

## БИОДЕСТРУКЦІЯ ІЗОМЕРІВ ГЕКСАХЛОРИЦКЛОГЕКСАНУ ПРИРОДНОЮ І ШТУЧНО СТВОРЕНОЮ МІКРОБНИМИ АСОЦІАЦІЯМИ

*Н.А.Ямборко<sup>1</sup>, Г.О.Лутинська<sup>1</sup>, І.В. Свистунова<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Акад. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

<sup>2</sup>Національний університет біоресурсів і природокористування України,  
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041, Україна  
e-mail: yamborkon@gmail.com

**Мета.** Дослідити особливості деструкції комплексу ізомерів гексахлорциклогексану (ГХЦГ) природною мікробною асоціацією Мікрос і штучно створеною асоціацією Біорем (*Pseudomonas putida* IMB B-7289, *Bacillus megaterium* IMB B-7287, *Stenotrophomonas maltophilia* IMB B-7288), а також окремими культурами-деструкторами – компонентами асоціації. **Методи:** мікробіологічні, газова хроматографія, статистичні. **Результати.** Асоціація Біорем в рідкій культурі розкладає комплекс ізомерів ГХЦГ на 70,9-86,7%. Першим у процес деструкції вступає *S. maltophilia* IMB B-7288 – на 2-4-у добу, штами *P. putida* IMB B-7289 і *B. megaterium* IMB B-7287 включаються в процес деструкції на 4-7-у добу, що поетапно подовжує період активного мікробного росту і деструкції ГХЦГ. В рідкому середовищі інтенсивніше розкладає ізомери ГХЦГ *B. megaterium* IMB B-7287, в умовах ґрунту – *P. putida* IMB B-7289. Тому доцільним є поєднання *B. megaterium* IMB B-7287, *P. putida* IMB B-7289 і *S. maltophilia* IMB B-7288 в одній мікробній асоціації (Біорем). **Висновки.** Штучно створена асоціація мікроорганізмів-деструкторів Біорем є перспективною до застосування як бактеріальний препарат для ремедіації території, забруднених ГХЦГ.

**Ключові слова:** мікроорганізми-деструктори, хлорорганічні пестициди, гексахлорциклогексан, ліндан, ремедіація, біодеструкція, біопрепарат.

На сьогодні гостро стоїть питання накопичення залишкових кількостей хлорорганічних токсикантів в об'єктах оточуючого середовища, насамперед у ґрунті і воді. Згідно з заключенням Стокгольмської конвенції [10] гексахлорциклогексан (ГХЦГ) класифіковано як стійкий органічний забрудник, залишки якого масово можна виявити у рослинній сировині, продуктах харчування, а також в тканинах живих організмів. ГХЦГ – хлорорганічний інсектицид, до складу якого входить 8 стабільних ізомерів, які відрізняються положенням (аксіальним (а) або екваторіальним (е) атомів хлору відносно площини бензольного ядра:  $\alpha$  (ааееее),  $\beta$  (ееееее),  $\gamma$  (аааеее),  $\delta$  (аеееее),  $\epsilon$  (аеаеае);  $\xi$  (ааеаеае),  $\eta$  (аеаеаеае) і  $\theta$  (аеаеаеае). Інсектицидні властивості із наведеного переліку ізомерів проявляє тільки  $\gamma$ -ГХЦГ, його друга назва – ліндан. Технічний ГХЦГ (який застосовують в практиці) зазвичай містить 60-70%  $\alpha$ -ізомеру, 7-10% –  $\beta$ , 10-15% –  $\gamma$  (діюча речовина продукту), 6-7% –  $\delta$ -ізомеру і близько 5% інших ізомерів ( $\epsilon$ ,  $\xi$ ,  $\eta$  і  $\theta$ ). ГХЦГ стійкий до дії світла, окисників, є отрутою по-

літропної дії, токсичною для теплокровних. Основним джерелом забруднення оточуючого середовища ізомерами ГХЦГ є ґрунти промислового і сільськогосподарського призначення, на яких комплекс ізомерів ГХЦГ застосовувався як інсектицид, а також ґрунти на територіях, прилеглих до об'єктів виробництва і складування ГХЦГ, де відбувалися викиди токсиканту в оточуюче середовище. Із забруднених ґрунтів відбувається вимивання і розповсюдження ізомерів ГХЦГ в екосистемах [7]. У зв'язку з цим ГХЦГ заборонений в промисловій і сільськогосподарській практиці у країнах ЄС з 2004 року згідно з постановою Парламенту і Ради ЄС [9], в фармацевтичній галузі з 2015 року ГХЦГ заборонений більш ніж у 40 розвинених країнах і ще в 20 – обмежене використання [6]. В Україні ГХЦГ заборонений з 2008 року [1, 2], проте у результаті інтенсивного застосування в останні два десятиліття ХХ століття рівень забруднення орних земель і об'єктів довкілля є дуже високим. Тому проблема очищення забруднених ґрунтів біотехнологічними методами із застосуванням мікроорганізмів є актуальною. Ґрунтові мікроорганізми характеризуються лабільним біохімічним апаратом, високим адаптивним потенціалом і здатні до деградації ізомерів ГХЦГ [7].

