

УДК 579.222.2:579.222.4:579.258

НОВЫЕ АССОЦИАЦИИ АЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ, АКТИВНО РАЗЛАГАЮЩИЕ ЛИНДАН

© 2021 г. Э. А. Назарова¹, Д. О. Егорова¹ *, Л. Н. Ананьина¹,
Е. С. Корсакова¹, Е. Г. Плотникова¹

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, 614081 Россия

*e-mail: daryao@rambler.ru

Поступила в редакцию 25.03.2021 г.

После доработки 14.04.2021 г.

Принята к публикации 23.04.2021 г.

В результате селекции получены ассоциации аэробных бактерий, способные осуществлять разложение хлорорганического пестицида – линдана, в концентрации 0.1 г/л в минеральной среде за 30–180 сут. Установлено, что деградирующие линдан ассоциации L2-6, L3-6, L4-6, L6-6 и L4-10 характеризовались низким уровнем видовой разнообразия (индекс Шеннона в пределах 1.88–2.46). В составе ассоциаций выявлены представители классов γ -*Proteobacteria* (рода *Pseudomonas*) и α -*Proteobacteria* (родов *Novosphingobium*, *Sphingoaureticus*, *Sphingomonas*, *Tardibacter*). Показано, что в тотальных ДНК, выделенных из бактериальных ассоциаций шестого пассажа (L2-6, L3-6, L4-6 и L6-6), присутствовали гены, обладающие 98–100% уровнем сходства с *linABCX*-генами, кодирующими ферменты “верхнего” пути аэробной трансформации линдана. Бактериальная ассоциация L4-10 эффективно разлагала линдан в минеральной среде (100%-ная деструкция 0.1 и 0.3 г/л линдана за 30 и 90 сут соответственно) и в модельных почвенных системах (78.1–90%-ная деструкция 0.5 г/кг линдана за 45 сут). Применение молекулярно-генетических и аналитических методов позволило предположить, что ассоциация L4-10 осуществляла разложение не только линдана, но и образующихся в процессе его метаболизма побочных хлорорганических соединений (1,3,4-трихлорбензол, 2,5-дихлорфенол). Таким образом, полученные в настоящем исследовании бактериальные ассоциации представляют интерес для разработки технологий биоремедиации территорий, загрязненных линданом.

Ключевые слова: бактериальные ассоциации, линдан, деструкция, *lin*-гены

DOI: 10.31857/S0555109921050111

Хлорорганические пестициды широко использовались в сельском хозяйстве по всему миру на протяжении нескольких десятилетий. Для удовлетворения потребностей сельхозпроизводителей хлорорганические пестициды (ХОП), такие как гексахлоран, альдрин, дихлордифенилтрихлорметилметан, линдан/гексахлорциклогексан (ГХЦГ) и некоторые другие, выпускались в промышленных масштабах. Однако к концу 20 века было установлено, что ХОП оказывают негативное воздействие на все компоненты природы, вследствие их высокой токсичности, устойчивости к физико-химическому и биологическому воздействию и способности аккумулироваться в пищевых цепях. В 2001 г. мировым сообществом принята Стокгольмская конвенция, согласно которой девять ХОП отнесены к группе стойких органических загрязнителей (СОЗ), запрещены к производству и применению, и подлежат уничтожению. В 2009 г.

список СОЗ по хлорорганическим пестицидам был расширен, в него вошли все изомеры гексахлорциклогексана [1].

Линдан – γ -изомер гексахлорциклогексана (ГХЦГ), применялся как пестицид широкого спектра действия. При его промышленном синтезе получали “технический ГХЦГ”, состоящий из α -ГХЦГ (55–80% в смеси), β -ГХЦГ (5–14% в смеси), γ -ГХЦГ (8–15% в смеси) и δ -ГХЦГ (2–16% в смеси) [2]. Для обработки сельскохозяйственных территорий по всему миру было использовано более 400 тыс. т изомеров ГХЦГ, в том числе – γ -ГХЦГ/линдан [1]. Особые физико-химические свойства изомеров ГХЦГ привели к широкому распространению данных соединений в природе. Однако наиболее загрязненными участками остаются места их производства, системного применения и захоронения. Одним из мест, на территории которого на ряду с другими

соединениями группы СОЗ зафиксировано наличие ГХЦГ является г. Чапаевск (ОАО “СВЗХ”, Россия) [3–5].

Одним из наиболее перспективных методов разложения ГХЦГ является бактериальная деструкция. Выделены и описаны бактериальные сообщества и индивидуальные штаммы, осуществляющие трансформацию изомеров ГХЦГ, в том числе линдана [6–12]. Большинство известных штаммов-деструкторов линдана являются представителями родов *Sphingobium* и *Sphingomonas*. Необходимо отметить, что процесс биоразложения протекает медленно, что обусловлено низкой водорастворимостью, высокой сорбционной активностью, липофильностью и токсичностью γ -ГХЦГ для живых организмов. У всех исследованных аэробных бактерий биохимический путь разложения линдана начинается с реакции гидродеchlorирования и условно разделен на “верхний” и “нижний” (рис. 1). “Верхний” путь включает в себя трансформацию линдана до образования 2,5-дихлоргидрохинона под действием ферментов, кодируемых генами *linABCX*, “нижний” путь – разложение 2,5-дихлоргидрохинона до сукцинил-КоА и ацетил-КоА под действием ферментов, кодируемых генами *linDEFGHJ* [7, 9, 10, 13]. Катаболические гены деградации ГХЦГ практически идентичны у представителей различных родов бактерий, включая грамположительные группы. Рядом исследователей выдвинуто предположение о возможности горизонтального переноса *lin*-генов у бактерий [9, 14]. Несмотря на высокое сходство генов и ферментов деструкции линдана, скорость и эффективность трансформации данного соединения у известных штаммов существенно варьирует. Период деструкции, за который осуществляется разложение более 50% линдана от начальной концентрации (20–100 мг/л), составляет от 5 до 66 сут [15–26].

Известно, что длительное присутствие загрязнителя в почве приводит к изменениям в составе и численности микробиоценоза. Доминирующую позицию занимают бактериальные штаммы, устойчивые к токсическому действию загрязнителя и способные использовать данное соединение как источник углерода и энергии [8, 12, 21, 27]. В связи с этим представляет интерес изучение микробных ассоциаций почв с территорий, длительное время загрязненных линданом и другими изомерами ГХЦГ. В настоящем исследовании почвы были отобраны с территории ОАО “СВЗХ” г. Чапаевска (Россия). На предприятии более 50 лет производили техническую смесь ГХЦГ [5].

Цель работы – получение и изучение структуры новых аэробных бактериальных ассоциаций, осуществляющих разложение линдана, анализ ключевых генов деструкции линдана, представленных в данных ассоциациях, оценка биореме-

диационного потенциала наиболее активной ассоциации в модельных почвенных условиях.

МЕТОДИКА

Образцы почв были отобраны на шести участках на территории ОАО “Средне-Волжский завод химикатов” (г. Чапаевск, Россия). Отбор осуществляли согласно ГОСТ 17.4.3.01–82 [28]. Для накопительного культивирования использовали усредненную пробу почвы.

Среды культивирования. Состав сред, используемых для выращивания бактериальных ассоциаций. Минеральная среда Раймонда (г/л): Na_2CO_3 – 0.1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0.02; $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0.02; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ – 1.0; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ – 1.5; NaCl – 0.8. pH 7.4 [29]. Минеральная среда К1 (г/л): $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 4.17; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.4; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.5; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.01; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.15; FeSO_4 – 0.018; $\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ – 0.032; pH 7.3 [30]. Среда Луриа–Бертани (г/л): триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 10; агар – 15 [31].

Схема селекции ассоциаций, разлагающих линдан. Селекцию осуществляли методом накопительного культивирования с последовательными пересевами (пассажами). 1 пассаж: образец почвы (1 г) помещали в колбу Эрленмейера объемом 250 мл, содержащую 50 мл минеральной среды Раймонда с 0.8 г/л NaCl [29] и 0.3 г/л линдана. Культивирование осуществляли на термостатируемой качалке Environmental Shaker-Incubator ES-20/60 (“BioSan”, Латвия) при 120 об./мин и 28°C в течение 30 сут. Последующие пассажи (2–16): содержимое колбы предыдущего пассажа отделяли от минеральной среды центрифугированием (центрифуга 3К30 “Sartorius”, Германия, 10 мин, 10174 г). Осадок ресуспендировали в 50 мл среды Раймонда и переносили в колбу Эрленмейера объемом 250 мл содержащую 0.3 г/л линдана. Культивирование проводили как для 1 пассажа.

