

УДК 504.064.46.681.3+ 579.22+579.841.1

Н.А. Ямборко, Г.О. Іутинська, А.А. Піндрус, Л.В. Ярошенко

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП, Д03680, Україна*

ФІЗІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ І ТАКСОНОМІЧНЕ ПОЛОЖЕННЯ ҐРУНТОВИХ МІКРООРГАНІЗМІВ – ДЕСТРУКТОРІВ ГЕКСАХЛОРЦИКЛОГЕКСАНУ*

*Із стійкої до хлорорганічних пестицидів мікробної асоціації виділено 11 штамів, здатних розкласти гексахлорциклогексан (ГХЦГ). На основі дослідження морфологічних, культуральних та фізіолого-біохімічних характеристик, даних сиквенсу гену 16S рРНК, встановлено, що найбільш перспективні деструктори ГХЦГ штами № 3 і № 9 належать до виду *Pseudomonas putida*, а штамі № 6 – до виду *Stenotrophomonas maltophilia*.*

*Ключові слова: пестициди, деструкція, сиквенс 16S рРНК, мікробна асоціація, бактерії родів *Pseudomonas* і *Stenotrophomonas*.*

Глобальне хімічне забруднення оточуючого середовища – одна з найбільш актуальних проблем сучасності. Це викликає обґрунтовану стурбованість можливими порушеннями екологічної рівноваги в окремих екосистемах і в системі мікроорганізм-рослина зокрема. Особливо небезпечними є синтетичні сполуки, які надходять в природу внаслідок господарської

*Робота виконана за часткового фінансування за рахунок бюджетних коштів для підтримки об'єкта національного надбання – «Колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України».

© Н.А. Ямборко, Г.О. Іутинська, А.А. Піндрус, Л.В. Ярошенко, 2010

діяльності людини. Важливе місце серед них займають пестициди – хімічні засоби захисту рослин від хвороб, шкідників і бур'янів. Вони присутні в ґрунті і, долаючи бар'єр ризосферної мікробіоти, потрапляють і накопичуються в рослинах і сільськогосподарській продукції [3]. Саме мікроорганізми відіграють провідну роль у деструкції пестицидів. [11]. Відомо, що для ефективного розкладу пестицидів необхідні складні мікробні консорціуми [10]. Тому метою проведених досліджень було селекціонувати стійку до хлорорганічних пестицидів мікробну асоціацію, виділити із неї та ідентифікувати мікроорганізми, які можуть бути перспективними деструкторами, зокрема, гексахлорциклогексану (ГХЦГ), як одного з наймасовіших забрудників ґрунту.

Матеріали і методи. Стійка до пестицидів мікробна асоціація була виділена нами із ґрунтів місць локального забруднення пестицидами різної хімічної природи: хлорорганічними, симтриазиновими, похідними циклічних вуглеводнів, похідними фенілсечовини, фосфорорганічними. Асоціація складалася з 11 культивованих штамів бактерій і була названа нами Мікрос. Підтримуючу селекцію асоціації Мікрос до ГХЦГ проводили шляхом багаторазових пасажів на рідкому модифікованому середовищі Менкіної [1] з додаванням комерційного препарату гексахлорану (20 мкг/мл) із вмістом діючої речовини – 7 % ГХЦГ (до його складу входять α -, β -, γ -, δ - ізомери) .

Ізоляти, які входять до складу асоціації Мікрос розкладали ГХЦГ, на 63,4-86,7 % за 10 діб [4].

Для ідентифікації виділених ізолятів використовували класичні методи вивчення фізіолого-біохімічних характеристик виділених культур і метод часткового сиквенсу гену 16S-rPHK та його аналізу із використанням бази даних BLASTN.

Контроль ростових властивостей живильних середовищ і перевірку придатності методик здійснювали за допомогою рекомендованих Державною фармакопеею України [2] штамів мікроорганізмів: *Escherichia coli* УКМ В-906 (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-900 (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* УКМ В-918 (ATCC 6538). Дослідження морфології клітин проводили шляхом мікроскопії забарвлених за Грамом мазків добових культур мікроорганізмів. Оксидазну активність у досліджуваних штамів визначали по Ковачу [6].

Для визначення рухливості досліджуваних штамів мікроорганізмів вивчали препарати добових культур, які культивували на м'ясо-пептонному бульйоні МПБ [9].

Визначення ізолятів проводили за допомогою системи API 20 NE (BioMerieux, Франція), призначеної для ідентифікації неферментуючих грамнегативних паличок. Ідентифікацію культур здійснювали за допомогою спеціального програмного забезпечення.

Проводили молекулярно-генетичні дослідження фрагменту гену 16S-rPHK у досліджуваних мікроорганізмів-деструкторів. Виділення та очищення бактеріальної ДНК проводили з 2–3 добових культур з використанням набору «ДНК Сорб-В» згідно з методикою, запропонованою виробником.

