

УДК 579.2(22+66)

Биодеградация фосфорорганических загрязнителей почвенными бактериями: биохимические аспекты и нерешенные проблемы

© 2020 А.В. СВИРИДОВ^{1*}, Т.В. ШУШКОВА¹, Д.О. ЭПИКТЕТОВ¹, С.В. ТАРЛАЧКОВ^{1,2}, И.Т. ЕРМАКОВА¹, А.А. ЛЕОНТЬЕВСКИЙ¹

¹ ФИЦ «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), Московская область, Пуцино, 142290

² Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Московская область, Пуцино, 142290

*e-mail: alhummen@rambler.ru

Поступила в редакцию 20.03.2020 г.

После доработки 14.04.2020 г.

Принята к публикации 22.07.2020 г.

Изучены особенности деградации устойчивых фосфорорганических загрязнителей шестью почвенными бактериальными изолятами и тремя штаммами, адаптированными к потреблению гербицида глифосата (ГФ) в лабораторных условиях. Показаны различия в скорости утилизации органофосфонатов у таксономически близких штаммов, обладающих одинаковым набором ферментов катаболизма этих соединений, что предполагает наличие неизвестных механизмов регуляции их активности. Продемонстрировано влияние адаптации к потреблению ГФ на эффективность деструкции других фосфонатов. Выявлены новые штаммы бактерий, обеспечивающие деструкцию до 56% биодоступного ГФ при реинтродукции в почву. Обсуждаются нерешенные проблемы и направления дальнейших исследований с целью разработки эффективных биопрепаратов для ремедиации загрязненных органофосфонатами сред.

Ключевые слова: органофосфонаты, глифосат, биодеградация, биоремедиация, С–Р-лиаза, фосфатаза, бактерии-деструкторы

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-126-135

Фосфор — макроэлемент, необходимый для всех живых организмов — может включаться в биологический круговорот не только в наиболее окисленной форме в виде фосфатов, но и в любой другой степени окисления [1]. Среди восстановленных соединений фосфора важную роль играют органофосфонаты (ОФ), содержащие связь С–Р³⁺, устойчивую к гидролизу и действию фосфатаз. Природные ОФ входят в состав структурных компонентов клеток, используются для запаса фосфора и как биологически активные вторичные метаболиты [1, 2]. Синтетические ОФ образуются как побочные продукты промышленности и при

детоксификации боевых отравляющих веществ, широко применяются как хелатирующие агенты и пестициды [3, 4]. Среди последних наиболее распространен глифосат (N-фосфонометилглицин, ГФ) — неселективный гербицид широкого спектра действия, ингибирующий синтез ароматических аминокислот. Объемы применения синтетических ОФ превышают 1 млн тонн в год, не менее 800 тыс. тонн составляет ГФ [5, 6]. Вопрос о степени угрозы ГФ для окружающей среды является предметом дискуссий. Первоначальное мнение о ГФ как о быстро разлагающемся «зеленом» гербициде поставлено под сомнение в ряде работ [7–9]. Среди

Список сокращений: 2-АЭФ — 2-аминоэтилфосфонат; АМФК — аминотетрафосфоновая кислота; ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; ГАТ — глифосат-N-ацетилтрансфераза; ГОР — глифосат-оксидоредуктаза; ГФ — глифосат; КОЕ — колониеобразующие единицы; МФК — метилфосфоновая кислота; НАДН — никотинамидадениндинуклеотид (восстановленный); ОФ — органофосфонаты; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ФА — фосфоноацетат; ФАГ — фосфоноацетатгидролаза; ФМН — фосфоминин; ФНТ — фосфатаза (фосфоноацетальдегидгидролаза); С–Р-лиаза (carbon-phosphorus lyase) — лиаза связи углерод-фосфор; MLST (multilocus sequence typing) — типирование на основе мультилокусных последовательностей; Р_i — ортофосфат.

последствий многолетней обработки сельхозугодий ГФ называют накопление гербицида в почвах, просачивание в водоемы, изменение состава микрофлоры, тератогенное воздействие на животных и негативное влияние на здоровье человека. Экологические риски связаны также с первичным продуктом деградации ГФ — аминометилфосфоновой кислотой (АМФК), которая более стабильна, чем ГФ, и может обладать токсическим потенциалом в отношении про- и эукариот [7, 8]. Единственным рациональным способом очистки различных сред от ГФ и АМФК является биodeградация этих соединений бактериями, обладающими специфическими ферментными системами [10]. В последние годы возрос интерес к поиску и изучению бактерий, эффективно разлагающих ГФ и его производные в водных и почвенных условиях, для разработки технологий биоремедиации [11–14]. Хотя для некоторых бактерий проведены успешные опыты в открытом грунте [15], подобные методики пока не доведены до коммерческой стадии.

Для утилизации ОФ как источников фосфора требуется наличие ферментов, обеспечивающих разрыв С–Р-связи. Среди них выделяется С–Р-лиаза — мультиферментный комплекс, превращающий метилфосфоновую кислоту (МФК) и другие алкил- и аминоксилфосфонаты из природных и антропогенных источников в ортофосфат (Р_i) и углеродный остаток. У отдельных бактерий С–Р-лиаза способна расщеплять ГФ с образованием Р_i и саркозина [16]. Также известен ряд высокоспецифичных С–Р-гидролаз, например, фосфонатаза (ФНТ) (ЕС 3.11.1.1) и фосфоацетатгидролаза (ФАГ) (ЕС 3.11.1.2) [2]. С–Р-гидролизующая активность в отношении МФК недавно обнаружена у хорошо изученной ортофосфатгидролазы (ЕС 3.1.8.1), которая считалась специфичной только в отношении фосфотриэфирной связи [17].