Выделение бактериальных ассоциаций. 10 мл бактериальной суспензии, полученной при накопительном культивировании на этапе 3, 6, 8, 10 и 16 пассажей, отделяли от почвенных частиц фильтрованием через бумажный фильтр (красная лента, “Sartorius”, Германия). Полученную бактериальную суспензию помещали в колбу Эрленмейера объемом 250 мл, содержащую 100 мл минеральной среды К1 [30] и 0.3 г/л линдана, культивировали на термостатируемой качалке Environmental Shaker-Incubator ES-20/60 (“BioSan”, Латвия) со скоростью 120 об./мин и 28°C с последовательными пересевами на среду К1 с линданом в концентрации 0.3 г/л через каждые 7 дней. Бактериальное сообщество считали стабильным, если при 5 последовательных пересевах морфологический состав и соотношение колоний (одинаковых мор-

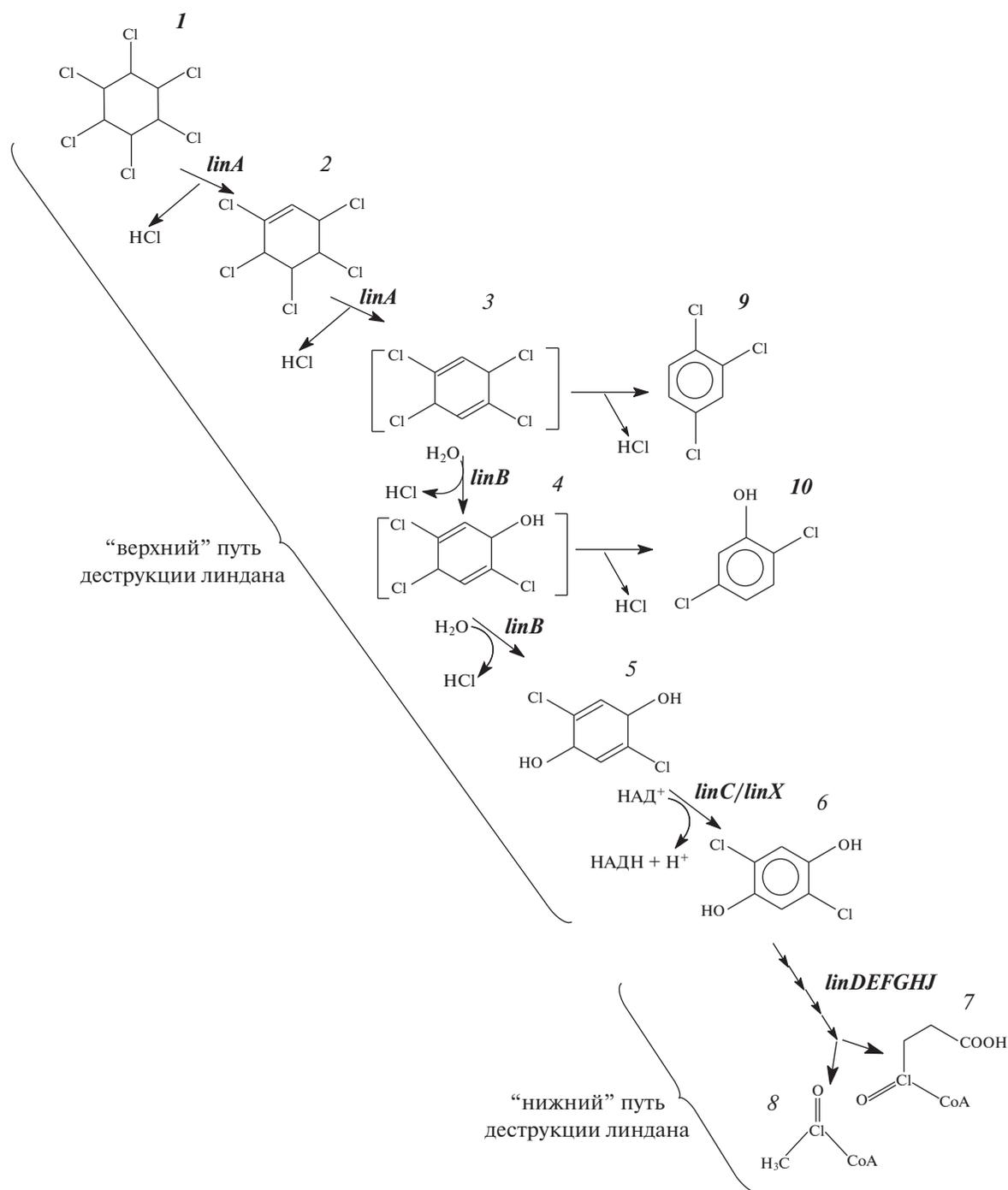


Рис. 1. Аэробный путь бактериального разложения линдана (γ -ГХЦГ) [7, 9, 10, 13]: 1 – γ -ГХЦГ/линдан, 2 – γ -пентахлорциклогексен, 3 – 1,3,4,6-тетрахлоро-1,4-циклогексадиен, 4 – 2,4,5-трихлоро-2,5-циклогексадиен-1-ол, 5 – 2,5-дихлоро-2,5-циклодиен-1,4-диол, 6 – 2,5-дихлоргидрохинон, 7 – сукцинил-КоА, 8 – ацетил-КоА, 9 – 1,2,4-трихлорбензол, 10 – 2,5-дихлорфенол. Жирным шрифтом показаны соединения и гены, детектированные в настоящем исследовании.

фотипов) не изменялись. Контроль морфологии колоний осуществляли при высеве бактериальных ассоциаций на агаризованную среду Луриа-Бертани (LB) [31] с применением классического метода серийных разведений. При этом также проводили подсчет количества колониеобразующих единиц.

Выделение тотальной ДНК. Тотальную ДНК бактериальных ассоциаций выделяли общепринятым методом [32]. 2 мл бактериальной культуры осаждали на центрифуге miniSpin (“Eppendorf”, Германия) при 11200 g 10 мин. Осадок ресуспендировали в 80 мкл 0.05M NaOH. Лизис проводили путем последовательной четырехкрат-

Таблица 1. Кинетические параметры деструкции линдана (0.1 г/л) ассоциациями

Накопительная культура/Ассоциация*	90–100%-ная деструкция линдана, сут	Зависимость концентрации линдана от времени деструкции**	R ^{2***}	μ, мг/(л × сут)
L2/L2-3	150	$y = -0.6818x + 104.05$	0.994	0.6 ± 0.2
L2/L2-6	90	$y = -1.1762x + 103.93$	0.982	1.1 ± 0.1
L2/L2-8	120	$y = -0.8089x + 95.644$	0.996	0.8 ± 0.2
L3/L3-3	180	$y = -0.567x + 108.26$	0.979	0.5 ± 0.1
L3/L3-6	180	$y = -0.6238x + 107.53$	0.985	0.6 ± 0.1
L4/L4-3	150	$y = -0.6376x + 96.273$	0.988	0.6 ± 0.1
L4/L4-6	90	$y = -1.1738x + 94.964$	0.966	1.2 ± 0.2
L4/L4-8	45	$y = -2.2333x + 98.5$	0.998	2.3 ± 0.3
L4/L4-10	30	$y = -3.333x + 97.0$	0.989	3.3 ± 0.1
L4/L4-10****	90	$y = -3.3333x + 281.43$	0.974	3.2 ± 0.1
L4/L4-16	50	$y = -1.667x + 97.0$	0.989	1.7 ± 0.2
L6/L6-3	180	$y = -0.5553x + 98.516$	0.991	0.6 ± 0.1
L6/L6-6	180	$y = -0.5641x + 102.69$	0.993	0.5 ± 0.1

* Вторая цифра в обозначении ассоциации соответствует пассажи в селекции; ** y – концентрация линдана, x – время деструкции; *** коэффициент достоверности аппроксимации; **** концентрация линдана 0.3 г/л.

ной экспозиции с чередованием 15 мин при температуре 95°C и 15 мин при –20°C.

Анализ методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ). Для амплификации фрагмента гена 16S рРНК, составляющего 566 п.н. по нумерации *E. coli*, применяли праймеры: 27F, включающий 40 п.н. GC-хвост на 5'-конце, и 518R (табл. 1) [33]. Амплификацию проводили в 50 мкл смеси, содержащей 0.25 мМ дНТФ, 0.3 мкМ праймера (каждого), 1.5 мМ MgCl₂, 1× *Green* буфер для *Dream Taq*-полимеразы (“Thermo Fisher Scientific”, США), 2 ед. акт. *Dream Taq*-полимеразы (“Thermo Fisher Scientific”, США) и 2 мкл ДНК-матрицы в термоциклере My Cycler (“Bio-Rad”, США). Далее проводили электрофорез в 1.5%-ном агарозном геле в 0.5× TBE-буфере при напряжении электрического поля 5.0 В/см в течение 40 мин для подтверждения присутствия продуктов специфической амплификации. ДНК была визуализирована после окрашивания бромистым этидием (0.5 мкг/мл) в проходящем УФ-свете и документирована системой Gel Doc XR (“Bio-Rad”, США).

