

УДК 579.222

DOI: 10.17072/1994-9952-2021-2-93-100.

Э. А. Назарова^a, М. Г. Первова^b, Д. О. Егорова^{a,c}

^a Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

^b Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург, Россия

^c Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

РАЗНООБРАЗИЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ АЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЛИНДАН-ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ

Установлено, что в почвах, отобранных на территории ОАО «Средне-Волжский завод химикатов» г. Чапаевск Самарской обл. в 2013 г. концентрация линдана варьирует в диапазоне 0.393–53.449 мг/кг почвы. Из почв выделены 26 штаммов аэробных культивируемых бактерий. Показано, что существует прямая корреляционная зависимость между уровнем загрязнения почвенного образца линданом и количеством изолированных штаммов. Доминирующее положение занимают представители филума *Proteobacteria*, классов α -, β - и γ -*Proteobacteria*. Установлено, что штаммы *Ochrobactrum* sp. NE3 и *Ochrobactrum* sp. 132 осуществляют разложение побочных продуктов биотрансформации линдана (1,2,4-ТХБ и 2,5-ДХФ) и могут быть рекомендованы для использования в биотехнологиях ремедиации линдан-загрязненных почв для предотвращения накопления опасных соединений.

Ключевые слова: линдан; аэробные бактерии; селекция; деструкция.

E. A. Nazarova^a, M. G. Pervova^b, D. O. Egorova^{a,c}

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russian Federation

^b Postovsky Institute of Organic Synthesis Ural Branch of the RAS, Ekaterinburg, Russian Federation

^c Perm State University, Perm, Russian Federation

Diversity of culturable aerobic bacteria isolated from lindane-contaminated soils

It was found that in the soils sampled on the territory of OJSC "Sredne-Volzhsky plant of chemicals" in Chapaevsk, Samara region in 2013, the concentration of lindane varies in the range of 0.393 - 53.449 mg / kg of soil. 26 strains of aerobic culturable bacteria were isolated from soils. It was shown that there is a direct correlation between the level of contamination of the soil sample with lindane and the number of isolated strains. The dominant position is occupied by representatives of the phylum *Proteobacteria*, classes α -, β - and γ -*Proteobacteria*. It was found that strains of *Ochrobactrum* sp. NE3 and *Ochrobactrum* sp. 132 decompose by-products of biotransformation of lindane (1,2,4-TCB and 2,5-DCP), and can be recommended for use in biotechnologies for remediation of lindane-contaminated soils to prevent the accumulation of hazardous compounds.

Key words: lindane; aerobic bacteria; selection; destruction.

Введение

Линдан (γ -гексахлорциклогексан/ γ -ГХЦГ) включен в список стойких органических загрязнителей (СОЗ) в 2009 г. и подлежит полному уничтожению и выводу из производства и применения [Vijgen et al., 2011]. Значительные количества линдана были вынесены в окружающую среду в результате его применения в сельском хозяйстве в качестве пестицида. Кроме того, территории заводов, на которых производили линдан, и прилегающие к ним районы до настоящего момента являются сильно загрязненными данным соединением

[Vijgen et al., 2011].

По химической структуре ГХЦГ представляет собой цикл из 6 углеродных атомов, у каждого из которых в качестве заместителя расположен атом хлора. В зависимости от пространственной конфигурации молекулы выделяют α -, β -, γ -, δ - изомеры [Willet, Utrich, Hites, 1998]. Строение молекулы обуславливает уникальные химические свойства, благодаря которым гексахлорциклогексаны, в том числе и линдан (γ -ГХЦГ), устойчивы к воздействию факторов внешней среды и оказывают токсическое действие на живые организмы.

Длительное присутствие в почве чужеродных

для природы химических соединений оказывает влияние на состав микробоценозов. Преимущественное развитие получают группы бактерий, устойчивые к токсическому действию данных соединений, либо способные использовать данные соединения в качестве источников углерода и энергии. В литературе описан ряд аэробных бактерий, осуществляющих разложение линдана до соединений основного обмена веществ клетки, однако при этом происходит формирование экотоксичных побочных продуктов, таких как 1,2,4-трихлорбензол и 2,5-дихлорфенол [Nagata et al., 2007; Lal et al., 2010; Camacho-Pérez et al., 2012; Chuang et al., 2020].