До 40% расшифрованных бактериальных геномов содержат гены, кодирующие ферменты катаболизма ОФ; в некоторых экосистемах фосфонатами может быть представлена основная часть биодоступного фосфора [18, 19], однако способность утилизировать ГФ как источник фосфора в чистой культуре описана лишь для отдельных изолятов [9, 20]. Тем не менее, в условиях почв и водоемов могут формироваться эффективные ассоциации бактерий, способные к быстрой минерализации ГФ за счет кооперации либо высоких биодеструктивных характеристик отдельных представителей сообщества [13, 14].

ГФ может подвергаться трансформациям, не связанным с разрывом связи С–Р. Основным путем биodeградации гербицида в природе является его превращение в АМФК и глиоксилат под действием глифосат-оксидоредуктазы (ГОР) [21].

Аналогичную реакцию с меньшей эффективностью могут катализировать глицинооксидазы [22, 23]. В обзорах по теме отмечается, что большинство бактерий не метаболизируют АМФК и выделяют ее во внешнюю среду [9, 20]. У *Bacillus licheniformis* была обнаружена ГФ-ацетилтрансфераза (ГАТ), превращающая гербицид в нетоксичный *N*-ацетилглифосат, но с низкой скоростью [24]; аналогичную трансформацию также осуществляли клетки *Achromobacter* sp. Kg 16 [25].

Активность известных С–Р-лиаз регулируется на уровне экспрессии концентрацией экзогенного Р_i; ФАГ и ряд других С–Р гидролаз индуцируются в присутствии субстрата; для ФНТ описаны оба механизма. Для прочих перечисленных ферментов нет исчерпывающих данных по их регуляции [2, 10, 16].

Несмотря на то, что уже установлен механизм работы С–Р-лиазного комплекса [16], создана подробная картина процессов синтеза и распада природных ОФ [4] и доказана значительная роль этих соединений в биологическом круговороте фосфора [2, 19], многие вопросы, связанные с деградацией ГФ и его производных, остаются плохо изученными. Не выяснены факторы, определяющие способность С–Р-лиаз расщеплять молекулу ГФ. Не исследован с генетической точки зрения вопрос наличия у одного микроорганизма двух С–Р-лиаз, из которых только одна специфична в отношении ГФ [26–28]. Недостаточно данных о механизмах регуляции путей деструкции ГФ и не известны причины появления Р_i-независимой С–Р-лиазы с высокими деструктивными характеристиками [11–13].

Таким образом, для упрощения отбора перспективных деструкторов гербицида, сохранения и улучшения их свойств после выделения из природной среды и дальнейшей разработки методик микробной ремедиации сред, загрязненных ГФ и АМФК, требуется решить ряд задач, а именно: провести сравнительное исследование наиболее активных штаммов-деструкторов ГФ молекулярно-биологическими и биохимическими методами для оценки возможности связать эффективность потребления ГФ с доступными для экспресс-анализа генетическими признаками бактерий, выявить новые особенности регуляции соответствующих ферментных систем и определить влияние длительного потребления ГФ на утилизацию прочих ОФ.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Бактерии-деструкторы ОФ и определение их физиологических характеристик

Для работы использовали постоянно пополняемую лабораторную коллекцию почвенных бактерий, способных эффективно утилизировать

МФК, ГФ, АМФК и ряд природных ОФ [3, 28]. Эксперименты проводили с бактериальными штаммами *Achromobacter aegrifaciens* Kg 16 (ВКМ В-2534D), *A. aegrifaciens* МРК 7 (ВКМ В-2693), адаптированным к утилизации ГФ вариантом *A. aegrifaciens* МРК 7А (ВКМ В-2779), *A. aegrifaciens* МРК 12 (ВКМ В-2694) и адаптированным к ГФ *A. aegrifaciens* МРК 12А (ВКМ В-2778). Выделение штаммов и адаптация к ГФ описаны ранее [3, 28]. Также использованы новые штаммы из лабораторной коллекции: *A. aegrifaciens* Km 11, адаптированный к ГФ *A. aegrifaciens* Km 11А (ВКМ В-3296), *A. insolitus* Kg 13 (ВКМ В-3294) и *A. insolitus* Kg 19 (ВКМ В-3295). Почвенные эксперименты проводили со штаммом *Ochrobactrum anthropi* GPK 3 (ВКМ В-2554D) [15].

Ростовые характеристики бактерий и динамику утилизации ОФ определяли путем культивирования в жидких минимальных средах, содержащих ГФ, АМФК, 2-аминоэтилфосфонат (2-АЭФ), МФК, фосфоацетат (ФА) и фосфомицин (ФМН) [28]. Убыль ОФ и накопление характерных метаболитов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или спектрофотометрически [3, 29]. Активность ФНТ измеряли по убыли НАДН в сопряженной реакции с алкогольдегидрогеназой [27].

Антибиотикоустойчивость определяли диффузионным методом по ширине зоны просветления вокруг дисков с антибиотиками («НИЦФ», Россия) на чашках Петри с агаризованной средой LB.

Определение таксономического положения изучаемых бактерий

Видовую принадлежность штаммов-деструкторов ГФ определяли путем анализ гена нуклеотидредуктазы *NrdA* [30, 31]. Культуры выращивали в 5 мл среды LB в течение 20 ч до оптической плотности $\geq 4,0$ при длине волны 560 нм (OD_{560}), клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 13 400 об/мин, выделение ДНК проводили с использованием набора *diaGene* 3318.0050 («Диа-М», Россия) в соответствии с инструкцией. ПЦР-амплификацию геномной ДНК проводили с праймерами: 5'-GAACTGGATTCCCGACCTGTTC-3' (*NrdA_F*) и 5'-TTTCGATTTGACGTACAAGTTCTGG-3' (*NrdA_R*) — в амплификаторе Eppendorf Mastercycler pro S (Eppendorf, Германия) с использованием ДНК-полимеразы Q5 High Fidelity (NEB, США). Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала 10 мкл 5× Q5 Reaction Buffer, 10 мкл 5× High GC Enhancer, 5 мкл 2 mM dNTPs, 1 мкл раствора ДНК-матрицы (10–12 нг ДНК), по 1 мкл