У попередніх роботах [11] нами опубліковані дані про виділення природної асоціації стійких до хлорорганічних забрудників мікроорганізмів із ґрунтів прискладських територій із високим рівнем хлорорганічного забруднення (ГХЦГ, гексахлорбензол, ДДТ, ДДЕ, хрізен та ін.). Виділена мікробна асоціація пройшла також селекцію в лабораторних умовах на стійкість до комплексу ізомерів ГХЦГ шляхом багаторазових пересівів із зростаючими дозами препарату і отримала назву Мікрос. Із цієї асоціації було виділено ряд чистих культур мікроорганізмів, які здатні до деструкції в діапазоні концентрацій 20-100 мг/л гексахлорану (у перерахунку на діючу речовину).

За результатами попереднього скринінгу ізолятів за ознаками активності деструкції комплексу ізомерів ГХЦГ, параметрами росту було відібрано найбільш активні мікробні культури, які в подальшому були ідентифіковані як *Pseudomonas putida* IMV B-7289, *Stenotrophomonas maltophilia* IMV B-7288 [12]. Крім того, було встановлено здатність розкласти комплекс ізомерів ГХЦГ у колекційного штаму *Bacillus megaterium* IMV B-7287, для якого характерна властивість переводити у доступну для рослин форму нерозчинні органофосфати, так само, як і іншим представникам виду *Bacillus megaterium* [8]. У результаті лабораторної селекції відібраних штамів на поживних середовищах із зростаючими дозами ГХЦГ у них були сформовані стабільно високі деструкційні властивості – деградація усіх 4 ізомерів ГХЦГ на рівні 70-95% від вихідного вмісту [12]. Здатність до деструкції у селекціонованих мікроорганізмів зберігається на середовищах без ГХЦГ як селективного фактора.

У подальшому із штамів-деструкторів ГХЦГ *P. putida* IMV B-7289, *S. maltophilia* IMV B-7288, *B. megaterium* IMV B-7287 було створено штучну мікробну асоціацію під назвою Біорем [13]. Наступним етапом і метою даного дослідження є вивчення інтенсивності і особливостей деструкції комплексу ізомерів ГХЦГ природною мікробною асоціацією Мікрос і штучно створеною мікробною асоціацією Біорем, а також окремими культурами-деструкторами (компонентами асоціації).

**Матеріали та методи.** Культивування мікроорганізмів, стійких до хлороганічних пестицидів, проводили на синтетичному модифікованому середовищі Менкіної наступного складу (г/л): до 100 мл мінеральної основи ( $KCl - 0,5$  і  $NaNO_3 - 2,0$ ) додавали 0,5 мл 10%-го розчину  $MgSO_4$ ; 1 мл 20%-го розчину  $K_2HPO_4$ ; 1 мл 50%-го розчину глюкози. Для визначення ефективності деструкції комплексу ізомерів ГХЦГ у рідкій культурі до поживного середовища додавали концентрат в ацетоні, одержаний із комерційного препарату гексахлорану (Syngenta) із розрахунку кінцевої концентрації діючої речовини  $\gamma$ -ізомеру ГХЦГ 20 мг/л середовища, що відповідає 200 ГДК (гранично допустимим концентраціям). Згідно з даними літератури діапазон, в якому продуктивно відбувається мікробна деструкція ізомерів ГХЦГ – це концентрація 5-30 мг/л і максимально можлива – 100 мг/л в рідкому середовищі [5]. Обрані нами концентрації токсикантів є середніми у даному діапазоні.

Культивування окремих культур мікроорганізмів і мікробної асоціації Біорем і асоціації Мікрос проводили до середини експоненційної фази росту (72 год), густину клітинної суспензії доводили до 1,3 одиниць оптичної густини, що відповідає концентрації біомаси клітин у культуральній рідині 0,6 г/л. Частка мікробного інокуляту становила 5% від об'єму середовища. Культивування проводили на качалках за температури 28°C зі швидкістю перемішування 280 об/хв упродовж 10 діб. Після цього клітини відділяли центрифугуванням (5600 g, 30 хв), в одержаних супернатантах культуральних рідин визначали вміст ізомерів ГХЦГ. Контролем для визначення вмісту ізомерів ГХЦГ був варіант середовища Менкіної з гексахлораном без додавання мікробних культур. Визначали вміст найбільш поширених в кількісному співвідношенні  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - і  $\delta$ -ізомерів ГХЦГ, сумарний вміст яких у препараті становить 95%, інші 4 ізомери присутні в суміші у слідових кількостях.