Для образцов, в которых был получен искомый фрагмент гена 16S рРНК, проводили денатурирующий градиентный гель-электрофорез (ДГГЭ) в 6%-ном (вес./об.) полиакриламидном геле с линейным денатурирующим химическим градиентом от 30 до 60%, где 100% составляла 7 М мочевины и 40% формамид. Разделение проводили в течение 16 ч при 45 В и 60°C на приборе Dcode™

Universal Mutation System (“Bio-Rad”, США). Гели окрашивали 15 мин в растворе бромистого этидия (0.5 мкг/мл), далее промывали в деионизированной воде в течение 10 мин, визуализировали в проходящем УФ-свете и документировали системой Gel Doc XR (“Bio-Rad”, США).

Анализ ДГГЭ-профилей осуществляли путем детекции полос в геле, используя алгоритм поиска полос пакета программ Quantity One версия 4.6 (“Bio-Rad”, США). Для расчета степеней сходства ДГГЭ-профилей использовали коэффициент Дайса, построение дендрограммы осуществляли с помощью метода UPGMA из пакета программ Quantity One версия 4.6 (“Bio-Rad”, США). Полученные ДГГЭ-профили были проанализированы с помощью индекса Шеннона-Уивера. При этом предполагалось, что одна полоса в геле (операциональная таксономическая единица, ОТЕ) соответствует одному виду, а интенсивность свечения отражает ее численность. При операциях учитывали положение полосы в геле. В анализ включали полосы, имеющие выше 0.2% от суммарной интенсивности полос дорожки.

Для подготовки к секвенированию фрагменты ДНК были элюированы из геля и использованы в качестве матрицы для амплификации с праймерами 27F и 518R. Описание условий секвенирования и анализа нуклеотидных последовательностей приведены ниже.

Анализ методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Для харак-

теристика бактериальной ассоциации L4-10 был использован метод ПЦР-РВ. При амплификации бактериальных генов 16S рРНК с матрицы тотальной ДНК были использованы праймеры Eub338 и Eub518 [34]. ПЦР-РВ проводили в присутствии красителя Sybr Green I в наборе реактивов 2X Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (“Thermo Scientific”, США) на приборе “CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems” (“Bio-Rad Laboratories”, США), согласно методике [35]. Для стандартной калибровочной кривой были использованы образцы очищенной геномной ДНК штаммов *Rhodococcus* sp. KT112-7 и KT723 из коллекции Лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии “ИЭГМ УрО РАН”.

Амплификация функциональных генов деструкции линдана. Функциональные гены деструкции γ -ГХЦГ (*linA*, *linB*, *linC*, *linX*) определяли в тотальной ДНК бактериальных ассоциаций с использованием праймеров [36, 37]. Для подбора последовательностей олигонуклеотидов к консервативным участкам гена *linA* были использованы программы Primer3Plus (<http://primer3plus.com/>) и FastPCR (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>). Амплификацию проводили в конечном объеме 12.5 мкл в десятикратном буфере с добавлением 0.75 мкл 1 М раствора $MgCl_2$, бактериальных прямого и обратного праймеров по 0.5 мкл 1 М раствора, 1.25 мкл 2.5 мМ раствора нуклеотидов, 0.3 мкл Taq полимеразы (“Синтол”, Россия) и 1 мкл ДНК-матрицы. Температурный профиль амплификации: 95°C – 3 мин, следующие 30 циклов – 95°C – 30 с, 55°C – 1 мин, 72°C – 1 мин [38]. Продукты ПЦР разделяли методом электрофореза в агарозном геле (концентрация агарозы 0.8%) в 1× Трис-боратном буфере (“Thermo scientific”, Литва) при напряжении 10 В/см и визуализировали в проходящем УФ-свете с использованием системы GelDoc XRtM (“Bio-Rad Laboratories”, США) после окрашивания в растворе бромистого этидия.

Секвенирование и анализ *lin*-генов и фрагментов генов 16S рРНК. Определение нуклеотидных последовательностей генов осуществляли с помощью набора реактивов “DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit” на автоматическом секвенаторе “Genetic Analyser 3500XL” (“Applied Biosystems”, США) согласно рекомендациям производителя. Поиск гомологичных последовательностей производили по базам данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и EzTaxon (<https://www.ezbiocloud.net>). Для визуализации сходства путем построения эволюционного дерева использовали алгоритм UPGMA (MEGA 10.0). Нуклеотидные последовательности фрагментов *lin*-генов и генов 16S рРНК, полученные в настоящем исследовании, депонированы в международной базе данных GenBank. Номера, присвоенные данным

последовательностям, представлены в разделе “Результаты и обсуждение”.

Деструкция линдана. Деструкцию линдана изучали при периодическом культивировании и в опытах с отмытыми клетками. Периодическое культивирование осуществляли в колбах Эрленмейера на 100 мл, содержащих 30 мл среды K1, 0.1 или 0.3 г/л линдана и бактериальную ассоциацию в конечной концентрации $1.51 \pm 0.02 \times 10^4$ КОЕ/мл. Анализ содержания линдана в среде проводили каждые 15 сут. Линдан экстрагировали хлороформом из всего объема среды в колбе.

В опытах с отмытыми клетками бактериальную культуру с оптической плотностью $OP_{600} = 1.0$ помещали во флаконы (5 мл) с тефлоновыми крышками и вносили ацетоновый раствор линдана до конечной концентрации 0.3 г/л. Анализ содержания метаболитов осуществляли на 4, 8, 18 и 30 сут культивирования. Культивирование в обоих случаях осуществляли на термостатируемой качалке Environmental Shaker-Incubator ES-20/60 (“BioSan”, Латвия) при 120 об./мин и 28°C. Эксперименты проводили в трехкратной повторности для каждого временного отрезка.

ГХ-МС-анализ линдана и 2,5-дихлорфенола. Хлороформный экстракт культуральной жидкости предварительно обезвоживали добавлением сульфата натрия и анализировали на газовом хроматографе (“Agilent 6890/5973N”, США) с масс-селективным детектором и кварцевой колонкой “RESTEK RTx-5MS” (“Restek”, США). В качестве газа-носителя использовали гелий, скорость потока 1 мл/мин. Объем впрыска 1.0 мкл. Режим анализа линдана: температура испарителя 260°C, программирование подъема температуры от 130°C, далее 3-минутная экспозиция с последующим нагревом до 280°C со скоростью 10°C/мин. Общее время анализа 18 мин. Режим анализа 2,5-дихлорфенола: температура испарителя 220°C, начальная температура колонки 60°C (2-минутная экспозиция) с последующим нагреванием при 20°C/мин до 300°C. Общее время анализа 14 мин. Анализ хроматограмм проводили с помощью программы MSD Productivity ChemStation (“Agilent”, США). Концентрацию анализируемых веществ рассчитывали по площадям пиков в сравнении с площадью пиков контрольного образца.

Анализ метаболитов деструкции линдана. Метаболиты линдана анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе “LC-20A Prominace” (“Shimadzu”, Япония) с УФ-детектором (при 205 нм) и колонкой C18 (“Supelco”, США) в системе ацетонитрил – 0.1%-ный H_3PO_4 (70 : 30). Стандартами для сравнения являлись 1,2,4-трихлорбензол, 2,5-дихлорфенол, 2,5-дихлоргидрохинон, катехол (“Sigma-Aldrich”, США), растворенные в ацетонитриле, а также минеральная среда культивирования, со-

держая культуру микроорганизма, но без субстрата. Наличие ионов хлора в среде определяли по помутнению среды после реакции ионов хлора с азотнокислым серебром, в культуральной жидкости, освобожденной от клеток [30].

Модельный эксперимент по биоаугментации ассоциации L4-10 в почву, искусственно загрязненную линданом. Для модельного эксперимента использовали дерново-подзолистую почву, отобранную на территории заказника “Предуралье” (Пермский край, Россия), не загрязненную химическими органическими соединениями. В эксперименте было заложено четыре линии, в каждой линдан вносили до конечной концентрации 0.5 г/кг сухой почвы: 1) нативная почва (**Пмф**); 2) нативная почва, аугментированная бактериальной ассоциацией L4-10 (конечная концентрация культуры 3×10^8 КОЕ/г почвы, **Пмф + L4-10**); 3) стерильная почва (трехкратная стерилизация автоклавированием по 40 мин при 121°C с интервалом 24 ч, **Пст**); 4) стерильная почва с внесенной бактериальной ассоциацией L4-10 (конечная концентрация культуры 3×10^8 КОЕ/г почвы, **Пст + L4-10**). Культивирование проводили в термостате ТС-1/80 (“СПУ”, Россия) при 28°C, увлажнение почвы поддерживали внесением минеральной среды К1 до 40% влагоемкости почвы. Продолжительность эксперимента составила 45 сут. Экстракцию проводили хлороформом трехкратно с объединением фракций. ГХ-МС-анализ экстрактов проводили как описано выше. Профиль микробного сообщества получали методом ДГГЭ (как описано выше), ДНК из почвы выделяли с помощью набора FastDNA Spin Kit For Soil (“MP Biomedicals”, США) через 21 и 45 сут культивирования.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты проведены в трехкратной повторности. Анализ осуществляли с помощью программы STATISTICA 6.0. Для описания результатов исследования применяли стандартные методы параметрической статистики: рассчитывали среднее арифметическое (M), стандартное отклонение (SD). Сравнение двух групп проводили при помощи двустороннего критерия Стьюдента. Критический уровень значимости принимался в данном исследовании 0.05. Рассчитывали эффективность деструкции линдана (I), скорость деструкции (μ) (2), зависимости концентрации линдана от времени инкубации выражали в виде уравнение первого приближения с учетом коэффициента достоверности аппроксимации (R²).