праймеров (концентрация каждого 10,5 мкМ), 0,5 мкл ДНК-полимеразы, 21,5 мкл деионизованной воды. Условия реакции: первоначальный прогрев 98 °С — 5 мин, 32 цикла (плавление 98 °С — 35 с, отжиг праймеров 58 °С — 30 с, элонгация 72 °С — 50 с), завершающая элонгация 72 °С — 4 мин, охлаждение до 4 °С. Продукты ПЦР длиной 954 п. н. очищали с помощью препаративного электрофореза в 1%-ном агарозном геле, приготовленном на TAE-буфере, выделяли из геля с помощью набора *diaGene* 3326.0050 («Диа-М») и концентрировали с использованием набора *Zymo Research DNA Clean and Concentration Kit* (*Zymo Research*, США) в соответствии с инструкциями производителей. Очищенные препараты секвенировали в ЗАО «Евроген» (Россия), полученные нуклеотидные последовательности анализировали с помощью базы данных PubMLST (<https://pubmlst.org/>). Также применяли метод геномных фингерпринтов: ПЦР повторяющихся палиндромных элементов (Rep-ПЦР) с праймером BOX-A1R, 5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3', с разделением амплифицированных фрагментов электрофорезом в агарозном геле и типированием штаммов по числу и длине выявленных ампликонов.

Полногеномное секвенирование

Для проведения полногеномного секвенирования получали осадок клеток вышеописанным методом. ДНК выделяли с использованием *FastDNA SpinKit* (MP Biomedicals, США). Геномную библиотеку готовили с использованием набора *KAPA HyperPlus* (KAPA, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Библиотеку секвенировали на платформе *Illumina NovaSeq 6 000* в режиме парно-концевых прочтений 2×100 п. н. Предварительную обработку прочтений выполняли с использованием *Trimmomatic* версии 0.39 [32], затем проводили сборку генома с использованием *SPAdes* версии 3.14.0 [33]. Геномная сборка депонирована в базы данных DDBJ/ENA/GenBank под номером JAALEO000000000 (NCBI Sequence Set Browser <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/JAALEO01>) и аннотирована с применением NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline [34].

Анализ геномных данных

Идентификацию ферментных систем, расщепляющих С–Р-связь, проводили путем выявления последовательностей, гомологичных генам *phnJ* (С–Р-лиаза), *phnX* (ФНТ) [19]; также проводили поиск гомологов генов *GOX* [21] (GenBank: GU214711.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/GU214711.1>) и *GltA* [24] (GenBank: AY597418.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AY597418.1>).

Оценка биодеструктивных свойств изучаемых штаммов в почве

Биодеградацию ГФ в условиях почв проводили по ранее описанной методике [15]. Использовалась незагрязненная серая лесная почва, отобранная в Серпуховском районе Московской области. Сорбцию ГФ определяли по ранее описанной методике Шушковой и др. [35]; долю необратимо сорбированного гербицида затем вычитали из общей наблюдаемой убыли ГФ. В экспериментах использовали препарат Раундап (Roundup; Monsanto, США), который вносили из расчета 100 мг средства (36 мг ГФ) на 1 кг почвы в виде 0,05%-ного водного раствора. Для эксперимента было подготовлено 18 опытных и 6 контрольных емкостей с 50 г стерильной абсолютно сухой почвы в каждом. В опытные емкости и в три контрольные вносили Раундап и выдерживали в течение 3 сут для сорбции ГФ на почвенных частицах, три емкости использовали как отрицательный контроль. Суспензию бактерий-деструкторов, выращенных в минимальной среде с ГФ [15] до концентрации 0,6 г/л (в расчете на сухую биомассу), наносили на поверхность почвы из расчета 1 л на 1 м². Отбор проб проводили сразу после внесения микробной суспензии в опытные образцы и через 21 сут инкубации. Титр клеток штаммов-деструкторов определяли путем отбора 5 г почвенных образцов, получения суспензии в 45 мл стерильной воды и последовательных разведений 10⁻⁶–10⁻³ с посевом на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей Раундап в концентрации 1,6 мл/л. Учет выросших колоний проводили через 48 ч.

Химический состав почвенных проб анализировали спектрофотометрически и методом ВЭЖХ [15]. Пробы для ВЭЖХ-анализа обрабатывали 20%-ной серной кислотой в соотношении 5:1 (проба : 20% H₂SO₄) для осаждения гуминовых кислот. После инкубации при 4 °С в течение 20 мин пробы центрифугировали 3 мин при 12 000 g и отобранный супернатант пропускали через мембранные фильтры 0,2 мкм MiniSart NML (Sartorius, США).

Все эксперименты проводили в 3 повторах с вычислением доверительного интервала при уровне значимости 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В литературе показана корреляция между скоростью деградации ГФ в почве и долей псевдомонад в почвенном микробиоме [36], среди эффективных почвенных биодеструкторов также описаны представители родов *Ochrobactrum* [27, 37, 38] и *Bacillus* [11, 12, 14]. Однако основная доля эффективно утилизирующих ГФ как источник

фосфора бактерий в лабораторной коллекции принадлежала роду *Achromobacter* (табл. 1). Можно предположить, что многие псевдомонады не продуцируют С–Р-лиазу в полевых условиях и лишь превращают гербицид в АМФК [9, 39], а бациллы с конститутивной С–Р-лиазой, позволяющей потреблять ГФ как источник углерода и фосфора, встречаются редко [14].