Дослідження деструкції ГХЦГ у ґрунті проводили в лабораторних умовах. У горщики об'ємом 1000 мл у ґрунт масою 500 г вносили комерційний препарат гексахлоран у кількості 20 мг/кг, витримували 14 діб за температури 20°C, після цього, ретельно перемішуючи, вносили нарощені суспензії досліджуваних мікробних культур *P. putida* ІМВ В-7289, *S. maltophilia* ІМВ В-7288, *B. megaterium* ІМВ В-7287 і мікробну асоціацію Мікрос (з концентрацією біомаси 0,6 г/л). Препарат Біорем готували із окремих маточних суспензій культур-деструкторів з вмістом мікробної біомаси 0,6 г/л, об'єднуючи їх в об'ємних пропорціях 1:1:1. Інокульовані мікробними культурами і контрольні варіанти витримували 10 діб за температури 20°C і вологості 70% від повної вологоємності ґрунту.

Визначення чисельності клітин культур-деструкторів у складі асоціації Біорем після 4, 7 та 11 діб культивування проводили методом висіву кратних розведень мікробної суспензії на м'ясопептонний агар (МПА). Підрахунок колоній на чашках Петрі проводили через 48 год культивування за температури 28°C. Штами, що входять до асоціації Біорем, мають різну морфологію колоній. *B. megaterium* ІМВ В-7287 на МПА утворює великі матові колонії, *P. putida* ІМВ В-7289 – дрібні округлі колонії із флуоресціюючим пігментом, *S. maltophilia* ІМВ В-7288 – дрібні округлі матові нефлуоресціюючі колонії. Отже, за морфологією колоній підраховували кількість колоній кожного штаму деструктора у складі асоціації Біорем.

Визначення вмісту ізомерів ГХЦГ проводили в супернатантах культуральних рідин і в ґрунті методом газової хроматографії згідно з рекомендаціями Environmental protection association [10]. Екстрагування гексаном проводили тричі, усі порції гексанової фракції збирали разом і висушували на роторному випаровувачі Heidolph Laborota 4000 efficient за температури водяної бані 40°C та залишковому вакуумі 20-30 мм рт.ст. Одержаний сухий залишок у роторній колбі тричі змивали гексаном по 2 мл і збирали у роторну колбу об'ємом 10 мл, концентрували під вакуумом і знову тричі змивали гексаном по 0,5 мл, далі переносили усі порції гексанового концентрату ізомерів ГХЦГ у віалу, об'єм рідини у віалах, враховуючи втрати розчинника, доводили гексаном до 1,5 мл.

Для визначення вмісту ГХЦГ у ґрунті наважку масою 25 г поміщали в ступку і додавали 50 г  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  безводного (Merk) для адсорбції із зразка ґрунту кристалізаційної води. Утворену суміш розтирали у ступці до однорідної субстанції і в колбі Ерленмейєра проводили тричі екстракцію гексаном. Одержаний екстракт висушували при 40°C та залишковому вакуумі 20-30 мм рт. ст. до сухого залишку, знову розчиняли в невеликому об'ємі гексану. До одержаного гексанового екстракту додавали 10 мл насиченого розчину NaCl і струшували 3 хв, потім відстоювали утворену суспензію і верхню гексанову фазу відбирали і випарювали за температури 25°C під витяжкою 5 год для концентрування гексанового екстракту ізомерів ГХЦГ і зменшення об'єму. Об'єм зразка для аналізу методом газової хроматографії складав 1,5 мл гексанового розчину ізомерів ГХЦГ.

Для хімічного аналізу складу хлорорганічних забруднень ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - ГХЦГ) використовували газовий хроматограф Agilent 6890 N у комплексі із програмним забезпеченням HP Chemstation, двома мікроелектронзахоплюючими детекторами, двома інжекторами з розподілом і без розподілу потоку (Split/Splitless) автосамплером на 100 зразків, із синхронним введенням проб, що дозволяє вводити зразки без розподілу потоку одночасно. Аналіз зазначених вище ізомерів ГХЦГ проводили з використанням колонки HP-5 (довжина 30 м, внутрішній діаметр 0,32 мм, товщина фази 0,25 мкм (HP кат. № 19091J-413). Як стандарти у загальноприйнятій практиці газової хроматографії використовують ДСЗУ (державні стандартні зразки України), розчини із стандартною концентрацією діючої досліджуваної речовини 0,1 мг/мл, виробник усіх ДСЗУ – Спеціальне конструкторсько-технологічне бюро при Інституті фізичної і колоїдної хімії ім. Богатського (Одеса). Вихідні концентрації досліджуваних ізомерів ГХЦГ у контрольних і дослідних зразках на початку дослідження у межах одного досліді були однаковими.