Ампліфікацію фрагментів генів 16S-rPHK проводили з використанням двох універсальних праймерів: прямого RNNF1 5'-CGG-CCC-AGA-CTC-CTA-CGG-GAG-GCA-GCA -3' та зворотного RNNR2 5'-GCG-TGG-ACT-ACC-AGG-GTA-TCT-AAT-CC-3' за допомогою ПЛР реакції на ампліфікаторі «2720 Thermal Cycler». Об'єм ампліфікаційної суміші складав 50 мкл і містив такі компоненти: H_2O – 17 мкл, Mg^{2+} 5x буфер – 10 мкл, 10x суміші dNTP – 5 мкл, суміш праймерів прямого та зворотного (10 пмоль/мкл) – 5+5 мкл, Taq-polymerase (10 од/мкл) – 0,5 мкл та 7,5 мкл зразку бактеріальної ДНК. Температурний режим ампліфікації був таким: початкова денатурація – 5 хв при +94 °С, наступні 35 циклів – денатурація 30 с при +94 °С, гібридизація праймерів 30 с при +55 °С, полімеризація 30 с при +72 °С, фінальне охолодження до 4 °С. Аналіз продуктів ПЛР проводили за допомогою електрофорезу тривалістю 20 хв у 1% агарозному гелі з етидій бромідом (1 мкл/мл), при напрузі 10 В/см. Для визначення молекулярної маси та кількості ДНК використовували маркер SM0403 (Fermentas).

Сіквенс проводили за стандартним протоколом на генетичному аналізаторі «3130 Genetic Analyzer» з набором реактивів для сіквенсу «BigDye Terminatorv3.1 Cycle Sequencing Kit».

Аналіз одержаних нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою програми BLASTN, порівнюючи їх з гомологічними депонованими у GenBank нуклеотидними послідовностями гену 16S-rPHK.

Результати та їх обговорення. Клітини виділених стійких до ГХЦГ ізолятів належали до двох морфологічних типів. Найхарактерніші з них представлені на рис. 1. Всі культури за морфологією виявились неспорутворюючими паличками з закругленими кінцями, розмірами 0,5×2,0 мкм.

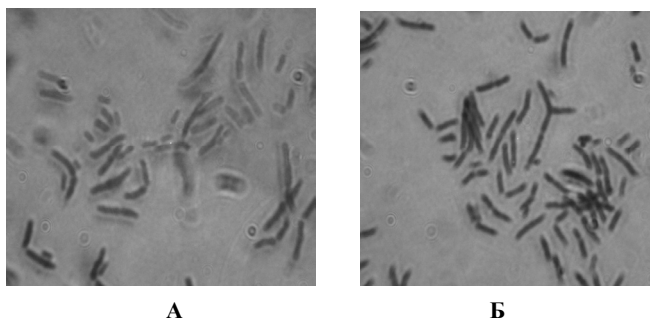


Рис. 1. Препарати досліджених культур: А – штами №№ 1, 2, 3, 4, 4а, 5, 7, 7а, 9; 9а;
Б – штами №№ 6, 8. Забарвлення за Грамом, збільшення 1500 разів

Первинну ідентифікацію досліджуваних штамів проводили відповідно до 9 видання визначника Берджи [7]. На першому етапі роботи визначали морфологію клітин, характер їх забарвлення за Грамом. Всі досліджені ізоляти були грамнегативними паличками.

За фізіологічними показниками 9 штамів були оксидазопозитивними; у 2 штамів оксидазної активності не відмічали. У 9 штамів було відмічено наявність флюоресціюючого жовто-зеленого пігменту. На основі отриманих даних досліджувані штами були віднесені до роду *Pseudomonas*. На наступному етапі за допомогою тест-системи API 20 NE були одержані характеристики виділених штамів для визначення їхньої видової належності. Результати API-тестування наведено в табл. 1.

Після внесення одержаних показників у комп'ютерну базу даних було проведено визначення видової належності тестованих культур-деструкторів ГХЦГ

Із стійкої до ГХЦГ асоціації Мікрос були виділені культури, які за фізіолого-біохімічними характеристиками можна віднести до видів *Pseudomonas putida* – ID 96,7 % (ізоляти № 2, № 3, № 4, № 4а, № 5, № 7, № 9, № 9а) та *Stenotrophomonas maltophilia* – ID 99,9 % (ізоляти № 6, № 8). Одержані нами результати збігаються із відомими в літературі даними, які свідчать, що у переважній більшості активними деструкторами пестицидів є представники роду *Pseudomonas* [8].