Одним из районов с высоким уровнем загрязнения линданом в России является территория ОАО «Средне-Волжский завод химикатов», расположенного в г. Чапаевске Самарской обл. [Revich et al., 2001; Vijgen et al., 2011]. Вследствие продолжительного присутствия γ -ГХЦГ в почве данной территории можно предположить, что микробоценоз претерпел сукцессионные изменения и адаптировался к действию линдана. В связи с этим представляет интерес изучение аэробных бактерий, формирующих микрофлору данных почв.

Цель исследования – изучить разнообразие культивируемых аэробных бактерий из почв, длительное время загрязненных линданом, а также исследовать способность данных штаммов использовать в качестве источников углерода соединения, образующиеся при биодеструкции линдана.

Материалы и методы исследования

Почвенные образцы

Образцы почв были отобраны на территории ОАО «Средне-Волжский завод химикатов» (ОАО «СВЗХ») г. Чапаевск Самарской обл. в 2013 г. Отбор почв производили согласно ГОСТ 17.4.3.01-82. Транспортировка и хранение почв осуществлялись с соблюдением температурного режима.

Анализ почв на содержание линдана

Пробу почвы 10 г заворачивали в фильтр «белая лента», помещали в аппарат Сокслета и экстрагировали смесью гексан : ацетон в соотношении 50 : 70 в течение 3 ч. После экстракции колбу с экстрактом охлаждали до комнатной температуры. Охлажденный экстракт сливали в делительную воронку и приливали около 150 мл дистиллированной воды, встряхивали 2 раза по 2 мин. После разделения фаз водный раствор ацетона удаляли, а гексановый экстракт сушили над безводным сульфатом натрия в течение 15–20 мин. Высушенный экстракт помещали в грушевидную колбу и проводили отгонку гексана на ротационном испарителе при вакууме, создаваемом водоструйным насосом,

и экстракт концентрировали до объема 3 мл. Полученный экстракт переливали в делительную воронку на 25 мл, в колбу добавляли 2 мл гексана, смывали остатки раствора и присоединяли к экстракту. Объем экстракта составил 5 мл. В воронку добавляли 2 мл концентрированной серной кислоты, встряхивали, после расслоения фаз кислотный слой отделяли и гексановый слой промывали 10 мл дистиллированной воды. После расслоения фаз гексановый экстракт отделяли и сушили 10 мин. над безводным сульфатом натрия, проводили анализ полученного раствора в условиях ГХ-ПИД, ГХ-ЭЗД и ГХ-МСД.

ГХ-ПИД условия: газовый хроматограф «Shimadzu GC 2010», с пламенно-ионизационным детектором (ГХ-ПИД), кварцевой капиллярной колонкой ZB-5 длиной 30 м, диаметром 0.25 мм, толщина пленки 0.25 мкм. Начальная температура колонки 40°C (выдержка 3 мин.), далее нагрев со скоростью 10°C/мин., до 280°C (выдержка 30 мин.). Температура испарителя 250°C, детектора 300°C. Газ-носитель – азот, деление потока 1:30, расход через колонку 1.0 мл/мин. Вводили 1.0 мкл.

ГХ-ЭЗД условия: газовый хроматограф «Shimadzu GC 17A», с электронно-захватным детектором (ГХ-ЭЗД), кварцевой капиллярной колонкой ZB-5 длиной 30 м, диаметром 0.25 мм, толщина пленки 0.25 мкм. Начальная температура колонки 40°C (выдержка 3 мин.), далее нагрев со скоростью 10°C/мин., до 270°C (выдержка 30 мин.). Температура испарителя 250°C, детектора 300°C. Газ-носитель – азот, деление потока 1:30, расход через колонку 1.0 мл/мин. Вводили 1.0 мкл.

ГХ-МСД условия: газовый хроматограф-масс-спектрометр «Agilent GC 7890A MS 5975C Inert XL EI/CI» с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором, кварцевой капиллярной колонкой HP-5MS длиной 30 м, диаметром 0.25 мм, толщина пленки 0.25 мкм.; электронная ионизация при энергии излучения 70 эВ; сканирование по полному ионному току в интервале m/z 20-1000 Da; газ-носитель – гелий, деление потока 1:50, расход через колонку 1.0 мл/мин; температура колонки – начальная 40°C (выдержка 3 мин.), программирование со скоростью 10°C/мин. до 290°C (выдержка 30 мин.), температура испарителя – 250°C, температура источника – 230°C, квадруполь – 150°C, переходной камеры – 280°C. Вводили 1.0 мкл.