**Результати.** Дослідження мікробної біодеградації комплексу ізомерів ГХЦГ в рідкому середовищі показали, що *B. megaterium* IMV B-7287 продемонстрував максимальну деструкційну активність після 10 діб культивування на 95,5-97,7% від вихідного вмісту, було розкладено усі 4 ізомери ГХЦГ (рис.1). Ефективним деструктором проявив себе штам *P. putida* IMV B-7289, який більш активно розкладав  $\gamma$ - і  $\delta$ -ГХЦГ (на 82-88%), і в меншій мірі –  $\alpha$  і  $\beta$  ізомери ГХЦГ (на 72-78%).

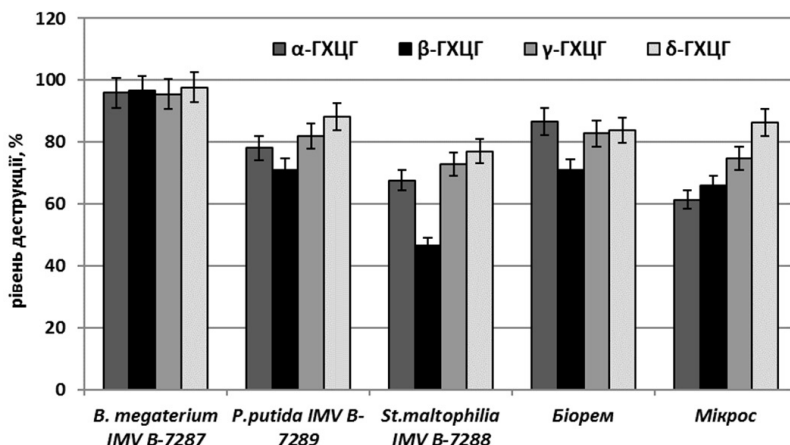


Рис.1. Деструкція комплексу ізомерів ГХЦГ в рідкому середовищі окремими мікробними культурами та їх комплексом – штучною асоціацією Біорем і Мікрос

Вперше нами була виявлена здатність до деструкції ГХЦГ у представника роду *Stenotrophomonas* – гетеротрофного непатогенного штаму *S. maltophilia* IMV B-7288, виділеного нами із забрудненого ґрунту. У *S. maltophilia* IMV B-7288 здатність розкласти ізомери ГХЦГ була на рівні 46,6–77,1% від вихідного вмісту. Активність деструкції комплексу ізомерів ГХЦГ штучною асоціацією Біорем перевищувала таку природною асоціацією Мікрос на 5–25% ГХЦГ. Проте рівень деструкції комплексу ізомерів культурою *B. megaterium* IMV B-7287 був вищий, ніж асоціацією Біорем на 9,3-25,6% (рис.1). Нижчу інтенсивність розкладу токсиканту асоціацією Біорем можна пояснити можливим швидким виснаженням елементів живлення в середовищі культивування, адже одночасний ріст трьох мікробних культур потребує підвищених ресурсів карбону, нітрогену та інших компонентів живлення. Дослідники, які працюють з природними мікробними асоціаціями за культивування у ферментерах, рекомендують збільшувати вміст елементів живлення в поживних середовищах, щоб мінімізувати конкуренцію між мікроорганізмами і підвищити інтенсивність кометаболізму токсиканту [4].

Метою даних експериментів було дослідження процесів деструкції ізомерів ГХЦГ в умовах мінімального мінерального поживного середовища або ґрунту. Такі умови є наближеними до умов природних ареалів забруднення, де немає легкодоступних джерел живлення і присутня жорстка конкуренція між живими організмами різних рівнів організації. Оптимізація поживного середовища з метою інтенсифікації процесу деструкції в лабораторних умовах є наступним етапом наших досліджень.