$$D (\%) = 100 - ((C_t \times 100) / C_0), \quad (1)$$

где D – эффективность деструкции (%); C_t – концентрация линдана через определенный промежуток времени; C₀ – концентрация линдана в начальный момент времени;

$$\mu = (C_0 - C_t) / (t_i - t_0), \quad (2)$$

где C₀ – концентрация линдана в начальный момент времени, мг/л, C_t – концентрация линдана в конечный момент времени, мг/л, t_i – конечный момент времени, сут, t₀ – начальный момент времени, сут.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Селекция аэробных бактериальных сообществ, разлагающих линдан. Для проведения селекции бактериальных сообществ были использованы шесть почвенных образцов, длительное время загрязненных смесью ГХЦГ и других соединений группы стойких органических загрязнителей. Из четырех образцов были получены накопительные культуры, содержащие в своем составе ассоциации аэробных бактерий, осуществляющих разложение линдана/γ-ГХЦГ (табл. 1). Бактериальные ассоциации, обозначенные L2-3, L3-3, L4-3 и L6-3, которые были выделены с третьего пассажа селекции, характеризовались низкой активностью биодеградации. Период разложения 0.1 г/л линдана составлял 5–6 мес. Скорость деструкции линдана у ассоциаций L3-6 и L6-6, несмотря на более длительный срок селекции (шестой пассаж), не изменилась. Напротив, анализ кинетических параметров деструкции линдана у ассоциаций L2-6 и L4-6 показал, что 90–100%-ное разложение субстрата достигалось в 1.7 раза быстрее (табл. 1). Дальнейшая селекция привела к повышению деградативного потенциала только в случае бактериального сообщества накопительной культуры L4. На этапе 8 пассажа селекции временные интервалы, необходимые для разложения линдана ассоциацией L4-8, сократились в 1.9 – 2.0 раза по сравнению с ассоциацией 6 пассажа селекции (табл. 1). Последующую селекцию проводили, используя накопительную культуру L4. Сравнение биодеградативной активности у ассоциаций 10 и 16 пассажей (L4-10 и L4-16) показало, что наиболее перспективная для дальнейшего изучения бактериальная ассоциация сформировалась на этапе 10 пассажа селекции (табл. 1). Следует отметить, что выделенные в настоящем исследовании бактериальные ассоциации, превосходят по кинетическим параметрам ассоциацию бактерий рода *Streptomyces* [20, 21, 23, 39] и близки по активности биодеградации со штаммами *Bacillus* sp. НР-9, НР-10 и НР-13 [18]. Штаммы-деструкторы *Streptomyces* sp. М7 и *Chromohalobacter* sp. LD2 осуществляли 49–89%ую деструкцию 10–50 мг/л линдана за 4–7 сут, однако не описана их активность при более высоких концентрациях линдана [15, 16]. Полученные результаты позволяют предположить, что селекция в лабораторных условиях в присутствии высоких концентраций линдана, приводила к формированию бактериальных ассоциаций, обладающих высоким линдан-деградирующим

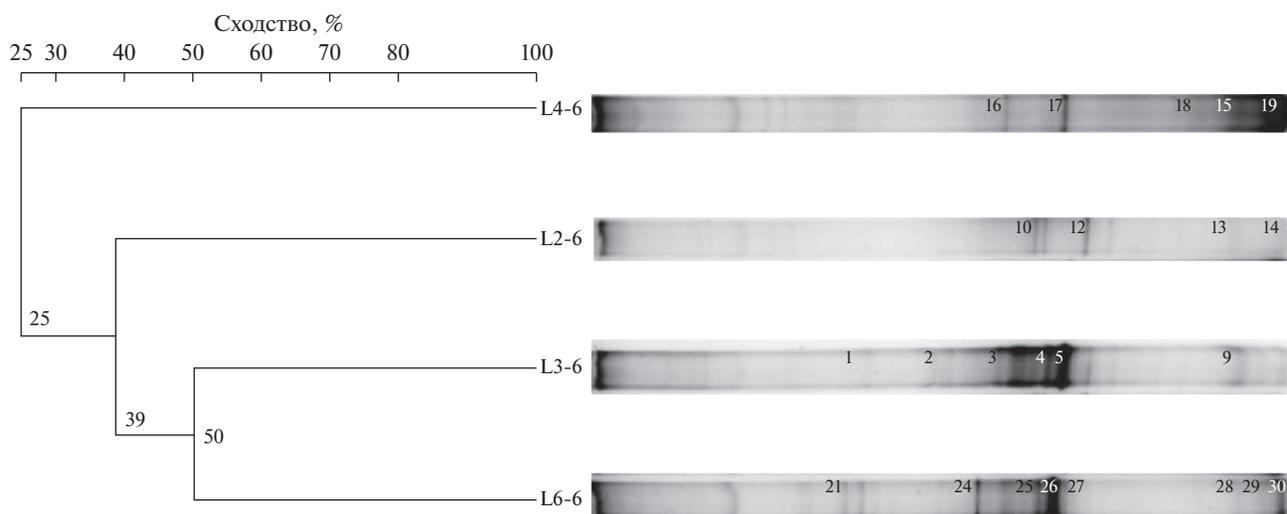


Рис. 2. Дендрограмма, построенная методом UPGMA, на основании анализа сходства ДГГЭ-профилей исследуемых ассоциаций. В узлах кластеров приведены значения уровня сходства (%). Цифрами на геле обозначены фрагменты ДНК, для которых установлена нуклеотидная последовательность (табл. 3).

щим потенциалом, на основе почвенных микробных сообществ.

Структура ассоциаций, деградирующих линдан.

Для исследования состава полученных стабильных бактериальных ассоциаций 6 пассажа был проведен ДГГЭ-анализ тотальной ДНК (рис. 2). Установлено, что ассоциации L2-6, L3-6, L4-6 и L6-6 характеризовались уникальным составом с низким уровнем сходства друг с другом (рис. 2). Для анализа видового состава был использован индекс Шеннона-Уивера (табл. 2). Наибольшее значение выявлено в ассоциации L3-6, а наименьшее – в ассоциации L4-6. В целом, значения индекса Шеннона-Уивера у исследуемых ассоциаций находятся в диапазоне, характерном для сообществ с низким разнообразием видового состава. Полученные значения индекса Шеннона-Уивера в 1.5–2.0 раза ниже, чем данный показатель у бактериальных ассоциаций, выделенных из почв и донных отложений Китая и Тайваня, загрязненных пестицидами, в том числе линданом [40, 41].

Известно, что селекция с применением в качестве лимитирующего фактора одного химического соединения приводит к снижению биоразнообразия в бактериальных сообществах [42]. Вероятно, этим может быть обусловлено низкое видовое разнообразие в сформировавшихся при селекции на линдане бактериальных ассоциациях.

Анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК, полученных при ДГГЭ-анализе ассоциаций L2-6, L3-6, L4-6 и L6-6 показал, что доминирующее положение занимают представители *Proteobacteria* (табл. 3). Полученный результат согласуется с результатами работы [27], показавшими, что в почвах, загрязненных ГХЦГ, ДДТ и Эндосульфаном, значительная доля микробного сообщества представлена бактериями филума *Proteobacteria*. В ассоциациях L2-6, L3-6, L4-6 и L6-6 выявлены представители рода *Pseudomonas* (класс γ -*Proteobacteria*) и рода *Tardibacter* (класс α -*Proteobacteria*) (табл. 3). Штамм *Tardibacter chloracetimidivorans* JJ-A5^T, наибольшее

Таблица 2. Индексы биоразнообразия ассоциаций, полученных после селекции на линдане (6 пассаж), оцененные по ДГГЭ-профилям

Бактериальная ассоциация	Индекс Шеннона–Уивера (H)	Количество операциональных таксономических единиц (OTE)	Индекс выравненность (E _H)
L2-6	2.2645	13	0.882
L3-6	2.466	19	0.837
L4-6	1.885	11	0.786
L6-6	2.337	17	0.825

Таблица 3. Сравнение фрагментов гена 16S рРНК с гомологичными нуклеотидными последовательностями, представленными в базе EzTaxon (<https://www.ezbiocloud.net>)