Количественную оценку содержания линдана проводили по методу абсолютной градуировки с использованием градуировочных растворов, приготовленных из ГСО состава линдана № 1855-91П.

Среды культивирования, реактивы

Минеральная среда Раймонда, состава (г/л): K_2HPO_4 – 2.0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 7.56, NH_4NO_3 –

2.0, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.41, Na_2CO_3 – 0.1, $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 0.013. Среда Luria-Bertani (LB), состава (г/л): триптон – 10.0, дрожжевой экстракт – 5.0, $NaCl$ – 10.0. Для получения плотных питательных сред вносили агар-агар до конечной концентрации 1.5%.

В работе использовали аналитически чистые химические реактивы, линдан (>98%), 1,2,4-трихлорбензол (1,2,4-ТХБ) (>98%), 2,5-дихлорфенол (2,5-ДХФ) (>98%), 2,5-дихлоргидрохинон (>98%), катехол (>98%), фирмы Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Накопительное культивирование

10 г почвенного образца помещали в колбу Эрленмейера объемом 250 мл, содержащую 100 мл среды Раймонда и линдан (1 г/л). Культивирование осуществляли на термостатируемой качалке Environmental Shaker-Incubator ES-20/60 («BioSan», Латвия) со скоростью 120 об/мин и 28°C.

Выделение аэробных культивируемых бактериальных штаммов

Выделение индивидуальных штаммов производили высевом суспензии накопительной культуры на агаризованную среду Раймонда с линданом с применением классического метода серийных разведений. Контроль морфологии колоний осуществляли при высевах бактериальных штаммов на агаризованную среду LB.

Идентификация выделенных бактерий

ДНК из чистых культур бактерий выделяли общепринятым методом [Short protocols ..., 1995]. Идентификацию бактерий осуществляли при амплификации гена 16S рРНК с использованием стандартных бактериальных праймеров 27F и 1492R.

Секвенирование и анализ генов 16S рРНК

Нуклеотидные последовательности определяли с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1 («Applied Biosystems», США) на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL («Applied Biosystems», США) согласно рекомендациям производителя. Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием программ MEGA X (<http://www.megasoftware.net>). Поиск гомологичных последовательностей проводили в базе данных EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net>).

Периодическое культивирование

Бактериальную культуру, взятую с плотной питательной среды, помещали в колбу Эрленмейера объемом 250 мл, содержащую 100 мл среды Рай-

монда и 10 мг одного из субстратов (линдан, 1,2,4-ТХБ, 2,5-ДХФ). Культивирование проводили на термостатируемой круговой качалке (Environmental Shaker-Incubator ES 20/60, «BioSan», Латвия) при 120 об/мин и +28°C. Отбор образцов для анализа производили на 10-, 16- и 57-е сут. Оптическую плотность культуры измеряли на спектрофотометре UV-Visible BioSpec-mini («Shimadzu», Япония) при $\lambda_{\text{макс}} = 600$ нм.

Деструкция 1,2,4-ТХБ и 2,5-ДХФ

При исследовании деструкции 1,2,4-ТХБ и 2,5-ДХФ бактериальные культуры, выращенные на среде LB и дважды отмытые в среде Раймонда переносили во флаконы с тефлоновыми крышками, содержащими 5 мл среды Раймонда и добавляли субстраты 1,2,4-ТХБ или 2,5-ДХФ до конечной концентрации 0.1 г/л. Концентрация клеток составила 1×10^6 КОЕ/мл. Культивирование осуществляли на шейкере (Environmental Shaker-Incubator ES 20/60, «BioSan», Латвия) 200 об/мин при +28°C и при +7°C.