При вивченні росту окремих штамів-деструкторів у складі асоціації Біорем (при одночасному культивуванні трьох штамів) в динаміці процесу деструкції ними α-, β-, γ-, δ-ГХЦГ в рідкому поживному середовищі були виявлені деякі особливості їх росту (рис.2). Так, за однакової вихідної кількості клітин в інокулятах дослідних (деструкція ГХЦГ) і контрольних (без ГХЦГ) варіантів на четверту добу культивування чисельність клітин *S. maltophilia* IMV B-7288 перевищувала чисельність *B. megaterium* IMV B-7287 і *P. putida* IMV B-7289 відповідно в 1,7 і 2,3 рази у контролі і у



2,1 і 2,8 рази у варіантах із пестицидом. Отже, *S. maltophilia* IMB B-7288 першим починає активний ріст і вступає в процес деструкції ізомерів ГХЦГ, тоді як інші штами-деструктори перебувають ще у лаг-фазі. Проте вже на 7-у добу культивування (рис.2) кількість життєздатних клітин *S. maltophilia* IMB B-7288 знижується у контролі – до  $6,5 \times 10^6$ , а в досліді – до  $7,5 \times 10^6$  КУО, тоді як чисельність клітин *B. megaterium* IMB B-7287 і *P. putida* IMB B-7289 є максимальними –  $1,3-1,5 \times 10^8$  у контролі і  $1,5-1,6 \times 10^8$  у варіанті з ГХЦГ, що у 20 разів перевищує чисельність клітин *S. maltophilia* IMB B-7288.

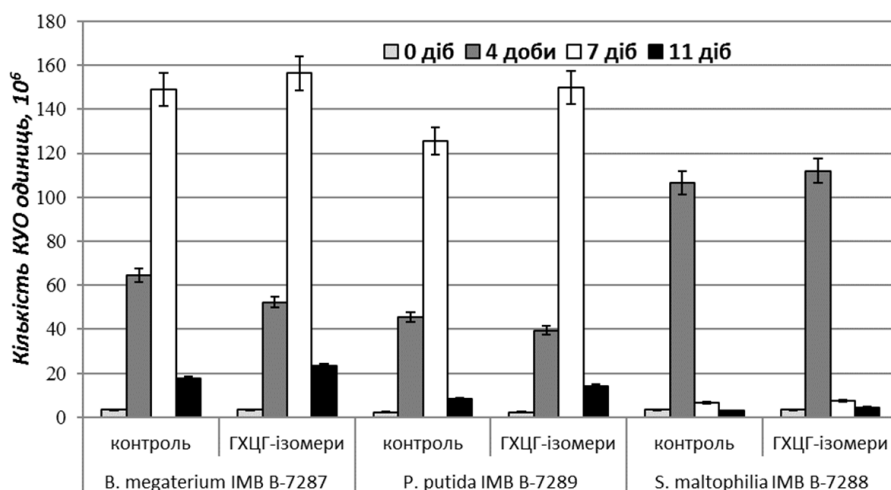


Рис. 2. Чисельність мікроорганізмів-деструкторів у складі препарату Біорем в динаміці росту ( 4, 7 і 11 днів) в рідкому середовищі і за розкладу ГХЦГ

Крім того, для *P. putida* IMB B-7289 відмічали стимулюючий ефект від присутності токсиканту – кількість життєздатних клітин у досліді перевищувала їхню кількість у контролі на 19,5% (рис.2).

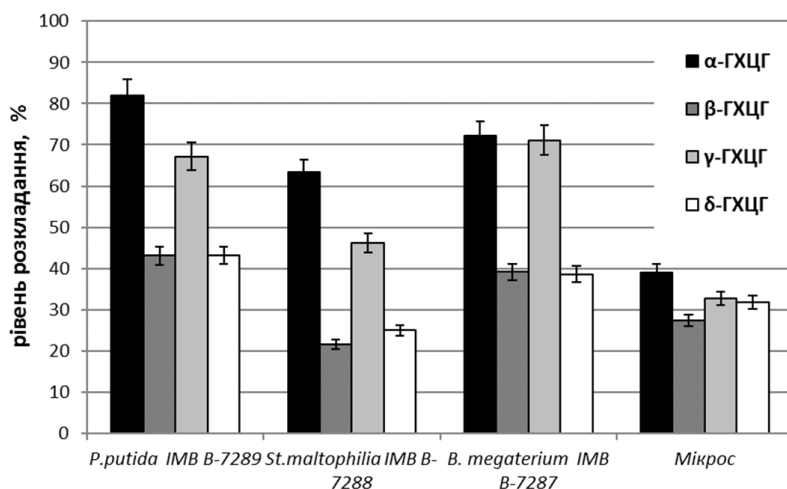


Рис. 3. Рівень деструкції ізомерів ГХЦГ у ґрунті окремими мікробними культурами із асоціації Біорем і природною мікробною асоціацією Мікрос

Наступним етапом було вивчення розкладу комплексу ізомерів ГХЦГ у ґрунті (рис.3). Максимальний рівень розкладу  $\gamma$ -ГХЦГ у ґрунті проявляв *B. megaterium* IMV B-7287 – на 71,1% ,  $\beta$ -ГХЦГ – на 39,2%, а також  $\delta$ -ГХЦГ – на 38,6% від вихідного вмісту. Проте за 10 діб спостережень *P. putida* IMV B-7289 був найбільш ефективним за активністю деградації трьох інших ізомерів:  $\alpha$ -ГХЦГ – розкладав на 81,9% ,  $\beta$ -ГХЦГ – на 43,1%,  $\delta$ -ГХЦГ – на 43,2% від вихідного вмісту (рис.3).