Ассоциация	Номер фрагмента ДНК (ДГГЭ), номер в GenBank	Типовой штамм, номер в GenBank	Сходство, %	Количество нуклеотидов
L2-6	10, MW132971	<i>Pseudomonas monteilli</i> NBRC 103158 ^T , (BBIS01000088)	100	402
	12, MW132972	<i>Pseudomonas alloputida</i> Kh7 ^T , (LT718459)	100	420
	13, MW132973	<i>Tardibacter chloracetimidivorans</i> JJ-A5 ^T , (CP018221)	93.2	458
	14, MW132974	<i>Sphingomonas polyaromaticivorans</i> B2-7 ^T , (EF467848)	95.97	398
L3-6	1, MW132965	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i> KL28 ^T , (CP009048)	100	419
	2, MW132966	<i>Pseudomonas putida</i> NBRC14164 ^T , (AP013070)	99.77	450
	3, MW132967	<i>Pseudomonas sichuanensis</i> WCHPs060039 ^T , (QKVM01000121)	100	350
	4, MW132968	<i>Pseudomonas asplenii</i> ATCC 23835 ^T , (LT629777)	100	448
	5, MW132969	<i>Pseudomonas hutmensis</i> xwS2 ^T , (QJRG01000049)	99.78	432
	9, MW132970	<i>Tardibacter chloracetimidivorans</i> JJ-A5 ^T , (CP018221)	99.47	392
L4-6	15, MW132975	<i>Tardibacter chloracetimidivorans</i> JJ-A5 ^T , (CP018221)	99.42	349
	16, MW132986	<i>Pseudomonas laurylsulfatiphila</i> AP3-16 ^T , (KY462012)	99.56	432
	17, MW132987	<i>Pseudomonas putida</i> NBRC14164 ^T , (AP013070)	99.54	465
	18, MW132976	<i>Novosphingobium bradum</i> SIM-24 ^T , (LN890294)	92.84	464
	19, MW132977	<i>Sphingomonas astaxanthinifaciens</i> DSM22298 ^T , (JONN01000001)	99.5	408
L6-6	21, MW132980	<i>Pseudomonas laurentiana</i> GLS-010 ^T , (KY471137)	99.5	493
	24, MW132979	<i>Pseudomonas putida</i> NBRC14164 ^T , (AP013070)	99.56	457
	25, MW132980	<i>Pseudomonas asplenii</i> ATCC 23835 ^T , (LT629777)	100	449
	26, MW132981	<i>Pseudomonas hutmensis</i> xwS2 ^T , (QJRG01000049)	100	453
	27, MW132982	<i>Pseudomonas panipatensis</i> Esp-1 ^T , (jgi.1118294)	100	484
	28, MW132983	<i>Sphingoauranticus capsulatus</i> YLT33 ^T , (KT321369)	98.5	411
	29, MW132984	<i>Tardibacter chloracetimidivorans</i> JJ-A5 ^T , (CP018221)	99.51	404
	30, MW132985	<i>Sphingomonas polyaromaticivorans</i> B2-7 ^T , (EF467848)	99.10	410

сходство с которым выявлено у представителей исследуемых ассоциаций, был выделен из сельскохозяйственной почвы в Корею и использовал гербицид алахлор (хлорорганическое соединение) в качестве единственного источника углерода [43]. Как отмечалось ранее, одними из наиболее широко известных представителей бактерий-деструкто-

ров линдана были штаммы родов *Sphingobium* и *Sphingomonas* [6–9]. В составе исследуемых ассоциаций, за исключением ассоциации L3-6, также присутствовали представители рода *Sphingomonas* (класс α -*Proteobacteria*) (табл. 3). Кроме того, в составе ассоциации L4-6 найдены представители рода *Novosphingobium* (класс α -*Proteobacteria*), а в со-

Таблица 4. Сравнение нуклеотидных последовательностей фрагментов генов деструкции линдана, амплифицированных с тотальной ДНК бактериальных ассоциаций, с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank

Фрагмент гена	ДНК-матрица ассоциации (размер анализируемого фрагмента, п.н), номер в GenBank	Наиболее близкие гомологичные последовательности из GenBank, номер в GenBank	Сходство, %	Ссылка
<i>linA*</i>	L2-6 (382), MW150971	<i>linA</i> , <i>Sphingobium indicum</i> B90A, (CP013070.1)	99	[44]
	L3-6 (397), MW150972	<i>linA</i> , <i>Sphingobium japonicum</i> UT26S, AP010803.1	98	[36]
	L4-6 (389), MW150970	<i>linA</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i> B90, AY150580.3	100	[45]
<i>linA**</i>	L6-6 (215), MW150973	<i>linA</i> , uncultured organism, clone mgA6R1, EU863849.1	100	н.о.***
<i>linB</i>	L6-6 (437), MW150974	<i>linB</i> , <i>Sphingobium</i> sp. TKS, CP005087.1	100	[46]
<i>linC</i>	L2-6 (384), MW150975	<i>linC</i> , <i>Sphingobium</i> sp. S8, MN649846.1	99	н.о.
	L3-6 (448), MW150976	<i>linC</i> , <i>Sphingobium</i> sp. MI1205, CP005192.1	100	[47]
	L4-6 (304), MW150977	<i>linC</i> , <i>Sphingobium indicum</i> B90A, CP013071.1	99	[44]
	L6-6 (438), MW150978	<i>linC</i> , <i>Sphingobium</i> sp. TKS, CP005088.1	100	[46]
<i>linX</i>	L2-6 (523), MW1509783	<i>linX</i> , <i>Sphingobium</i> sp. S6, MN649857.1	100	н.о.
	L3-6 (621), MW150984	<i>linX</i> , <i>Sphingomonas</i> sp. MM-1, CP004038.1	98	[48]
	L4-6 (665), MW150985	<i>linX</i> , <i>Sphingobium</i> sp. S8, MN649848.1	99	н.о.
	L6-6 (667), MW150986	<i>linX</i> , <i>Sphingobium</i> sp. TKS, CP005088.1	100	[46]

* Праймеры, подобранные в настоящем исследовании; ** праймеры, представленные в [36], *** н.о. — не опубликовано, данные GenBank.

ставе ассоциации L6-6 — *Sphingoauranticus* (класс α -*Proteobacteria*) (табл. 4). Таким образом, ассоциации L2-6, L3-6, L4-6 и L6-6 характеризовались не только количественными различиями в своем составе, но и качественными.

Гены деструкции линдана в ассоциациях, выделенных с 6 пассажа селекции. Для исследования генетических систем разложения линдана в исследуемых бактериальных ассоциациях были использованы олигонуклеотидные праймеры, специфичные к генам *linABCX*, кодирующим ферменты “верхнего” пути деструкции ГХЦГ (рис. 1). С матриц тотальных ДНК ассоциаций L2-6, L3-6, L4-6 и L6-6 были получены ПЦР-продукты ожидаемого размера (табл. 4). В результате анализа нуклеотидных последовательностей полученных фрагментов ДНК, было установлено, что в ассоциациях присутствуют гены *lin*-оперона, характеризующиеся высоким уровнем сходства с *lin*-генами штаммов-деструкторов линдана (табл. 4). Молекулярно-генетический анализ фрагмента гена, амплифицированного с ДНК ассоциаций L2-6, L3-6, L4-6 и L6-6 с праймерами, специфичными к гену *linA*, показал высокий процент сходства с генами, кодирующими дегидрохлориназу

известных штаммов-деструкторов линдана родов *Sphingobium* и *Sphingomonas*, а также некультивируемой бактерии, выделенной из почв, загрязненных линданом (табл. 4). Секвенирование фрагментов ДНК, полученных с праймерами, специфичными к гену *linB*, позволило установить нуклеотидную последовательность только для фрагмента с ДНК ассоциации L6-6, которая имела 100%-ное сходство с аналогичным геном деструктора *Sphingobium* sp. TKS (табл. 4). Уровень сходства фрагментов генов, амплифицированных с применением праймеров, специфичных к генам *linC* и *linX*, составил 98–100% с генами дегидрогеназ штаммов рода *Sphingobium*, за исключением фрагмента гена ассоциации L3-6, для которого наиболее близким был ген *linX* штамма *Sphingomonas* sp. MM-1 (табл. 4).