Анализ культуральной жидкости на содержание 1,2,4-ТХБ, 2,5-ДХФ и ионов хлора

ГХ-МС анализ содержания 2,5-дихлорфенола в среде культивирования проводили в хлороформном экстракте культуральной жидкости, который предварительно обезвоживали добавлением сульфата натрия, с помощью метода хромато-масс-спектрометрии (ХМС) («Agilent 6890/5973N», США) с масс-селективным детектором, кварцевой колонкой "RESTEK RTx-5MS" ("Restek", США). В качестве газа-носителя использовали гелий, скорость потока 1 мл/мин. Объем впрыска 1.0 мкл. Режим нагревания: температура испарителя 220°C, начальная температура колонки 60°C (2-минутная экспозиция), с последующим нагреванием при 20°C мин.⁻¹ до 300°C. Общее время анализа 14 мин. Анализ хроматограмм проводили программой MSD Productivity ChemStation ("Agilent", США). Расчет концентрации анализируемых веществ вели по площадям пиков в сравнении с площадью пиков контрольного образца. Эксперимент проводили в трехкратной повторности.

Эффективность деструкции 1,2,4-ТХБ и 2,5-ДХФ определяли методом ВЭЖХ. Для анализа культуральную жидкость очищали от бактериальных клеток центрифугированием (9660 г в течение 3 мин. на центрифуге miniSpin («Eppendorf», Германия)). Наличие в супернатанте 1,2,4-ТХБ и 2,5-ДХФ определяли на хроматографе LC-20A («Shimadzu», Япония) с колонкой Discovery C18 (150 × 4.6 мм или 250 × 4.6 мм) («Supelco», «Sigma-Aldrich», США) и УФ-детектором при 205 нм. Анализ проводили в системе ацетонитрил-0.1%-ный H_3PO_4 (70:30). Идентификация – с

помощью сравнения времени удержания на колонке исследуемых и стандартных соединений. Стандартами сравнения являлись 1,2,4-ТХБ, 2,5-ДХФ, 2,5-дихлоргидрохинон, растворенные в ацетонитриле. Количество образовавшихся продуктов оценивали по величине площади и высоте пиков на хроматограмме относительно данных величин стандартных соединений.

Наличие ионов хлора в супернатанте определяли качественно на спектрофотометре UV-Visible BioSpec-mini («Shimadzu», Япония) при $\lambda_{\text{макс}}$ от 460 нм до 540 нм через 5 мин. после внесения в супернатант 5%-ного азотнокислого серебра.

Скорость деструкции субстрата рассчитывали по формуле

$$V = (C_0 - C_i) / (t_i - t_0),$$

где C_0 – концентрация субстрата в начальный момент времени, мг/л, C_i – концентрация субстрата в конечный момент времени, мг/л, t_i – конечный момент времени, сут, t_0 – начальный момент времени.

Статистический анализ

Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Полученные данные обрабатывали с использованием стандартных пакетов компьютерных программ Microsoft Excel и Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение

Для изучения бактериального разнообразия линдан-загрязненных почв с территории предприятия, длительное время производившего линдан и другие соединения хлороорганического ряда, было отобрано шесть образцов. Газохроматографический анализ показал, что в пяти почвенных образцах присутствует линдан (табл. 1).

Таблица 1

Содержание линдана (γ -гексахлорцикло-гексана) в образцах почв

Образец почвы	Линдан	
	мг/кг почвы	превышение ПДК, раз
1	н.о.*	–
2	1.843	18.4
3	4.174	41.7
4	53.449	534.5
5	0.393	3.9
6	5.468	54.7

Примечание. * н.о. – не обнаружено.

Выявленные концентрации линдана в почве превышают установленное значение ПДК, составляющее 0.1 мг/кг почвы [ГН 1.2.3539-18], в среднем (за исключением образцов 1 и 4) в 30 раз. Наиболее загрязненным является образец 4, в котором ПДК превышена более чем в 500 раз. Напротив, в образце 1 линдан не обнаружен.

Полученные результаты свидетельствуют о неравномерном распределении загрязнителя по территории ОАО «СВЗХ». Однако проведенные расчеты не позволили установить достоверных зависимостей между концентрацией линдана в почве и удаленностью точки пробоотбора от зданий цехов, а также от преобладающих ветров. Вероятно, накопление линдана в тех или иных участках связано с комплексом факторов.