*S. maltophilia* IMV B-7288 також активно розкладав  $\alpha$ -ГХЦГ на 63,3%,  $\gamma$ -ГХЦГ – на 46,3%, що перевищувало інтенсивність деструкції цих ізомерів природною асоціацією Мікрос відповідно в 1,6 і 1,4 рази.

**Обговорення.** Аналізуючи ефективність деструкції комплексу ізомерів ГХЦХ окремими культурами в рідкому середовищі, ми встановили переваги *B. megaterium* IMV B-7287 над іншими штамами мікроорганізмів (рис.1). Проте після проведених досліджень деструкції ГХЦГ у ґрунті було виявлено максимальну деструкційну активність у *P. putida* IMV B-7289 (рис. 3). Отже, в залежності від умов існування інтенсивніше розкладає ГХЦГ або одна, або інша культура-деструктор, тому доцільним є поєднання *B. megaterium* IMV B-7287 і *P. putida* IMV B-7289 в одній мікробній асоціації (Біорем). Здатність до деструкції хлорорганічних токсикантів вперше була виявлена нами у представника роду *Stenotrophomonas*.

Вивчення особливостей росту мікроорганізмів-деструкторів у складі мікробної асоціації за присутності ГХЦГ свідчить про відмінності в здатності адаптуватися до агресивного агенту у даних мікроорганізмів. Активний ріст *S. maltophilia* IMV B-7288 і коротка лаг-фаза забезпечать активну деструкцію ГХЦГ вже на початку культивування, тоді як інші культури мікробної асоціації перебувають ще у лаг-фазі. Активний ріст *B. megaterium* IMV B-7287 і *P. putida* IMV B-7289, чисельність яких досягає максимуму на 7-у добу культивування, забезпечить тривалий поетапний період деградації комплексу ізомерів ГХЦГ. Таким чином, неспівпадіння фаз активного росту у мікроорганізмів асоціації Біорем сприятиме подовженню періоду інтенсивної деструкції токсиканту і більш ефективній його нейтралізації. Тому поєднання досліджуваних мікроорганізмів в одній асоціації є доцільним, це узгоджується також із літературними даними [4,5].

Для *P. putida* IMV B-7289 відмічали стимулюючий ефект від присутності токсиканту порівняно із контролем. Таке стимулювання росту дослідники пояснюють тим, що некритичні концентрації токсиканту стимулюють у мікроорганізмів захисні механізми, відповідальні за виживання в стресових умовах, активізується метаболізм і клітинний цикл – клітина зосереджує всі ресурси на реплікації генетичного матеріалу і поділі [7]. Зважаючи на особливості росту мікроорганізмів-деструкторів за присутності ізомерів ГХЦГ, можна стверджувати, що випробувана нами концентрація ізомерів ГХЦГ (20 мг/л) не є критично токсичною для культур у складі асоціації Біорем.

Дослідження деструкції комплексу ізомерів ГХЦГ у штучно забрудненому ґрунті виявило деякі закономірності. Так, всі мікроорганізми-деструктори асоціації Біорем в значно меншій мірі (на 46-65% нижча активність) розкладали ізомери  $\beta$ -ГХЦГ і  $\delta$ -ГХЦГ порівняно із інтенсивністю

деструкції  $\alpha$ -ГХЦГ і  $\gamma$ -ГХЦГ. Це пов'язано із відмінностями в будові ізомерів. Ізомери ГХЦГ з аксіальним або змішаним (аксіально-екваторіальним) положенням атомів хлору ( $\alpha$ -ГХЦГ і  $\gamma$ -ГХЦГ) більш доступні для взаємодії із ферментними системами мікроорганізмів, а отже, для деструкції. Важкодоступними є для мікробних ензимів  $\beta$ -ГХЦГ і  $\delta$ -ГХЦГ у зв'язку із високою симетричністю будови, а саме: із екваторіальним положенням усіх шести атомів хлору у молекулі  $\beta$ -ГХЦГ і п'яти із шести атомів хлору у молекулі  $\delta$ -ГХЦГ.