Из шести изолятов *Achromobacter* четыре были определены как *A. aegrifaciens* (штаммы МРК 7, MPS 12, Кг 16, Км 11), два — как *A. insolitus* (штаммы Кг 19, Кг 13). Оба вида описаны как госпитальные факультативные патогены, способность утилизировать ОФ у них ранее не регистрировали [30, 40]. Типированием на основе мультилокусных последовательностей (MLST) и методом геномных фингерпринтов мы доказали принадлежность изолятов к пяти геногруппам по вариациям аллели NrdA_765 и к трем группам по набору повторяющихся палиндромных элементов (табл. 1). Эти данные позволяют говорить о том, что способности к биодеструкции ГФ штаммоспецифичны, то есть являются характеристикой не рода, вида или геногруппы, а конкретного штамма бактерий. Так, принадлежащие к одной геногруппе и выделенные из одного образца почвы *A. aegrifaciens* Кг 16 и МРК 7 различались по адаптируемости к ГФ, по биохимии утилизации этого соединения, удельной активности его деструкции и обладали разными ростовыми характеристиками. Напротив, физиологические параметры *A. aegrifaciens* МРК 7 были практически идентичны таковым у *A. aegrifaciens* MPS 12, изолированного из почв другого географического региона и принадлежащего к другой геногруппе. Важно отметить, что для штаммов *A. aegrifaciens* МРК 7, MPS 12 и Км 11 потребовалась адаптация к потреблению ГФ; исходные почвенные изоляты не могли потреблять гербицид как источник фосфора. Адаптированные варианты обозначены как МРК 7А, MPS 12А и Км11А соответственно.

Подобная гетерогенность популяций бактерий, населяющих загрязненные ОФ сайты, должна обеспечивать наилучшую приспособляемость к меняющимся условиям среды, прежде всего, к изменению основного источника фосфора (ГФ, АМФК, органические/неорганические фосфаты). С другой стороны, штаммоспецифичность биодеструктивных свойств затрудняет выявление и отбор эффективных деструкторов ГФ с ожидаемыми биохимическими параметрами с помощью методик генетического типирования или метагеномного анализа.

Для штаммов, представляющих практический интерес (*A. aegrifaciens* МРК 7, MPS 12, Кг 16 и Км 11) определена устойчивость к ряду

Исследованные штаммы-деструкторы и их физиологические параметры утилизации ГФ

List of degrading strains investigated and their physiological characteristics of GP utilization

Параметры	<i>A. aegrifaciens</i>							<i>A. insolitus</i>	
	Km 11	Km 11A	Kg 16	MPK 7	MPK 7A	MPS 12	MPS 12A	Kg 13	Kg 19
Источник образца/ОФ в накопительной культуре ^a	Краснодар/ГФ	Лаборатория	Краснодар/ГФ	Краснодар/ГФ	Лаборатория	Шиханы/МФК	Лаборатория	Краснодар/ГФ	Краснодар/ГФ
Субстрат для поддержания в музее	МФК	ГФ	ГФ/МФК ^b	МФК	ГФ	МФК	ГФ	ГФ	ГФ
Необходимость в адаптации к ГФ	Да	Проведена	Нет	Да	Проведена	Да	Проведена	Нет	Нет
Максимальная биомасса при росте на ГФ, г/л	0,1±0,05	0,7±0,2	1,2±0,1	0,2±0,05	1,6±0,1	0,2±0,1	2,3±0,4	2,1±0,4	1,6±0,2
Удельная деструкция ГФ, мг/г биомассы	н/о ^c	97±8	71±6	н/о	57±4	н/о	50±4	59±3	74±9
Аллель <i>NrdA_765</i>	69		280			100		6	9
Группа по геномному фингерпринту	1		2			3		1	н/о

^aИсточник фосфора в накопительной культуре соответствовал ОФ-загрязнителю в месте отбора образцов почв.

^bПосле каждых трех пассажей на среде с ГФ производили один пассаж на среде с МФК.

^cн/о — не определяли.

^aPhosphorus source in enrichment culture corresponded to OP pollutant at isolation site.

^bA passage on media with MPA was necessary after 3 consequent passages on GP.

^cн/о — not determined.

антибиотиков и противомикробных соединений (табл. 2). Отмечена резистентность к стрептомицину и эритромицину, несколько меньшая — к канамицину, ампициллину и цефалексину, что соотносится с почвенными условиями обитания этих бактерий в природе и высокой вероятностью контакта со стрептомицетами и грибами. Рост всех четырех бактерий подавлялся в присутствии азлоциллина, цефтазидима и некоторых синтетических (офлоксацин) и полусинтетических (доксидиклин) препаратов. Штамм *A. aegrifaciens* MPS 12, выделенный из почв г. Шиханы, обладал большей антибиотикоустойчивостью по сравнению с представителями того же вида, выделенными из почв Краснодара.

В результате анализа полногеномных последовательностей дополнены биохимические данные по ферментным путям деструкции ГФ и АМФК для штаммов *A. aegrifaciens* Kg 16 и Km 11A и *A. insolitus* Kg 19 и Kg 13 (табл. 3). Все исследованные штаммы обладали активной С–Р-лиазой, однако только для *A. aegrifaciens* Kg 16, МРК 7А, МРК 12А [27, 28] и Km 11А показана специфичность ферментного комплекса к ГФ. ФНТ присутствовала у всех изучаемых бактерий. АМФК обнаруживали в культуральных средах и клеточных гомогенатах

A. aegrifaciens Kg 16 и МРК 7А [28], а также в следовых количествах ($\leq 0,05$ мкМ) в средах культивирования *A. insolitus* Kg 19 и Kg 13 при исчерпании источника углерода. В геномах *A. aegrifaciens* Kg 16 и *A. insolitus* Kg 19 и Kg 13 не выявлен ген ГОР, но у всех трех бактерий обнаружен ген глицинооксидазы (GenBank: CUJ12697.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CUJ12697.1>), участие которой в деградации ГФ у граммотрицательных бактерий пока не изучалось. У *A. aegrifaciens* Kg 16 ранее была выявлена уникальная для бактерии дикого типа способность ацетилировать ГФ [25]. В литературе описан один фермент с подобной активностью — ГАТ [24], но в хромосоме Kg 16 не обнаружен кодирующий ГАТ ген *GltA* или его гомологи. В состав С–Р-лиазного комплекса Kg 16 входит аминокилфосфонат-N-ацетилтрансфераза (PhnO), ацетилирующая АМФК и ряд других аминокилфосфонатов по первичному азоту [16], однако вопрос о способности этого фермента переносить ацетильный остаток на вторичный азот ГФ в литературе не рассматривался.