Оскільки для визначення таксономічного положення штамів мікроорганізмів використовують поліфазний метод, який базується на вивченні як фізіолого-біохімічних, так і молекулярно-генетичних характеристик досліджуваних культур [5], то ми у своїх дослідженнях застосували молекулярно-генетичні методи аналізу виділених культур-деструкторів ГХЦГ. Для цих експериментів ми відібрали найбільш активні деструктори ГХЦГ. Було визначено нуклеотидну послідовність гену 16S-рРНК штамів № 3, 9, 6, 8. Результати ампліфікації фрагментів генів 16S-рРНК з універсальними праймерами RNNF1 (прямий) RNNR2 (зворотний), представлені даними електрофорезу у 1,5 % агарозному гелі отриманих продуктів ПЛР (рис. 2).

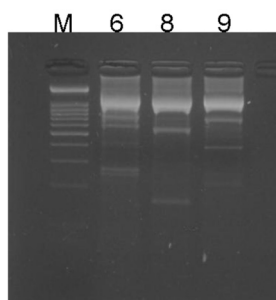


Рис. 2. Продукти ПЛР 16S-рРНК: М –маркер; 6 – *S. maltophilia* 6; 8 – *S. maltophilia* 8;
9 – *P. putida* 9

Фізіологічні властивості грам-негативних культур-деструкторів ГХЦГ

№ п/п	Характеристика	Ефективні штами-деструктори пестицидів	
		№ 2, № 3, № 4, № 4а, № 5, № 7, № 9, № 9а	№ 6, № 8
1	Флюоресціюючий пігмент	+	-
2	Наявність оксидази	+	-
3	Зброджування D-Глюкози	-	-
4	Гідроліз желатина	-	+
5	Активність аргініндегідролази	+	-
6	Редукція нітратів до нітритів	-	+
7	Уреазна активність	-	+
8	Активність β-глюкозидази	-	+
9	Утворення індолу	-	-
10	Наявність β-галактозидази	-	+
Засвоєння джерел вуглецю			
12	D-Глюкоза	+	-
13	L-Арабіноза	+	-
14	D-маноза	+	+
15	D-маніт	-	-
16	N-ацетилглюкозамін	-	+
17	D-мальтоза	-	+
18	Глюконова кислота	+	-
19	Капринова кислота	+	-
20	Адіпінова кислота	-	-
21	Яблучна кислота	+	+
22	Лимонна кислота	+	+
23	Фенілоцтова кислота	-	-

Примітка: «+» – наявність ознаки; «-» – відсутність ознаки.

Ампліфіканти гену 16S-r РНК були просиквензовані і одержані їх нуклеотидні послідовності. За допомогою програми BLASTN було проведено пошук гомологічних нуклеотидних послідовностей у базі даних GenBank.

Встановлено, за даними повного сиквенсу гену 16s-r РНК (1475 п.н.) штаму № 3 має 100 % гомології з депонованою у GenBank нуклеотидною послідовністю *Pseudomonas putida* S18 (AY741157.1) (табл. 2), а штаму № 9 (477 п.н.) за даними часткового сиквенсу гену 16s-r РНК на 99 % подібний до штаму *P. putida* S5 (AB512773.1) і *P. putida* CDd-9 (GU248219.1). Порівнюючи ці результати з даними фенотипових досліджень, ми можемо стверджувати, що досліджувані штами, які є компонентами асоціації Мікрос, належать до виду *Pseudomonas putida*.

Для штаму № 6 (476 н.п.) була визначена 99 % гомологія нуклеотидної послідовності з фрагментом гену 16S-rРНК *Stenotrophomonas maltophilia* 0450 (EU604758.1) та *S. maltophilia* LQB22 (GQ861457.1), що вказує на його належність до виду *S. maltophilia*. Проте для штаму № 8 подібність послідовностей складала всього 83 %, цього недостатньо для підтвердження результатів його фенотипової ідентифікації. Можливо, ми маємо справу з іншим представником роду *Stenotrophomonas*.

Таким чином, таксономічне положення культур-деструкторів ГХЦГ було визначено за

фізіолого-біохімічними характеристиками і підтверджено за допомогою даних сиквенсу гену 16S рРНК.

Здатність флуоресціюючих псевдомонад до деструкції ксенобіотиків описана багатьма дослідниками [12], проте, немає даних про подібні властивості у представників роду *Stenotrophomonas*. Тому, деструкційні властивості цих мікроорганізмів щодо різного роду забруднень можуть бути цікавими з погляду механізмів перебігу процесу і перспективними для розробки технологій мікробної ремедіації ґрунтів.