Треба відмітити, що деструкція таких гідрофобних органічних токсикантів, як ізомери ГХЦГ, гексахлорбензол, ДДТ, ДДЕ та ін. ускладнюється фізико-хімічними взаємодіями (сили Ван-дер-Ваальса) із біополімерами і мінералами ґрунту, а також колоїдами ґрунтового розчину. В результаті відбувається зв'язування гідрофобних молекул ГХЦГ часточками речовини ґрунту. Доступність ГХЦГ при цьому для мікробної деструкції суттєво знижується [3]. Цим пояснюється інтенсивність мікробної деструкції усіх чотирьох ізомерів ГХЦГ у забрудненому ґрунті порівняно із їх розкладом в рідкому середовищі.

*Висновки.* Встановлено, що асоціація Біорем в рідкій культурі розкладає комплекс ізомерів ГХЦГ на 70,9-86,7%. При цьому першим у процес деструкції вступає *S. maltophilia* IMV B-7288, штами *P. putida* IMV B-7289 і *B. megaterium* IMV B-7287 включаються в процес деструкції пізніше, тому в цілому подовжується період активного росту і деструкції ГХЦГ, що є важливим моментом [4]. Виявлено, що, в залежності від умов (в рідкому середовищі чи в ґрунті), інтенсивніше розкладає ізомери ГХЦГ та чи інша культура-деструктор, тому доцільним є поєднання *B. megaterium* IMV B-7287, *P. putida* IMV B-7289 і *S. maltophilia* IMV B-7288 в одній мікробній асоціації (Біорем). Штучно створена асоціація мікроорганізмів-деструкторів Біорем є перспективною до застосування як бактеріальний препарат для ремедіації територій, забруднених ГХЦГ.

## БИОДЕСТРУКЦИЯ ИЗОМЕРОВ ГЕКСАХЛОРИЦИКЛОГЕКСАНА ЕСТЕСТВЕННОЙ И ИСКУССТВЕННО СОЗДАННОЙ МИКРОБНЫМИ АССОЦИАЦИЯМИ

Н.А.Ямборко<sup>1</sup>, Г.А.Иутинская<sup>1</sup>, И.В. Свистунова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Акад. Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

<sup>2</sup>Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,  
ул. Героев Оборона, 15, Киев, 03041, Украина

### Резюме

**Цель.** Исследовать особенности деструкции комплекса изомеров гексахлорциклогексана (ГХЦГ) естественной микробной ассоциацией Микрос и искусственно созданной микробной ассоциацией Биорем (*Pseudomonas putida* ИМВ В-7289, *Bacillus megaterium* ИМВ В-7287, *Stenotrophomonas maltophilia* ИМВ В-7288) и отдельными культурами-деструкторами – компонентами ассоциации. **Методы:** микробиологические, газовая хроматография, статистические. **Результаты.** Ассоциация Биорем в жидкой культуре разлагает комплекс изомеров ГХЦГ на 70,9-86,7%. Первым процесс



деструкции начинает *S. maltophilia* ИМВ В-7288, штаммы *P. putida* ИМВ В-7289 и *B. megaterium* ИМВ В-7287 включаются в процесс деструкции на 4-7 сутки, в целом удлиняя период активного роста и деструкции ГХЦГ. В жидкой питательной среде интенсивнее разлагала изомеры ГХЦГ *B. megaterium* ИМВ В-7287, в условиях почвы – *P. putida* ИМВ В-7289. Вследствие этого целесообразно объединить *B. megaterium* ИМВ В-7287, *P. putida* ИМВ В-7289 и *S. maltophilia* ИМВ В-7288 в одну микробную ассоциацию (Биорем). **Выводы.** Искусственно созданная ассоциация микроорганизмов-деструкторов Биорем является перспективной в качестве бактериального препарата для ремедиации территорий, загрязнённых ГХЦГ.

*Ключевые слова:* микроорганизмы-деструкторы, хлорорганические пестициды, гексахлорциклогексан, линдан, биопрепарат, биодеструкция загрязнений.