Оценку эффективности деструкции ГФ в почвах чистыми культурами бактерий проводили на примере адаптированных штаммов *A. aegrifaciens*: Km 11А,

Таблица 2

Устойчивость штаммов-деструкторов ОФ *A. aegrifaciens*: МРК 7, Кг 16, MPS 12 и Км 11 — к некоторым антибиотикам и антимикробным препаратам

Antibiotics and bacteriocidals resistance of *A. aegrifaciens* strains МРК 7, Кг 16, MPS 12 and Км 11

Антибиотик	Группа	Содержание на диске, мкг	Зона подавления роста, мм			
			МРК 7	Кг 16	MPS 12	Км 11
Рифампицин	Ансамицины	5	0	3	2	0
Тетрациклин	Тетрациклины	30	5	8	0	8
Доксициклин		30	10	10	5	10
Цефалотин		30	10	10	0	10
Цефтазидим	Цефалоспорины	30	10	10	8	10
Цефалексин		30	5	5	3	7
Канамицин	Аминогликозиды	30	0	10	5	5
Стрептомицин		30	0	0	0	0
Гентамицин		10	2	5	5	3
Офлоксацин	Фторхинолоны	5	5	5	3	5
Ципрофлоксацин		5	0	3	3	3
Эритромицин	Макролиды	15	0	0	0	0
Ампициллин	Пенициллины	10	5	3	0	5
Азлоциллин		75	15	15	10	15

Таблица 3

Ферментные системы катаболизма ОФ у изученных бактерий

Enzyme systems of OP catabolism in studied bacteria

Штамм	Ферменты катаболизма ОФ				
	С-Р-лиаза	ФНТ	ГОР	ФАГ	ГАТ
<i>A. aegrifaciens</i>					
Км 11	+/+	+/+	–	+/-	–
Км 11А	+/+ ^{ГФ}	+/+	–	+/-	–
Кг 16	+/+ ^{ГФ}	+/+	+/-	+/-	+/-
МРК 7	+/-	+/-	–	+/-	–
МРК 7А	+/- ^{ГФ}	+/-	–	+/-	–
MPS 12	+/-	+/-	–	–	–
MPS 12А	+/- ^{ГФ}	+/-	–	–	–
<i>A. insolitus</i>					
Кг 13	+/+	+/+	+/-	+/-	–
Кг 19	+/+	+/+	+/-	+/-	–

Примечание: ФНТ — фосфатаза; ФАГ — фосфоацетатгидролаза; ГОР — ГФ-оксидоредуктаза; ГАТ — ГФ-ацетилтрансфераза; (–) — фермент не обнаружен; (+/-) — наличие подтверждено физиологически по утилизации специфических субстратов, образованию характерных продуктов или по обнаружению активности фермента (ФНТ); (+/+) — наличие подтверждено физиологически и генетически (обнаружение генов *phnJ* и *phnX* для С-Р-лиазы и ФНТ соответственно); ^{ГФ} — С-Р-лиаза специфична в отношении ГФ.

Note: PNT — phosphonate; PAH — phosphonoacetate hydrolase; GOX — GP-oxidoreductase; GAT — GP-acetyltransferase; (–) — the enzyme was not detected; (+/-) — physiological evidence, i. e. utilization of specific substrates, formation of specific products or detection of enzyme activity (for PNT); (+/+) — physiological and genetic (detection of *phnJ* and *phnX* genes for С-Р lyase and PNT, respectively) evidence; ^{GP} — presence of GP-specific С-Р lyase.

MPS 12А и МРК 7А — в сравнении с *O. anthropi* GPK 3 и *A. aegrifaciens* Кг 16, которые ранее изучали в полевых условиях [15], и с *A. insolitus* Кг 13, который не требовал адаптации к ГФ. Все штаммы сохраняли биодеструктивную активность при

реинтродукции в почву (табл. 4), однако за 21 сут *A. insolitus* Кг 13 снижал содержание ГФ только на 7%, в то время как *A. aegrifaciens* МРК 7А и *A. aegrifaciens* Км 11А — на 51% и 56% соответственно. Это согласуется с наибольшей среди всех

Деструкция ГФ в почве под действием изученных бактерий в течение 21 суток

Degradation of GP in soil by studied bacterial strains in 21 days

ΔГФ	Время, сут	Стерильная почва	<i>A. aegrifaciens</i>				<i>A. insolitus</i>	<i>O. anthropi</i>
			Км 11А	Кг 16	МПК 7А	МПС 12А	Кг 13	ГПК 3
Извлечено ГФ, мг/кг почвы	0	37,4±0,5	32,2±0,4	40,3±0,2	33,5±0,2	32,3±0,5	37,3±0,2	35,4±0,1
	21	37,7±0,6	14,2±0,6	28,4±0,2	16,4±0,4	25,7±0,3	34,4±0,1	21,7±0,2
Убыль ГФ, мг/кг почвы		0	18,0±0,7	11,9±0,3	17,1±0,4	6,6±0,6	2,9±0,2	13,7±0,2

адаптированных бактерий ГФ-деструктирующей активностью *A. aegrifaciens* Км 11А в жидких средах, хотя его рост на среде с ГФ был ниже, чем у некоторых других штаммов (табл. 1). Результаты представлены с учетом сорбции ГФ, которая составляла 1,2±0,4 мг/кг почвы. Титр всех микроорганизмов в течение эксперимента снижался на один порядок (данные не приведены), что, скорее всего, связано с постепенным исчерпанием доступных источников углерода и фосфора в ходе эксперимента.