Необходимо отметить, что, несмотря на то, что нуклеотидные последовательности функциональных генов определялись в тотальной ДНК сообщества, результаты секвенирования показали, что в образцах присутствуют однородные матрицы ДНК. Известно, что *lin*-гены “верхнего” пути штаммов-деструкторов линдана *Sphingobium indicum* B90A, *Sphingobium francense* Sp⁺ и *Sphingobium japonicum*

Таблица 5. Индексы биоразнообразия исследованных образцов, оцененные по ДГГЭ-профилям

Модельная почвенная система*	Индекс Шеннона–Уивера (H)	Количество операциональных таксономических единиц (OTE)	Индекс выравненность (E _H)
L4-10	2.229	17	0.786
Пмф (0)	2.686	18	0.929
Пмф (45)	2.181	14	0.826
Пмф+ L4-10 (21)	1.878	7	0.965
Пмф+ L4-10 (45)	1.921	8	0.924
Пст (0)	1.449	5	0.901
Пст (45)	0	1	0
Пст+ L4-10 (21)	2.469	13	0.962
Пст+ L4-10 (45)	2.425	14	0.919

* L4-10 – исследуемая ассоциация, Пмф (0) и Пмф (45) – автохтонная микрофлора нестерильной почвы в начале (0 сут) и конце (45 сут) эксперимента, Пст (0) и Пст (45) – ДНК стерильной почвы в начале (0 сут) и конце (45 сут) эксперимента, Пмф + L4-10 (21) и Пмф + L4-10 (45) – почвенная микрофлора, аугментированная ассоциацией L4-10 на 21 и 45 сут эксперимента, Пст + L4-10 (21) и Пст + L4-10 (45) – стерильная почва, аугментированная ассоциацией L4-10 на 21 и 45 сут эксперимента.

UT26, а также 12 штаммов семейства *Sphingomonadaceae*, изолированных в Германии, имеют высокий уровень сходства. Так, для гена *linA* данный показатель составил 100%, для гена *linB* – 97 – 98%, для гена *linC* – 99%. Две копии гена *linX* (*linX1* и *linX3*) штамма *S. indicum* B90A на 99% идентичны гену *linX* штамма *S. japonicum* UT26, тогда как ген *linX2* штамма *S. indicum* B90A совпадает с геном *linX* только на 66% [10, 49]. При этом был установлен горизонтальный перенос *lin*-генов в микробном сообществе [10, 49].

Было показано, что в исследуемых ассоциациях присутствуют представители семейства *Sphingomonadaceae* (табл. 3). Полученные результаты позволили предположить, что в исследуемых ассоциациях присутствуют гены, обуславливающие разложение линдана по “верхнему” пути, характерные для бактерий семейства *Sphingomonadaceae*.

Характеристика биодеградативного потенциала ассоциации L4-10. В результате селекции из накопительной культуры L4 на 10 пассаже была получена бактериальная ассоциация L4-10, характеризующаяся более высокими кинетическими параметрами разложения линдана, чем у остальных ассоциаций, полученных в настоящем исследовании (табл. 1). Удельная скорость деструкции составила 3.3 ± 0.1 мг/(л × сут), что превышало скорость разложения линдана известными ассоциациями, в состав которых входили бактерии родов *Streptomyces* и *Paenibacillus*, и водоросль рода *Scenedesmus* [22, 50], а также индивидуальными штаммами родов *Bacillus*, *Sphingobium* и *Streptomyces* [18, 19,

26]. За 30 сут ассоциация L4-10 осуществляла разложение линдана на 99.8% и достигла численности $1.02 \pm 0.03 \times 10^6$ КОЕ/мл. Методом ПЦР-РВ было обнаружено наличие бактериальных генов 16S рРНК в количестве $3.29 \times 10^6 (\pm 1.0 \times 10^4)$ копий гена на 1 мл культуры, что согласовывалось с данными, полученными при подсчете культивируемых бактерий в составе ассоциации. Полученные результаты свидетельствовали об отсутствии в ассоциации L4-10 некультивируемых форм бактерий. Увеличение численности на два порядка относительно начальной ($1.51 \pm 0.02 \times 10^4$ КОЕ/мл) позволило предположить, что бактериальная ассоциация не только разлагала линдан, но и использовала его в качестве ростового субстрата.

Следует отметить, что индекс сходства ДГГЭ-профилей (по генам 16S рРНК) ассоциаций L4-10 и L4-6 составил 98.2%, при этом значения индекса Шеннона незначительно различались (табл. 2, 5). Полученные результаты позволили предположить, что в процессе селекции состав основных групп бактерий не изменялся, и в составе ассоциации L4-10 присутствовали бактерии рода *Pseudomonas* (класс γ -*Proteobacteria*) и родов *Novosphingobium*, *Tardibacter* и *Sphingomonas* (класс α -*Proteobacteria*), однако изменялось их соотношение в сообществе.

В результате ВЭЖХ и ГХ-МС анализа культуральной жидкости показано, что при трансформации линдана ассоциацией L4-10 образуются побочные продукты, характерные для классиче-

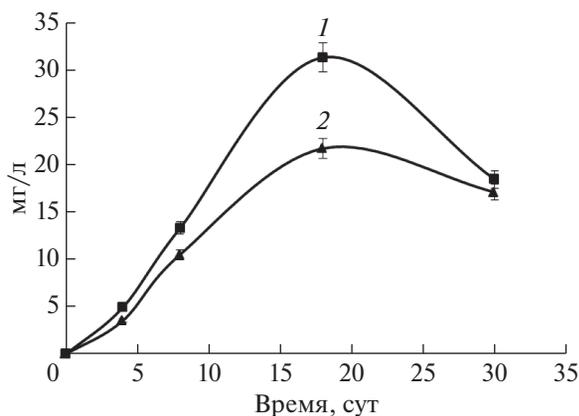


Рис. 3. Динамика образования и трансформации побочных продуктов биодеструкции линдана в процессе его разложения бактериальной ассоциацией L4-10: 1 – 1,2,4-трихлорбензол, 2 – 2,5-дихлорфенол.

ского “верхнего” пути бактериальной деструкции, 1,2,4-трихлорбензол (**1,2,4-ТХБ**) и 2,5-дихлорфенол (**2,5-ДХФ**) (рис. 1, 3). Динамика изменения концентрации данных соединений в процессе разложения линдана свидетельствовала о возможной их трансформации бактериальными штаммами, входящими в ассоциацию L4-10. В литературе описаны штаммы и бактериальные сообщества почв и донных отложений, способные разлагать 1,2,4-ТХБ или 2,5-ДХФ, но для них не описана активность дегградации линдана [51–53].

При культивировании ассоциации L4-10 в минеральной среде K1, содержащей 0.3 г/л линдана было установлено, что кинетические параметры деструкции соответствуют аналогичным показателям при культивировании данной ассоциации в минеральной среде с 0.1 г/л линдана (табл. 1). Период достижения 100% деструкции 0.3 г/л линдана увеличивался пропорционально содержанию субстрата и составил 90 сут. Таким образом, повышение концентрации линдана в среде культу-

рования не приводило к ингибированию дегградативной активности исследуемой ассоциации.

Биоаугментация ассоциации L4-10 в почву, искусственно загрязненную линданом. Одним из перспективных направлений в биоремедиации загрязненных линданом территорий является реализация метода биоаугментации аэробных бактериальных сообществ, обладающих способностью к деструкции этого токсиканта. В рамках настоящего исследования были созданы модельные почвенные системы, позволяющие оценить перспективность применения бактериальной ассоциации L4-10 в качестве агента биоремедиации.

Установлено, что внесение бактериальной ассоциации приводило к существенному повышению эффективности разложения линдана в почве (табл. 6). Наиболее эффективно процесс биодеструкции протекал в стерильной почве, содержащей ассоциацию L4-10. Уровень деструкции достигал 90% за 45 сут. Присутствие почвенной микрофлоры оказывало негативное воздействие на дегградацию линдана ассоциацией L4-10. К концу эксперимента в модельной системе биотрансформация линдана составила 78.1%. Следует отметить, что в модельных системах, не содержащих ассоциацию L4-10, разложение линдана не происходило (система со стерильной почвой), либо протекало медленно (система с нативной почвой) (табл. 6). В литературе описано, что биоаугментация различных линдан-загрязненных почв бактериальными ассоциациями обуславливает разложение линдана на 55–87%, а индивидуальным штаммом-деструктором *Sphingobium* sp. ВНС-А на 67.7–96.3% [13, 20, 23, 54, 55]. Кинетические параметры деструкции в биоаугментированных почвах в 3–5 выше, чем в почвах без внесения бактериальных агентов [11, 23]. В настоящем исследовании установлено, что аналогичные параметры различаются на 2 порядка (табл. 6). Таким образом, внесение ассоциации L4-10 существенно повышало эффективность биоремедиации почвы, загрязненной линданом.

Таблица 6. Кинетические параметры деструкции линдана (0.5 г/кг) в почве

Модельная почвенная система	Убыль линдана через 45 сут, %	Удельная скорость деструкции, мг/(кг × сут)	Зависимость концентрации линдана от времени деструкции*	R ^{2**}
Пст + L4-10	90.0 ± 0.2	10.1 ± 0.2	$y = -9.9112x + 468.05$	0.948
Пмф + L4-10	78.1 ± 0.1	8.67 ± 0.01	$y = -8.6982x + 511.36$	0.991
Пмф	0.60 ± 0.05	0.067 ± 0.002	$y = -0.0671x + 500.14$	0.977
Пст	0	0	н/о*	н/о

* y – концентрация линдана, x – время деструкции; ** коэффициент достоверности аппроксимации; *** н/о – не определяется.