## BIODESTRUCTION OF HEXACHLOROCYCLOHEXANE ISOMERS BY NATURAL AND ARTIFICIAL CREATED MICROBIAL ASSOCIATIONS

*N.A. Yamborko<sup>1</sup>, G.A. Iutyńska<sup>1</sup>, I.V. Svistunova<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine  
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine*

<sup>2</sup> *National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine  
13 Heroyiv Oborony Str., Kyiv, 03041, Ukraine*

### Summary

**Aim.** To study the specific destruction features of the HCH isomers complex by the artificially created association Biorem (*Pseudomonas putida* IMV B-7287, *Bacillus megaterium* IMV B-7287, *Stenotrophomonas maltophilia* IMV B-7288) and the native soil microbial association Micros, as well as individual strains – components of the association. **Methods:** microbiological, gas chromatography, statistical. **Results.** It was found the Biorem association decomposes the HCH isomers complex in liquid medium to 70.9-86.7% of initial level. *S. maltophilia* IMV B-7288 starts the destruction process the first, the strains *P. putida* IMV B-7289 and *B. megaterium* IMV B-7287 are including the destruction process on the 4th-7th day, therefore the active growth and destruction of HCH were prolonged. It was found that, depending on the conditions, one or another strain-destructor decomposed of HCH-isomers more intensively. So it is advisable to combine *B. megaterium* IMV B-7287, *P. putida* IMV B-7289 and *S. maltophilia* IMV B-7288 in the same microbial association (Biorem). **Conclusions.** Artificially created association of microorganisms-destructors Biorem can be applied as a bacterial preparation for remediation of HCH contaminated areas.

*Keywords:* microorganisms-destructors, organochlorine pesticides, HCH, lindane, biopreparation, biodegradation of contaminants.

1. [List of pesticides and agrochemicals authorized for use in Ukraine in 2008], Kiev: Uninvest Media, 2008; 448 p. Ukrainian.
2. [State Register of Pesticides and Agrochemicals Permitted for Use in Ukraine (supplemented 01.01.2017 in accordance with the requirements of the Resolution of the Cabinet of Ministers of Ukraine)] dated November 21, 2007 No. 1328. Ukrainian. <https://menr.gov.ua/content/derzhavniy-reestr-pesticidiv-i-agrohimiKativ>.

3. Bhaganna P, Volkens RJM, Bell ANW, Kluge K, Timson DJ, McGrath JW Ruijssenaars HJ, Hallsworth JE Hydrophobic substances induce water stress in microbial cells. *Microbial Biotechnology*. 2010; 3(6):701–716.
4. Kumar S, Bidlan R, Sharma JG. Degradation of Lindane by Sludge Enriched on Mixed Commercial Formulations of Organophosphate and Pyrethroid Pesticides. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2016; 5(5): 138-152.  
doi: <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.505.015>
5. Manonmani HK, Chandrashekaraiiah DH, Reddy SN, Elcey CD, Kunhi AAM. Isolation and acclimation of a microbial consortium for improved aerobic degradation of hexachlorocyclohexane. *Journal Agric. Food Chem.* 2000; 48:4341–4351. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf990712c>.
6. Pannu R, Kumar D. Biodegradation study of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane using selected bacteria isolated from agricultural soil. *African Journal of Microbiology Research*. 2014; 8(36):3335-3346 / 10.5897/AJMR2014.6842
7. Phillips TM, Seech AG, Lee H, Trevors JT. Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms. *Biodegradation*. 2005; 16:363–392.
8. Priya D, Mukesh Kumar DJ, Kalaichelvan PT. Optimization and production of Extracellular alkaline phosphatase from *Bacillus megaterium*. *International Journal of ChemTech Research CODEN (USA)*; 2014; 6 (9):4251-4258.
9. Regulation (EC) No 850/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on persistent organic pollutants and amending Directive 79/117/EEC. *Official Journal of the European Union*.-30.04.2004.-P.7-49. <http://eur-lex.europa.eu> (ANNEX II).
10. Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, EPA Method 8120 A; Washington: DC, 3rd Edition, U.S. EPA 1990. P. 456.
11. Yamborko NA, Iutynska GA, Pindrus AA, Yaroshenko LV. [Physiological properties and taxonomic positions of soil microorganisms decomposing hexachlorocyclohexan]. *Mikrobiol Z.* 2010; 72(4):10-16. Ukrainian.
12. Yamborko NA, Pindrus AA. [Destruction of xenobiotics hexachlorobenzene and hexachlorocyclohexane by soil microorganisms at chlorine deficiency conditions in nutrient medium]. In *daRostim 2012 Microbial Biotechnology: topicality and future*; 2012 Nov.19-22; Kiev, Ukraine: Kiev “Nichlava”. 2012. p. 370-371. Russian.
13. Yamborko NA. Biorem as promising microbial preparation for degradation persistence organic hexachlorocyclohexane (HCH) pollution in soil. In *Technological aspects of modern agricultural production and environmental protection*; 2017 Nov. 8. 11; Almyty, Kazakhstan. Almyty: Al-Faraby Kazakh National University Press, 2017. p. 314-317. <http://darostim-conference.info>.

Отримано 13.06.2018