В результате накопительного культивирования было выделено 26 индивидуальных аэробных бактериальных штаммов. Два из них, *Achromobacter* sp. NE1 and *Brevundimonas* sp. 242, более подробно описаны в статье [Егорова, Назарова, Демаков, 2021]. Наибольшее число штаммов, устойчивых к линдану, изолировано из наиболее загрязненного почвенного образца (образец 4) (табл. 2). Они составляют 38.5% от общего числа выделенных штаммов. Несмотря на то, что в образце 1 не обнаружен линдан, из него были выделены 2 штамма, устойчивые к действию данного пестицида. Коэффициент корреляции между концентрацией линдана в почве и количеством изолированных штаммов составил 0.96, что, согласно шкале Чеддока, свидетельствует о высокой силе связи данных показателей.

Филогенетический анализ, проведенный на основании нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, показал, что доминирующую позицию среди штаммов линдан-загрязненных почв занимают бактерии филума *Proteobacteria* – 95.8% (табл. 2). Среди изолированных штаммов выявлены 10 представителей класса α -*Proteobacteria*, родов *Brevundimonas* (штамм 148А), *Ochrobactrum* (штаммы 241, 153, 132, NE2, NE3, 140С, 265) и *Rhizobium* (штаммы 145b, 145С), 7 представителей класса β -*Proteobacteria*, рода *Achromobacter* (штаммы 250, 123, 147, 190, 247, М8 и 268) и 6 представителей класса γ -*Proteobacteria*, родов *Pseudomonas* (штаммы 240, 116А, 134, 127, 126) и *Pseudoxanthomonas* (штамм 235).

Бактериальные штаммы, выделенные из линдан-загрязненных территорий и описанные в литературе, принадлежат родам *Actinobacteria*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromohalobacter*, *Citribacter*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Kokuria*, *Microbacterium*, *Pandorea*, *Pseudomonas*, *Rhodanobacter*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Trametes*, *Xanthomonas* [Lal et al., 2010; Abhilash, Srivastava, Singh, 2011; Camacho-Pérez et al., 2012; Saez, García, Benimeli, 2017; Kumar, Pannu, 2018]. Наибольшее количество штаммов, разлагающих линдан, являются представителями родов *Sphingobium* и *Sphingomonas*. В настоящем исследовании доминирующее положение занимают: *Achromobacter* (29.1%),

Ochrobactrum (29.1%) и *Pseudomonas* (20.8%).

Таблица 2

**Сравнение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК изолированных штаммов
с гомологичными последовательностями типовых штаммов**

Накопительная культура	Штамм, (номер GenBank)	Типовой штамм (номер GenBank)	Сходство, %
L1	240 (MW674743)	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC17588 ^T (CP002881)	99.86
	241 (MW674744)	<i>Ochrobactrum quorumnocens</i> A44 ^T (MG835335)	99.17
L2	116A (MW674630)	<i>Pseudomonas sichuanensis</i> WCHPs060030 ^T (QKVM0100012)	99.33
	134 (MW674735)	<i>Pseudomonas monteillii</i> NBRC103158 ^T (BBIC01000088)	100
	153 (MW674741)	<i>Ochrobactrum quorumnocens</i> A44 ^T (MG835335)	99.07
	235 (MW674742)	<i>Pseudoxanthomonas indica</i> P15 ^T (jgj.1118276)	99.36
L3	127 (MW674733)	<i>Pseudomonas putida</i> NBRC14164 ^T (AP013070)	99.88
	250 (MW674746)	<i>Achromobacter marplatensis</i> B2 ^T (EU150134)	100
L4	123 (MW674731)	<i>Achromobacter deleyi</i> LMG3458 ^T (HG324053)	100
	132 (MW674734)	<i>Ochrobactrum soli</i> BO-7 ^T (MH094651)	97.6
	147 (MW674739)	<i>Achromobacter marplatensis</i> B2 ^T (EU150134)	100
	148A (MW674740)	<i>Brevundimonas diminuta</i> ATCC11568 ^T (GL883089)	99.86
	190 (MW674749)	<i>Achromobacter insolutus</i> DSM23807 ^T (CP019325)	100
	247 (MW674745)	<i>Achromobacter marplatensis</i> B2 ^T (EU150134)	99.89
	M8 (MW674752)	<i>Achromobacter marplatensis</i> B2 ^T (EU150134)	99.78
	NE2 (MW674750)	<i>Ochrobactrum teleogrylli</i> LCB8 ^T (MK063698)	99.07
	NE3 (MW674751)	<i>Ochrobactrum soli</i> BO-7T (MH094651)	99.14
	NE4 (MW674753)	<i>Sphingobacterium siyangense</i> SY1 ^T (EU046272)	100
L5	145b (MW674737)	<i>Rhizobium pongamiae</i> VKLR-01 ^T (GQ444134)	98.67
	145C (MW674738)	<i>Rhizobium oryzihabitans</i> M15 ^T (MT023790)	99.09
L6	126 (MW674732)	<i>Pseudomonas asplenii</i> ATCC23835 ^T (LT629777)	99.88
	140C (MW674736)	<i>Ochrobactrum quorumnocens</i> A44 ^T (MG835335)	98.56
	265 (MW674747)	<i>Ochrobactrum quorumnocens</i> A44 ^T (MG835335)	99.21
	268 (MW674748)	<i>Achromobacter deleyi</i> LMG3458 ^T (HG324053)	100