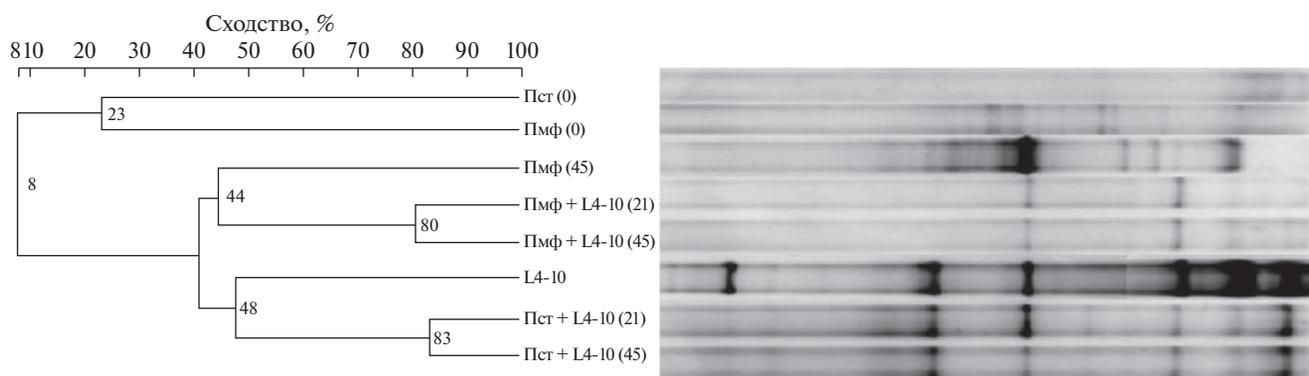


Рис. 4. Дендрограмма, построенная с применением метода UPGMA, отображающая сходство ДГГЭ-профилей модельных почвенных систем. В узлах кластеров приведены значения уровня сходства (%). Обозначения см. табл. 5.

С использованием метода ПЦР-ДГГЭ были изучены изменения в составе бактериального сообщества в модельных почвенных системах (рис. 4, табл. 5). UPGMA-анализ показал, что образцы формируют два кластера: первый – бактериальные сообщества не загрязнённой почвы, второй – бактериальные сообщества модельных систем, содержащих линдан. Уровень сходства между данными кластерами составил 8%. Внутри второго кластера также можно выделить подразделение на две группы, сходство между которыми составляло 40%: 1) бактериальные сообщества, сформировавшиеся на основе нативного почвенного микробиоценоза и в результате взаимодействия данного микробиоценоза с внесённой ассоциацией L4-10 в процессе ремедиации, 2) бактериальная ассоциация L4-10 и её адаптация в стерильной линдан-загрязнённой почве. Наиболее сильные изменения в составе ассоциации L4-10 происходили в почве, содержащей микрофлору. Можно предположить, что в данном случае, помимо присутствия в почве более доступных питательных веществ, чем линдан, существенную роль играли конкурентные взаимодействия между биоаугментированными и автохтонными микроорганизмами. Частичное вытеснение внесённых бактериальных штаммов в процессе биоремедиации загрязнённых линданом почв было отмечено при биоаугментации штаммов *Sphingobium francense* Sp+ и *Acinetobacter* sp. (pRLG) в нестерильную почву [55].

Внесение линдана отрицательно сказывалось на разнообразии микробного сообщества почвы (табл. 5). К концу эксперимента отмечалось снижение значения индекса Шеннона на 0.5 единицы. Анализ динамики микробного разнообразия в биоаугментированных модельных системах выявил разнонаправленное изменение показателей. В случае применения стерильной почвы отмечалось незначительное повышение разнообразия (на 0.2 единицы), что обусловлено более равно-

мерным распределением численности между бактериальными группами, присутствующими в ассоциации L4-10 (индекс выравненности >0.9). Увеличение микробного разнообразия было отмечено в ряде исследований по биоремедиации почв, загрязнённых линданом, ДДТ, фенантроном и ПХБ [40, 42, 56]. Напротив, в случае биоаугментированных модельных систем, содержащих почвенную микрофлору, отмечено снижение индекса Шеннона на 0.7–0.8 единицы от показателей автохтонного почвенного микробного сообщества, и на 0.3–0.4 единицы от показателей ассоциации L4-10. В работе [41] также отмечена отрицательная динамика (снижение значения индекса Шеннона на 0.1–1.7 единицы, индексов ACE и Chao1 в 1.5–2.0 раза) в разнообразии микробного сообщества линдан-содержащей почвы в процессе биоремедиации. Следует подчеркнуть, что при биоаугментации индивидуальных штаммов-деструкторов, отмечено “плавающее” значение индекса Шеннона для микробного сообщества почв, загрязнённых линданом, в течение 50 дней [55]. По-видимому, в биоаугментированных модельных почвенных системах протекают сложные процессы адаптации внесённых бактериальных ассоциаций.

Таким образом, в результате проведенных исследований, из почв, загрязнённых хлорорганическими соединениями, после селекции с применением линдана получены ассоциации аэробных бактерий, обладающие различной способностью к биодegradации гербицида. Показано, что в их составе представлены бактерии родов *Pseudomonas* (класс γ -Proteobacteria), *Novosphingobium* (класс α -Proteobacteria), *Sphingoaureticus* (класс α -Proteobacteria), *Sphingomonas* (класс α -Proteobacteria), *Tardibacter* (класс α -Proteobacteria). Установлено, что в тотальных ДНК, выделенных из ассоциаций L2-6, L3-6, L4-6 и L6-6, присутствуют гены, обладающие высоким уровнем сходства (98–100%) с генами *linABCX* “верхнего” пути аэробного разло-

жения линдана. Бактериальная ассоциация L4-10 наиболее эффективно осуществляла биодеструкцию линдана (90–100%-ное разложение за 30 сут), а также образующихся при этом побочных хлорароматических соединений. Показано, что внесение данной ассоциации в загрязненную линданом почву приводило к ее эффективной ремедиации (78.1 – 90%-ная деструкция линдана за 45 сут). Полученные результаты позволили предположить, что бактериальные ассоциации L2-6, L3-6, L4-6, L6-6 и L4-10 можно использовать при разработке биотехнологий, направленных на восстановление почв, загрязненных линданом.

В работе использовали оборудование молекулярно-генетической лаборатории кафедры ботаники и генетики растений Пермского государственного национального исследовательского университета, а также ЦКП “Исследования материалов и вещества” ПФИЦ УрО РАН.

Работа выполнена в рамках НИОКР АААА-А19-119112290009-1 “Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды”

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В настоящем исследовании не использованы в качестве объектов люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vijgen J., Abhilash P.C., Li Y.F., Lal R., Forter M., Torres J., Singh N., Yunus M., Tian C., Schäffer A., Webber R. // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2011. V. 18. P. 152–162. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0417-9>
- Vijgen J., de Borst B., Weber R., Stobiecki T., Forter M. // *Environ. Pollut.* 2019. V. 248. P. 696–705. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.029>
- Егорова Д.О., Шестакова Е.А., Первова М.Г., Плотникова Е.Г. // *Вестник Пермского университета.* 2014. № 4. С. 64–72.
- Назаров А.В., Егорова Д.О., Макаренко А.А., Демаков В.А., Плотникова Е.Г. // *Экология человека.* 2016. № 3. С. 3–8.
- Revich B., Aksel E., Ushakova T., Ivanova I., Zhuchenko N., Klyuev N., Brodsky B., Sotkov Y. // *Chemosphere.* 2001. V. 43. № 4–7. P. 951–966.
- Alvarez A., Benimeki C.S., Saez J.M., Fuentes M.S., Cuozzo S.A., Polti M.A., Amoroso M.J. // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. V. 13. № 11. P. 15086–15106.
- Camacho-Pérez B., Ríos-Leal E., Rinderknecht-Seijas N., Poggi-Varaldo M. // *J. Environm. Managem.* 2012. V. 95. P. S306–S318.
- Kumar D., Pannu R. // *Bioresour. Bioprocess.* 2018. V. 5. P. 29. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0213-9>
- Lal R., Pandey G., Sharma P., Kumari K., Malhotra S., Pandey R., Raina V., Kohler H.P., Holliger C., Jackson C., Oakeshott J.G. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010. V. 74. № 1. P. 58–80.
- Nagata Y., Endo R., Ito M., Ohtsubo Y., Tsuda M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 76. P. 741–752. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1066-x>
- Raimondo E.E., Aparicio J.D., Briceño G.E., Fuentes M.S., Benimeli C.S. // *J. Soil Sci. Plant Nutrit.* 2019. V. 19. P. 29–41. <https://doi.org/10.1007/s42729-018-0003-7>
- Sahoo B., Chaudhuri S. // *Environ. Sustainability.* 2019. V. 2. P. 97–106.
- Chuang S., Wang B., Chen K., Jia W., Qiao W., Ling W., Tang X., Jiang J. // *Sci. Total Environ.* 2020. V. 746. 140992. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140992>
- Pearce S.L., Oakeshott J.G., Pandey G. // *G3. Genes. Genomes. Genetics.* 2015. V. 5. № 6. P. 1081–1094.
- Bajaj S., Sagar S., Khare S., Singh D.K. // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2017. V. 122. P. 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.04.014>
- Benimeli C.S., Castro G.R., Chaile A.P. // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2007. V. 59. № 2. P. 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.07.014>
- Kumar D., Kumar A., Sharma J. // *Bioresour. Bioprocess.* 2016. V. 3. P. 53. <https://doi.org/10.1186/s40643-016-0130-8>
- Pannu R., Kumar D. // *Biocat. Agricult. Biotech.* 2017. V. 11. P. 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.06.009>
- Pesce S.F., Wunderling D.A. // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2004. V. 54. № 4. P. 255–260.
- Raimondo E.E., Saez J.M., Aparicio J.D., Fuentes M.S., Benimeli C.S. // *Chemosphere.* 2020. V. 238. 124512. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124512>
- Saez J.M., Aparicio J.D., Amoroso M.J., Benimeli C.S. // *Proc. Biochem.* 2015. V. 50. № 11. P. 1923–1933.
- Saez J.M., Benimeli C.S., Amoroso M.J. // *Chemosphere.* 2012. V. 89. № 8. P. 982–987.
- Saez J.M., Bigliardo A.L., Raimondo E.E., Briceño G.E., Polti M.A., Benimeli C.S. // *Ecotoxicol. Environm. Safety.* 2018. V. 156. P. 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.011>
- Saez J.M., García V.C., Benimeli C.S. // *Ecotoxic. Environm. Safety.* 2017. V. 144. P. 351–359. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.026>
- Salam J.A., Das N. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 30. P. 1301–1313. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1551-6>
- Zheng G., Selvam A., Wong J.W.C. // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2011. V. 65. № 4. P. 612–618.

