоздяк П. И. Роль микроорганизмов в очистке и загрязнении биосферы. // Микробиология окружающей среды. – Алматы, 1980. – С. 28–32.
2. Гвоздяк П. И., Глоба Л. И. Научное обоснование, разработка и внедрение в практику новых биотехнологий очистки воды. // Химия и технология воды, 1998. – т. 20, – № 3. – С. 325–329.
3. Дмитриева Г. Ю., Христофорова Н. К., Дроздовская О. А., Тювелева Е. Е., Дмитриев С. М., Шевченко Л. С. Детоксикация фенола микроорганизмами прибрежной зоны моря. // Микробиология, 1999. – т. 68. – С. 107–113.
4. Защита растений в устойчивых системах земледельческого использования (в 4-х книгах) / Под ред. доктора с.-х. наук, профессора, иностранного члена РАСХН Д. Шпаара.– Минск: "Орех", 2004, – книга 4. – 345 с.
5. Лурье Ю. Ю., Рыбникова А. И. Химический анализ производственных сточных вод.– М.: "Химия", 1974. – 335 с.
6. Мазор В. И. Методы органического анализа / Перевод с англ, под ред. д. х. н. Кашина. – М: "Мир", 1986. – 468 с.
7. Перелік пестицидів і агрохімікатів дозволених до використання в Україні // Захист і карантин рослин, 2010. – № 2, 3.
8. Петак Г. М. Взаємодія бактерій роду *Klebsiella* з представниками вищих рослин: Автореф. дис. канд. біол. наук. – Київ, 1996.
9. Смирнов В. В., Киприанова Е. А. Бактерии рода *Pseudomonas*. –К.: "Наукова думка", 1990.– 264 с.
10. Юрковская Е. М. Микробиологическая очистка промышленных сточных вод. – Киев: "Здоровье", 1984. – 160 с.
11. Janase H. Degradation of phenol by thermophilic and halophilic bacteria isolated from marine brine sample // J. Ferm. Biol., 1992. – V. 74.– № 5.– P. 297–300.
12. Sunaga Takashi, Acizi Taketoshi. Degradation of phenol by bacteria of *Pseudomonas* genes // Jap. J. Bakteriол., 1972, –V. 27. – № 6. – P. 809–815.
13. Ward A., Campoli – Richards D., Mupirocin M. – A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use //Drugs.,1986.– 32. P. 425–444.

Отримано: 11 червня 2010 р.

Прийнято до друку: 24 червня 2010 р.