Стоит отметить, что штаммы рода *Rhizobium* выделены только из почвенного образца 5, а штамм рода *Pseudoxanthomonas* – из почвенного образца 2, и не обнаружены в микробных сообществах остальных исследованных образцов почв. Наибольшее разнообразие выявлено среди представителей микробиоценоза образца 4. Наряду с бактериями филума *Proteobacteria*, выделен штамм NE4, показавший наибольшее сходство с типовым штаммом *Sphingobacterium siyangense* SY1^T (EU046272), принадлежащим филуму *Bacteroidetes* (табл. 2). При этом в микробиоценозе образца 4 не обнаружены штаммы рода *Pseudomonas*, встречающиеся в образцах 1, 2, 3 и 6.

Установлено, что все выделенные штаммы сохраняют жизнеспособность на протяжении 43 сут. культивирования в минеральной среде с внесением линдана. Несмотря на отсутствие активного прироста биомассы (изменение оптической плотности на 0.05–0.1 о.е. при длине волны 600 нм), в среде было зафиксировано накопление свободных ионов хлора. Полученные данные позволяют предположить, что штаммы, выделенные в настоящем исследовании, осуществляют дехлорирование линдана и частично используют его для обеспечения

жизненных процессов клетки.

Культивирование штаммов на 1,2,4-ТХБ и 2,5-ДХФ показало, что наибольший интерес для дальнейшего исследования представляют штаммы NE3 и 132, идентифицированные как представители рода *Ochrobactrum*. Оба штамма изолированы из почвенного образца 4.

Установлено, что данные штаммы способны осуществлять деструкцию побочных продуктов биотрансформации линдана – 1,2,4-ТХБ и 2,5-ДХФ в условиях культивирования при +28°C (табл. 3, 4). В случае культивирования при +7°C штаммы *Ochrobactrum* sp. NE3 и *Ochrobactrum* sp. 132 не осуществляют разложение данных соединений.

Таблица 3

Деструкция (%) субстратов культивирования

Штамм	2,5-ДХФ (57 сут)	1,2,4-ТХБ (18 сут)
132	23.3	–
NE3	16.1	66.7

Известно, что штаммы рода *Ochrobactrum* распространены в почве, ризосфере растений и сточной воде. Описан штамм *O. anthropi* SUBG007, в

геноме которого выявлены гены, ответственные за деградацию линдана, а также ряда ксенобиотиков [Kiran, Vrinda, 2017].

Таблица 4

Удельная скорость деструкции субстратов,
мг/(л×сут)

Штамм	2,5-ДХФ	1,2,4-ТХБ
132	0.65	–
NE3	0.45	6.11

Заключение

В результате проведенных исследований установлен уровень загрязненности линданом образцов почв, отобранных на территории ОАО «Средне-Волжский завод химикатов» г. Чапаевска Самарской обл. в 2013 г. Показано, что уровень загрязнения превышает нормы ПДК в десятки и сотни раз, при этом распределение загрязнителя по территории неравномерно. Установлена высокая корреляционная зависимость между концентрацией линдана в почве и количеством выделенных штаммов, устойчивых к действию линдана. Основная доля аэробных культивируемых бактерий в составе микробоценозов данных почв представлена штаммами филума *Proteobacteria*, в том числе трех классов: α -, β - и γ -*Proteobacteria*. Из наиболее загрязненного линданом почвенного образца 4 выделен штамм, принадлежащий филуму *Bacteroidetes*. Установлено, что штаммы *Ochrobactrum* sp. NE3 и *Ochrobactrum* sp. 132 осуществляют разложение побочных продуктов биотрансформации линдана (1,2,4-ТХБ и 2,5-ДХФ) и могут быть использованы в биотехнологиях очистки почвы от линдана для предотвращения накопления опасных соединений.