Таблиця 2

Ідентифікація мікроорганізмів-деструкторів за допомогою сиквенсу фрагменту гену 16S- рРНК

Штам	Довжина фрагменту гену, пп	Результати BLASTN-аналізу		
		Ідентичність, %	Гомологічний вид	Код GenBank
<i>P. putida</i> 3	1475	100	<i>Pseudomonas putida</i> strain S18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY741157.1
		99	<i>Pseudomonas putida</i> GB-1, complete genome	CP000926.1
		99	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 complete genome	AE015451.1
<i>P. putida</i> 9	477	99	<i>Pseudomonas putida</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: S5	AB512773.1
		99	<i>Pseudomonas putida</i> strain CDd-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	GU248219.1
		99	<i>Pseudomonas putida</i> strain KT25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	GU060521.1
<i>S. maltophilia</i> 6	476	99	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain 0450 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	EU604758.1
		99	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain LQB22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	GQ861457.1
		99	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain SH-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	GQ884174.1
<i>S. maltophilia</i> 8	563	83	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain H1137-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	GU170362.1
		83	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain H9-3 16S ribosomal RNA	GU170361.1
		96	Uncultured <i>Stenotrophomonas</i> sp. clone T11TR2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	FJ422466.1

Н.А. Ямборко, Г.А. Иутинская, А.А. Пиндрус, Л.В. Ярошенко

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ – ДЕСТРУКТОРОВ ГЕКСАХЛОРЦИКЛОГЕКСАНА

Резюме

Из устойчивой к хлорорганическим пестицидам микробной ассоциации выделили 11 штаммов, способных разлагать инсектицид гексахлорциклогексан (ГХЦГ). На основе исследования морфологических, культуральных и физиолого-биохимических характеристик, данных сиквенса гена 16S рРНК, установлено, что наиболее перспективные деструкторы ГХЦГ штаммы № 3 и № 9 принадлежат к видам *Pseudomonas putida*, а штамм № 6 – к виду *Stenotrophomonas maltophilia*.

Ключевые слова: пестициды, деструкция, сиквенс 16S- рРНК, микробная ассоциация, бактерии родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*.

**PHYSIOLOGICAL PROPERTIES AND TAXONOMIC POSITION
OF SOIL MICROORGANISMS-DESTRUCTORS
OF HEXACHLOROCYCLOHEXANE**

S u m m a r y

Eleven (11) microbial strains capable to decompose insecticide hexachlorocyclohexane (HCH) have been isolated from microbial association resistant to chloro-organic pesticides. On the basis of investigation of morphological, cultural, physiological, biochemical characteristics and results of sequence of gene 16S rRNA it has been established, that the best strain-destructors N 3 and N 9 belong to *Pseudomonas putida* species, and strain N 6 belongs to *Stenotrophomonas maltophilia* species.

The paper is presented in Ukrainian.

K e y w o r d s: pesticides, biodegradation, sequence of 16S rRNA, microbial association, microorganisms of genus *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas*.

T h e a u t h o r ' s a d d r e s s: *Yamborko N.A.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Андреев К.И., Иутинська Г.О., Антипчук А.Ф., Валагурова О.В., Козирицька В.С., Пономаренко С.П. Функціонування мікробних ценозів в умовах антропогенного навантаження. – Київ: Обереги, 2001. – 240 с.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. - 1-е вид. - Харків: РІПЕГ, 2001. – 531 с.
3. Ермаков Н.М., Корнеев Г.А., Якавлев С.А., Колнобрицкая О.А., Попов Н.В., Толоконникова С.И. Неспецифическая профилактика зооантропонозных инфекций (дезинсекция), пути её развития // Энтомологические и паразитические исследования в Поволжье. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2001. – Вып 1. – С. 66–69.
4. Иутинська Г.О., Ямборко Н.А., Піндрус А.А., Мельничук С.Д., Лоханська В.Й., Баранов Ю.С., Самкова О.П. Мікробна деструкція похідних циклічних вуглеводнів (α -, β -, γ - гексахлорциклогексану) у ґрунті // «Наукові доповіді НАУ», 2007. – № 1 (6). – С. 1–7.
5. Коцфляк О.И., Рева О.Н., Киприанова Е.А., Смирнов В.В. Идентификация бактерий рода *Pseudomonas* методами компьютерного анализа // Микробиол. журн. – 2003. – 65, № 6. – С. 3–12.
6. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхарда и др. – М.: Мир, 1984. – Т. 3. – С. 16.
7. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. – Москва: Мир, 1997. – С. 73–120.
8. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. – К.: Наук. думка, 1990. – С. 220–225.
9. Теннер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. – М.: Колос, 1972. – 199 с.
10. Cook A.M. Biodegradation of s-triazine xenobiotics // FEMS Microbiol. Rev. – 1987. – 46, N 2. – P. 93–116.
11. Dimond J.B., Owen R.B. Long-term residue compounds in forest soil in Maine // Environ. Polut. – 1996. – 92, N 2. – P. 227–230.
12. Philips T.M., Seech A.G., Hung L., Trevors J. Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms // Biodegradation. – 2005. – 16, N 4. – P. 363–392.

Отримано 11.05.2009