Как видно из табл. 4, деструкция ГФ под действием *A. aegrifaciens* МПС 12А происходит в два раза медленнее, чем под действием МПК 7А, хотя в жидких средах активности этих штаммов близки (табл. 1) и обе бактерии метаболизируют ГФ посредством С–Р-лиазы [27]. Низкая эффективность утилизации гербицида в почве под действием *A. aegrifaciens* МПС 12А может быть связана с подавлением экспрессии С–Р-лиазного оперона в присутствии фонового Р_i — как ранее показано для *Pseudomonas* sp. PG2982 [39]. *A. aegrifaciens* МПК 7А, видимо, менее подвержен этому эффекту — аналогично *B. cereus* 6 Р [14].

Адаптация к ГФ и поддержание бактериальных культур на средах с гербицидом оказывало влияние на утилизацию прочих ОФ (табл. 5). У *A. aegrifaciens* МПС 12 адаптация к ГФ значительно повысила удельную деструкцию 2-АЭФ, сходные результаты были получены ранее для *A. aegrifaciens* МПК 7 [28]. У *A. aegrifaciens* Км 11 повышение удельной деструкции после адаптации к ГФ отмечалось только для АМФК, напротив, эффективность утилизации 2-АЭФ снижалась.

Биохимические предпосылки феномена адаптации к потреблению ГФ не до конца понятны. Выявление необходимых для минерализации ГФ ферментов у всех изученных нами бактерий и обнаружение ГФ в гомогенатах как адаптированных, так и неадаптированных клеток указывает на то, что адаптация не сводится только к вопросу наличия или отсутствия генетических детерминант ферментов транспорта и метаболизма

ГФ. Также адаптация не может объясняться лишь индукцией уже имеющихся ферментных систем, иначе не потребовались бы многократные пассажы [27, 28]. Мы полагаем, что изменения, происходящие с бактериальной культурой в ответ на необходимость потребления ОФ, являются совокупным результатом как отбора клеток, устойчивых к токсическому действию ОФ и обладающих более специфичными к данному соединению транспортными и каталитическими системами, так и работы нескольких механизмов регуляции экспрессии, в том числе неизвестных. О последнем свидетельствует влияние адаптации к потреблению одного ОФ на утилизацию других (табл. 5), а также впервые обнаруженная нами индукция ФНТ в присутствии ГФ у *A. insolitus* Кг 19 и *A. aegrifaciens* Км 11А. Ранее нами показано, что предшественник природного субстрата ФНТ– 2-АЭФ — самый слабый индуктор фермента [10]. Аминокислотный состав активного центра фермента ФНТ, ген которого присутствует в хромосоме *A. insolitus* Кг 19 (NCBI Sequence Set Browser <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/JAAL001>), оказался аналогичен таковому для известного ФНТ *B. cereus* (данные готовятся к публикации), для которого постулируется строгая субстратная специфичность [41]. Хотя непосредственное участие ФНТ в катаболизме ГФ маловероятно, повышенная экспрессия этого белка в присутствии гербицида позволяет предположить существование у *A. insolitus* Кг 19 и *A. aegrifaciens* Км 11А специфичной к ГФ системы регуляции экспрессии, аналогичной LysR-подобному белку-активатору транскрипции генов фосфонатазного пути [2, 42]. Наличием фосфатнезависимой системы активации синтеза ферментов катаболизма ГФ, скорее всего, объясняется и высокая эффективность катаболизма гербицида у *B. cereus* 6 Р [14]. Выявление и изучение таких механизмов крайне важно для понимания принципов регулирования биодеградации ГФ и станет приоритетной задачей при дальнейшей работе со штаммами Кг 19 и Км 11А.

Удельная деструкция ОФ, приведенная к общему потребленному фосфору, у адаптированных к ГФ бактерий

Specific OP degradation normalized to total phosphorus uptake in bacterial strains adapted to GP

Источник фосфора в среде	<i>A. aegrifaciens</i>				<i>A. insolitus</i>	
	Km 11	Km 11A	MPS 12	MPS 12A	Kg 13	Kg 19
2-АЭФ	11,1±0,3	9,2±2,2	4,4±0,1	11,9±0,4	13,8±3,1	15,6±1,5
АМФК	2,5±0,2	9,9±0,6	7,0±0	5,6±3,2	5,8±0,5	н/о
МФК	18,6±2,8	16,6±2,4	18,2±2,7	19,3±2,5	6,2±0,6	16,8±1,9
ГФ	~0	5,7±3,6	~0	9,2±0,7	10,8±0,9	13,5±1,6
ФА	11,5±5,1	10,7±4,5	10,2±0,5	10,7±0,5	4,4±1,3	н/о
ФМН	12,2±5	11,2±0,7	13,0±3,5	7,3±2,1	5,2±1,4	н/о

Примечание: Результаты представлены как мг Р/г биомассы; данные для штаммов МРК 7, МРК 7А и Кг 16 опубликованы ранее [28]; н/о — не определяли.

Note: The results are present as mg P/g biomass; data for strains МРК 7, МРК 7А and Кг 16 were published earlier [28]; н/о — not determined.

В прикладных исследованиях микробной деструкции ГФ и АМФК складывается парадоксальная ситуация. С одной стороны, целый ряд крайне эффективных деструкторов ГФ предложен как основа перспективных технологий ремедиации [11, 12, 14, 37], другие бактерии-деструкторы успешно испытаны в полевых условиях и запатентованы [15]. С другой стороны, недостаток данных о ключевых биохимических и генетических аспектах метаболизма ГФ затрудняет внедрение этих бактерий в практику. Неясно, какие именно факторы ограничивают способность бактерий потреблять гербицид как источник фосфора при наличии у них набора ферментов, формально достаточных для этого. Кроме ГАТ, нет данных о ферментах, способных ацетилировать ГФ. Предполагается существование фосфатнезависимых субстратспецифичных систем регуляции экспрессии С-Р-лиазы, ФНТ и ГОР-подобных ГФ-оксидаз, но их природа и механизм работы пока не исследованы. Решение перечисленных проблем — необходимое условие для успешной разработки надежной и конкурентоспособной биотехнологии очистки загрязненных ГФ, АМФК и МФК сред. Для этого потребуются системный подход, в котором биохимические и физиологические данные послужат базисом для биоинформационного анализа бактериальных геномов, результаты которого, в свою очередь, позволят скорректировать направление биохимических исследований и отбросить ложные гипотезы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование фосфонатаз и полногеномное секвенирование проведено при поддержке гранта РФФИ 18-074-00021.