Работа выполнена в рамках НИОКР АААА-А19-119112290009-1 «Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды». Анализ почв методом газовой хроматографии выполнен с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Спектроскопия и анализ органических соединений» (ЦКП «САОС»). Остальные аналитические процедуры проведены с применением оборудования ЦКП «Исследования материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН, анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рНК выполнен на оборудовании молекулярно-генетической лаборатории кафедры ботаники и генетики растений ПГНИУ.

Список литературы

ГН 1.2.3539-18 Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды (перечень): Гигиенические нормативы.

- М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2019. 156 с.
- ГОСТ 17.4.3.01-82. Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб. Введ. 1983-01-01. М.: Госстандарт, 1983. 8 с.
- Егорова Д.О., Назарова Э.А., Демаков В.А. Новые штаммы-деструкторы линдана *Achromobacter* sp. NE1 и *Brevundimonas* sp. 242 // Микробиология. 2021. Т. 90, № 3. С. 357–361.
- Abhilash P.C., Srivastava S., Singh N. Comparative bioremediation potential of four rhizospheric microbial species against lindane // Chemosphere. 2011. Vol. 82, № 1. P. 56–63.
- Camacho-Pérez B. et al. Enzymes involved in the biodegradation of hexachlorocyclohexane: A mini review // Journal of Environmental Management. 2012. Vol. 95. P. S306–S318.
- Chuang S. et al. Microbial catabolism of lindane in distinct layers of acidic paddy soils combinedly affected by different water managements and bioremediation strategies // Science of Total Environment. 2020. Vol. 746. 140992
- Kiran S.C., Vrinda S.T. Genome sequence of *Ochrobactrum anthropi* strain SUBG007, a plant pathogen and potential xenobiotic compounds degradation bacterium // Genom Data. 2017. Vol. 4, № 11. P. 116–117.
- Kumar D., Pannu R. Perspectives of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) biodegradation from the environment: a review // Bioresources and Bioprocesses. 2018. Vol. 5. P. 29.
- Lal R. et al. Biochemistry of Microbial Degradation of Hexachlorocyclohexane and Prospects for Bioremediation // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2010. Vol. 74, № 1. P. 58–80.
- Nagata Y. et al. Aerobic degradation of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis // Applied and Microbiology Biotechnology. 2007. Vol. 76. P. 741–752.
- Revich B. et al. Dioxin exposure and public health in Chapaevsk, Russia // Chemosphere. 2001. Vol. 43. P. 951–966.
- Saez J.M., García V.C., Benimeli C.S. Improvement of lindane removal by *Satreptomices* sp. M7 by using stable microemulsions // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2017. Vol. 144. P. 351–359.
- Short protocols in molecular biology. 3rd ed. / Eds. Ausbel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. New York: John Wiley & Sons, 1995, 450 p.
- Vijgen J. et al. Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs – a global perspective on the management of lindane and its waste isomers // Environmental Science Pollution Research. 2011. Vol. 18. P. 152–162.

Willet K.L., Utrich E.M., Hites R.A. Differential toxicity and environmental facts of hexachlorocyclohexane isomers // *Environmental Science Technology*. 1998. Vol. 32. P. 2197–2207.

References

- GN 1.2.3539-18. *Gigieniĉeskie normativy soderžanija pesticidov v ob"ektach okružajjuščej sredy* [Hygienic standards for the content of pesticides in environmental objects (list): Hygienic standards]. Moscow, 2019. 156 p. (In Russ.).
- GOST 17.4.3.01-82. *Ochrana prirody. Počvy* [Nature protection. Soils. General requirements for sampling]. Moscow, Gosstandart Publ., 1983. 8 p. (In Russ.).
- Egorova D.O., Nazarova E.A., Demakov V.A. [New strains-degraders of lindane *Achromobacter* sp. NE1 and *Brevundimonas* sp. 242]. *Microbiologija*. V. 90. N 3 (2021): pp. 357-361. (In Russ.).
- Abhilash P.C., Srivastava S., Singh N. Comparative bioremediation potential of four rhizospheric microbial species against lindane. *Chemosphere*. V. 82. N 1 (2011): pp. 56-63.
- Camacho-Pérez B. et al. Enzymes involved in the biodegradation of hexachlorocyclohexane: A mini review. *Journal of Environmental Management*. V. 95 (2012): pp. S306–S318.
- Chuang S. et al. Microbial catabolism of lindane in distinct layers of acidic paddy soils combinedly affected by different water managements and bioremediation strategies. *Science of Total Environment*. V. 746 (2020): p. 140992
- Kiran S.C., Vrinda S.T. Genome sequence of *Ochrobactrum anthropi* strain SUBG007, a plant pathogen and potential xenobiotic compounds degradation bacterium. *Genom Data*. V. 4. N 11 (2017): pp. 116-117.