27. Regar R.K., Gaur V.K., Bajaj A., Tambat S., Manickam N. // *Sci. Total Environ.* 2019. V. 681. P. 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.090>
28. Методы почвенной микробиологии и биохимии: Учеб. пособие / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1991. 304 с.
29. Raymond R.L. // *Develop. Industrial Microb.* 1961. V. 2. P. 23–32.
30. Zaitsev G.M., Tsoi T.V., Grishenkov V.G., Plotnikova E.G., Boroni A.M. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1991. V. 81. № 2. P. 171–176.
31. Bertani G. // *J. Bacteriol.* 1951. V. 62. № 3. P. 293–300.
32. Short protocols in molecular biology. 3rd ed. / Eds. F.M. Ausbel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl N.Y.: John Wiley & Sons, 1995. 450 p.
33. Tiirola M.A., Männistö M.K., Puhakka J.A., Kulomaa M.S. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. № 9. P. 173–180.
34. Fierer N., Jackson J.A., Vilgalys R., Jackson R.B. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. № 7. P. 4117–4120.
35. Jurelevicius D., Alvarez V.M., Peixoto R., Rosado A.S., Seldin L. // *Appl. Soil Ecol.* 2012. V. 55. P. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.12.008>
36. Thomas J.-C., Berger F., Jacquier M., Bernillon D., Baud-grasset F., Truffaut N., Norm P., Vogel T.M., Simonet P. // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. № 20. P. 6049–6055.
37. C  r  monie H., Boubakri H., Mavingui P., Simonet P., Vogel T.M. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2006. V. 257. № 2. P. 243–252
38. Manickam N., Mau M., Schl  mann M. // *Appl Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 69. № 2. P. 580–588.
39. Raimondo E.E., Saez J.M., Aparicio J.D., Fuentes M.S., Benimeli C.S. // *J. Environ. Menegm.* 2020. V. 276. 111309. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111309>
40. Chang S.-C., Wu M.-H., Chen T.-W. // *J. Soils Sedim.* 2021. V. 21. № 1. P. 469–486. <https://doi.org/10.1007/s11368-020-02789-8>
41. Zhao Y., Zhang Y., Wang J., Hou Q., Liu W., Wu Y., Christie P. // *J. Soils Sedim.* 2020. V. 20. № 1. P. 2155–2165. <https://doi.org/10.1007/s11368-020-02593-4>
42. Schwarz A., Adetutu E.M., Juhasz A.L., Aburto-Medina A., Ball A.S., Shahsavari E. // *Microb. Ecol.* 2018. V. 75. № 4. P. 888–902. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1094-8>
43. Lee H., Kim D., Park S. // *J. Microbiol.* 2018. V. 56. № 5. P. 324–330. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7455-2>
44. Anand S., Sangwan N., Lata P., Kaur J., Dua A., Singh A.K., Verma M., Kaur J., Khurana J.P., Khurana P., Mathur S., Lal R. // *J. Bacteriol.* 2012. V. 194. № 16. P. 4471–4472.
45. Kumari R., Subudhi S., Suar M., Dhingra G., Raina V., Dogra C., Lal S., van der Meer J.R., Holliger C., Lal R. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. № 12. P. 6021–6028.
46. Tabata M., Ohhata S., Kawasumi T., Nikawadori Y., Kishida K., Sato T., Ohtsubo Y., Tsuda M., Nagata Y. // *Genome Announc.* 2016. V. 4. № 2. E00247–16.
47. Tabata M., Ohhata S., Nikawadori Y., Sato T., Kishida K., Ohtsubo Y., Tsuda M., Nagata Y. // *Genome Announc.* 2016. V. 4. № 2. E00246–16.
48. Tabata M., Ohtsubo Y., Ohhata S., Tsuda M., Nagata Y. // *Genome Announc.* 2016. V. 1. № 3. E00247–13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00247-13>
49. Lal R., Dogra C., Malhotra S., Sharma P., Pal R. // *Trends Biotechn.* 2006. V. 24. № 3. P. 121–130.
50. Kumari M., Ghosh P., Swati, Thakur I.S. // *Biores. Technol. Reports.* 2020. V. 10. 100415 <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100415>
51. Dong W.H., Zhang P., Lin X.Y., Zhang Y., Tabour   A. // *Sci. Total Environm.* 2015. V. 505. P. 216 – 222. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.002>
52. Fang I., Qin H., Shi T., Wu X., Li Q.X., Hua R. // *J. Hazard. Mater.* 2020. V. 388. 121787. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.12178753>
53. Wang F., Grundmann S., Schmid M., D  rfler U., Roherer S., Munch J.C., Hartmann A., Jiang X., Schroll R. // *Chemosphere.* 2007. V. 67. № 5. P. 896–902.
54. Abhilash P.C., Srivastava S., Singh N. // *Chemosphere.* 2011. V. 82. № 1. P. 56–63.
55. Benimeli C.S., Fuentes M.S., Abate C.M., Amoroso M.J. // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2008. V. 61. № 3. P. 233–239.
56. Zhang X., Nesme J., Simonet P., Frosteg  rd   . // *Res. Microbiol.* 2012. V. 163. № 3. P. 200–210.
57. Tu Ch., Ma L., Guo P., Song F., Teng Y., Zhang H. // *Chemosphere.* 2017. V. 189. P. 517–524. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.091>

New Associations of Aerobic Bacteria Actively Decomposing Lindane

E. A. Nazarova^a, D. O. Egorova^{a,*}, L. N. Anan'ina^a, E. S. Korsakova^a, and E. G. Plotnikova^a

^aInstitute of ecology and genetics of microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia

*e-mail: daryao@rambler.ru

As a result of selection, associations of aerobic bacteria were obtained that are capable of decomposing the organochlorine pesticide, lindane, at a concentration of 0.1 g/L in a mineral medium for 30–180 days. It was found that the lindane-degrading associations L2-6, L3-6, L4-6, L6-6, and L4-10 were characterized by a low level of species diversity (Shannon index in the range of 1.88–2.46). The associations include represen-

tatives of the classes γ -*Proteobacteria* (genus *Pseudomonas*) and α -*Proteobacteria* (genera *Novosphingobium*, *Sphingauranticus*, *Sphingomonas*, *Tardibacter*). It was shown that the total DNA isolated from the bacterial associations of the sixth passage (L2-6, L3-6, L4-6, and L6-6) contained genes with a 98-100% level of similarity with the *linABCX* genes encoding the “upper” pathways for aerobic transformation of lindane. The bacterial association L4-10 effectively decomposed lindane in a mineral medium (100% destruction of 0.1 and 0.3 g/L of lindane for 30 and 90 days, respectively) and in model soil systems (78.1–90% destruction of 0.5 g/kg of lindane for 45 days). The use of molecular genetic and analytical methods made it possible to assume that the L4-10 association decomposed not only lindane, but also by-product chlorine-organic compounds formed during its metabolism (1,3,4-trichlorobenzene, 2,5-dichlorophenol). Thus, the bacterial associations obtained in this study are of interest for the development of bioremediation technologies for areas contaminated with lindane.

Keywords: bacterial associations, lindane, destruction, *lin* genes