ЛИТЕРАТУРА

- White A.K., Metcalf W.W. Microbial metabolism of reduced phosphorus compounds. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2007, 61, 379–400. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093357
- McGrath J.W., Chin J.P., Quinn J.P. Organophosphonates revealed: new insights into the microbial metabolism of ancient molecules. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2013, 11(6), 412–419. doi:10.1038/nrmicro3011
- Ермакова И.Т., Шушкова Т.В., Леонтьевский А.А. Микробная деструкция органофосфонатов почвенными бактериями. *Микробиология*, 2008, 77(5), 689–695.
- Horsman G.P., Zechel D.L. Phosphonate biochemistry. *Chem. Rev.*, 2017, 117(8), 5704–5783. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00536
- Benbrook C.M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ. Sci. Eur.*, 2016, 28(3), 1–15. doi: 10.1186/s12302-016-0070-0
- Kniss A.R. Long-term trends in the intensity and relative toxicity of herbicide use. *Nat. Commun.*, 2017, 8, 14865. doi: 10.1038/ncomms14865.
- Mesnage R., Defarge N., Spiroux de Vendomois J., Seralini G.E. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food Chem. Toxicol.*, 2015, 84, 133–153. doi: 10.1016/j.fct.2015.08.012
- Bai S.H., Ogbourne S.M. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 2016, 23(19), 18988–19001. doi: 10.1007/s11356-016-7425-3
- Zhan H., Feng Y., Fan X., Chen S. Recent advances in glyphosate biodegradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, 102(12), 5033–5043. doi: 10.1007/s00253-018-9035-0

10. Свиридов А.В., Эпиктетов Д.О., Шушкова Т.В. и др. Фосфорорганические нейротоксины. Москва: РИОР, 2020, 253–285.
11. Fan J., Yang G., Zhao H., et al. Isolation, identification and characterization of a glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2012, 58(4), 263–271. doi: 10.2323/jgam.58.263
12. Yu X.M., Yu T., Yin G.H., et al. Glyphosate biodegradation and potential soil bioremediation by *Bacillus subtilis* strain Bs-15. *Genet. Mol. Res.*, 2015, 14(4), 14717–14730. doi: 10.4238/2015
13. Huntscha S., Stravs M.A., Bühlmann A., et al. Seasonal dynamics of glyphosate and AMPA in lake Greifensee: rapid microbial degradation in the epilimnion during summer. *Environ. Sci. Technol.*, 2018, 52(8), 4641–4649. doi: 10.1021/acs.est.8b00314
14. Acosta-Cortés A.G., Martínez-Ledezma C., López-Chuken U.J., et al. Polyphosphate recovery by a native *Bacillus cereus* strain as a direct effect of glyphosate uptake. *ISME J.*, 2019, 13(6), 1497–1505. doi: 10.1038/s41396-019-0366-3
15. Ermakova I.T., Kiseleva N.I., Shushkova T., et al. Bioremediation of glyphosate-contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 88(2), 585–594. doi: 10.1007/s00253-010-2775-0
16. Hove-Jensen B., Zechel D.L., Jochimsen B. Utilization of glyphosate as phosphate source: biochemistry and genetics of bacterial carbon-phosphorus lyase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2014, 78(1), 176–197. doi: 10.1128/MMBR.00040-13
17. Lyagin I.V., Andrianova M.S., Efremenko E.N. Extensive hydrolysis of phosphonates as unexpected behavior of the known His₆-organophosphorus hydrolase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, 100(13), 5829–5838. doi: 10.1007/s00253-016-7407-x
18. Villareal-Chiu J.F., Quinn J.P., McGrath J.W. The genes and enzymes of phosphonate metabolism by bacteria, and their distribution in the marine environment. *Front. Microbiol.*, 2012, 3(19), 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2012.00019
19. Sosa O.A., Repeta D.J., DeLong E.F., et al. Phosphate-limited ocean regions select for bacterial populations enriched in the carbon-phosphorus lyase pathway for phosphonate degradation. *Environ. Microbiol.*, 2019, 21(7), 2402–2414. doi: 10.1111/1462-2920.14628
20. Свиридов А.В., Шушкова Т.В., Ермакова И.Т., с соавт. Микробная деградация гербицида глифосата (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*, 2015, 51(2), 183–190.
21. Kishore G.M., Barry G.F. Glyphosate tolerant plants. US Patent, US5463175A, 1995.
22. Pedotti M., Rosini E., Molla G., et al. Glyphosate resistance by engineering the flavoenzyme glycine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 2009, 284(51), 36415–36423. doi: 10.1074/jbc.M109.051631
23. Yao P., Lin Y., Wu G., et al. Improvement of glycine oxidase by DNA shuffling, and site-saturation mutagenesis of F247 residue. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2015, 79, P. 965–970. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.05.030
24. Castle L.A., Siehl D.L., Gorton R., et al. Discovery and directed evolution of a glyphosate tolerance gene. *Science*, 2004, 304(5674), 1151–1154. doi: 10.1126/science.1096770
25. Shushkova T.V., Vinokurova N.G., Baskunov B. P., et al. Glyphosate acetylation as a specific trait of *Achromobacter* sp. Kg 16 physiology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, 100(2), 847–855. doi: 10.1007/s00253-015-7084-1
26. Kertesz M., Elgorriaga A., Amrhein N. Evidence for two distinct phosphonate-degrading enzymes (C-P lyases) in *Arthrobacter* sp. GLP-1. *Biodegradation*, 1991, 2(1), 53–59. doi: 10.1007/bf00122425
27. Sviridov A.V., Shushkova T.V., Zelenkova N. F., et al. Distribution of glyphosate and methylphosphonate catabolism systems in soil bacteria *Ochrobactrum anthropi* and *Achromobacter* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 93(2), 787–796. doi 10.1007/s00253-011-3485-y
28. Ermakova I.T., Shushkova T.V., Sviridov A.V., et al. Organophosphonates utilization by soil strains of *Ochrobactrum anthropi* and *Achromobacter* sp. *Arch. Microbiol.*, 2017, 199(5), 665–675. doi: 10.1007/s00203-017-1343-8
29. Sviridov A.V., Zelenkova N.F., Vinokurova N.G., et al. New approaches to identification and activity estimation of glyphosate degradation enzymes. *Biochemistry (Moscow)*, 2011, 76(6), 720–725. doi: 10.1134/S0006297911060149
30. Spilker T., Vandamme P., LiPuma J.J. A multilocus sequence typing scheme implies population structure and reveals several putative novel *Achromobacter* species. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, 50(9), 3010–3015. doi: 10.1128/JCM.00814-12
31. Spilker T., Vandamme P., LiPuma J.J. Identification and distribution of *Achromobacter* species in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.*, 2013, 12(3), 298–301. doi: 10.1016/j.jcf.2012.10.002
32. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 2014, 30(15), 2214–2220. doi 10.1093/bioinformatics/btu170
33. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.*, 2012, 19(5), 455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021.
34. Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., et al. NCBI Prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res.*, 2016, 44(14), 6614–6624. doi: 10.1093/nar/gkw569
35. Shushkova T.V., Vasilieva G.K., Ermakova I.T., Leontievsky A.A. Sorption and microbial degradation of glyphosphate in soil suspensions. *Appl. Biochem.*