- Kumar D., Pannu R. Perspectives of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) biodegradation from the environment: a review. *Bioresources and Bioprocesses*. V. 5 (2018): p. 29.
- Lal R. et al. Biochemistry of Microbial Degradation of Hexachlorocyclohexane and Prospects for Bioremediation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. V. 74. N 1 (2010): pp. 58-80.
- Nagata Y. et al. Aerobic degradation of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis. *Applied and Microbiology Biotechnology*. V. 76. (2007): pp. 741-752.
- Revich B. et al. Dioxin exposure and public health in Chapaevsk, Russia. *Chemosphere*. V. 43 (2001): pp. 951-966.
- Saez J.M., García V.C., Benimeli C.S. Improvement of lindane removal by *Satreptomices* sp. M7 by using stable microemulsions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. V. 144 (2017): pp. 351-359.
- Ausbel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K., eds. Short protocols in molecular biology. 3rd ed. New York, John Wiley & Sons Publ., 1995. 450 p.
- Vijgen J. et al. Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs – a global perspective on the management of lindane and its waste isomers. *Environmental Science Pollution Research*. V. 18 (2011): pp. 152-162.
- Willet K.L., Utrich E.M., Hites R.A. Differential toxicity and environmental facts of hexachlorocyclohexane isomers. *Environmental Science Technology*. V. 32 (1998): pp. 2197-2207.

Поступила в редакцию 12.03.2021

Об авторах

Назарова Эльмира Алиевна, аспирант лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии "Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН" - филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН
614081, г. Пермь, ул. Голева, 13;
e9026309777@gmail.com; +7(342)2808431

About the authors

Nazarova Elmira Alievna, post-graduate student of the Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS.
13, Golev str., Perm, Russia, 614081;
e9026309777@gmail.com; +7(342)2808431

Первова Марина Геннадьевна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории фторорганических соединений Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН
ORCID: 0000-0003-4620-5418
620137, г Екатеринбург, ул. Софьи Ковалевской, 22/20; pervova@ios.uran.ru; +7(343) 36234181

Егорова Дарья Олеговна, кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии "Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН" - филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН
ORCID: 0000-0001-8018-4687
614081, Пермь, ул. Голева, 13; daryao@rambler.ru; +7(342)2808431

Pervova Marina Gennadievna, candidate of chemistry, senior researcher of the laboratory of organofluorine compounds Postovsky Institute of Organic Synthesis Ural Branch of the RAS.
ORCID: 0000-0003-4620-5418
620137, Yekaterinburg, Sofya Kovalevskaya str., 22/20; pervova@ios.uran.ru; +7(343) 36234181

Egorova Darya Olegovna, candidate of biology, senior scientist researcher of the laboratory of molecular microbiology and biotechnology Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS.
ORCID: 0000-0001-8018-4687
13, Golev str., Perm, Russia, 614081; daryao@rambler.ru; +7(342)2808431

Информация для цитирования:

Назарова Э.А., Первова М.Г., Егорова Д.О. Разнообразие культивируемых аэробных бактерий, выделенных из линдан-загрязненных почв // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2021. Вып. 2. С. 93–100. DOI: 10.17072/1994-9952-2021-2-93-100.

Nazarova E.A., Pervova M.G., Egorova D.O. [Diversity of culturable aerobic bacteria isolated from lindane-contaminated soils]. *Vestnik Permskogo universiteta. Biologija*. Iss. 2 (2021): pp. 93-100. (In Russ.). DOI: 10.17072/1994-9952-2021-2-93-100.