Microbiol., 2009, 45(6), 599–603.
doi: 10.1134/S0003683809060040

36. Gimsing A.L., Borggaard O.K., Jacobsen O.S., et al. Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate mineralization in Danish surface soils. *Appl. Soil Ecol.*, 2004, 27(3), 233–242. doi: 10.1016/j.apsoil.2004.05.007
37. Hadi F., Mousavi A., Noghabi K.A., et al. New bacterial strain of the genus *Ochrobactrum* with glyphosate-degrading activity. *J. Environ. Sci. Health B.*, 2013, 48(3), 208–213. doi: 10.1080/03601234.2013.730319
38. Firdous S., Iqbal S., Anwar S., Jabeen H. Identification and analysis of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) gene from glyphosate-resistant *Ochrobactrum intermedium* Sq20. *Pest Manag. Sci.*, 2018, 74(5), 1184–1196. doi: 10.1002/ps.4624
39. Bazot S., Lebeau T. Simultaneous mineralization of glyphosate and diuron by a consortium of three bacteria as free-and/or immobilized-cells formulations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 77(6), 1351–1358. doi: 10.1007/s00253-007-1259-3
40. Vandamme P., Moore E.R., Cnockaert M., et al. Classification of *Achromobacter* genogroups 2, 5, 7 and 14 as *Achromobacter insuavis* sp. nov., *Achromobacter aegrifaciens* sp. nov., *Achromobacter anxifer* sp. nov. and *Achromobacter dolens* sp. nov., respectively. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2013, 36(7), 474–482. doi: 10.1016/j.syapm.2013.06.005
41. Zhang G., Mazurkie A.S., Dunaway-Mariano D., Allen K.N. Kinetic evidence for a substrate-induced fit in phosphonoacetaldehyde hydrolase. *Biochemistry*, 2002, 41(45), 13370–13377. doi: 10.1021/bi026388n
42. Quinn J.P., Kulakova A.N., Cooley N.A., McGrath J.W. New ways to break an old bond: the bacterial carbon-phosphorus hydrolases and their role in biogeochemical phosphorus cycling. *Environ. Microbiol.*, 2007, 9(10), 2392–2400. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01397.x

Biodegradation of Organophosphorus Pollutants by Soil Bacteria: Biochemical Aspects and Unsolved Problems

A.V. SVIRIDOV^{1*}, T.V. SHUSHKOVA¹, D.O. EPIKTETOV¹, S.V. TARLACHKOV^{1,2}, I.T. ERMAKOVA¹, and A.A. LEONTIEVSKII¹

¹ G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Pushchino, Moscow Oblast, 142290, Russia

² Pushchino Branch of M.M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Oblast, 142290, Russia

*e-mail: alhummen@rambler.ru

Received March 20, 2020

Revised April 14, 2020

Accepted July 22, 2020

The degradation of persistent organophosphorus pollutants have been studied in 6 soil bacterial isolates and in 3 bacterial strains adapted for utilization of glyphosate herbicide (GP) under laboratory conditions. Significant differences in the uptake of organophosphonates were found in taxonomically close strains possessing similar enzymatic pathways of catabolism of these compounds, which indicates the existence of unknown mechanisms of activity regulation of these enzymes. The effect of adaptation for GP utilization as a sole phosphorus source on assimilation rates of several other phosphonates was observed in studied bacteria. The newly found efficient stains provided up to 56% of GP decomposition after application to the soil in the laboratory. The unresolved problems of microbial GP metabolism and the trends for further research on the creation of reliable biologicals capable of decomposing organophosphonates in the environment are discussed.

Key words: organophosphonates, glyphosate, biodegradation, bioremediation, C-P lyase, phosphonate, degrading bacteria

Funding—Investigation of phosphonate and genome sequencing were supported by Russian Science Foundation Grant no. 18-074-00021.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-126-135