

Г.О. Іутинська, Н.А. Ямборко, А.А. Піндрус

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

ДОСЛІДЖЕННЯ МУТАГЕННОЇ АКТИВНОСТІ ГЕКСАХЛОРЦИКЛОГЕКСАНУ ТА ПРОДУКТІВ ЙОГО МІКРОБНОЇ ДЕГРАДАЦІЇ

*Досліджена мутагенна активність інсектициду гексахлорциклогексану (ГХЦГ) та продуктів його деструкції видами *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia* та *Bacillus megaterium* IMB B-7287, здатними розкласти комплекс ізомерів на 46,3–86,7% від вихідного вмісту. Мікробна деструкція пестициду досліджуваними штамми веде до зменшення кількості мутацій у тест-штамів *S. typhimurium* TA 100 і *S. typhimurium* TA 98 у 1,2–1,5 рази порівняно з вихідною речовиною. В окремому випадку після трансформації ГХЦГ штамом *P. putida* 1 інтермедіати підвищували частоту мутацій типу зсуву рамки зчитування у 1,9 рази. Отримані результати необхідні для відбору найбільш перспективних штамів-деструкторів як основи біорепаратів для ремедіації забруднених ГХЦГ ґрунтів.*

Ключові слова: пестицид, мікроорганізми-деструктори, мутагенність.

Гексахлорциклогексан (ГХЦГ) – хлорорганічний пестицид, суміш оптичних α -, β -, γ -, δ -ізомерів, які відрізняються між собою за властивостями γ -ГХЦГ (комерційна назва ліндан) – діюча речовина з інсектицидними властивостями, решта ізомерів – високотоксичні супутні домішки. На сьогодні відомо, що механізм токсичної дії ізомерів ГХЦГ полягає в індукції оксидативного стресу в живій клітині завдяки запуску вільнорадикального окиснення біополімерів за участю супероксид-аніонів [12]. Токсичність ГХЦГ також пов'язана із зміною проникності фосфоліпідних мембран для іонів Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , що викликає порушення генерації трансмембранного потенціалу і, як наслідок, АТФазної і фосфокіназної активностей, що спричиняє енергетичне виснаження клітини [8].

У більшості країн заборонили або обмежили використання технічного ГХЦГ (гексахлорану) у сільському господарстві та замінили його на чистий ліндан (γ -ізомер ГХЦГ). Але внаслідок інтенсивного застосування технічного ГХЦГ у попередній період величезні залишкові його кількості були захоронені або зберігаються на складах в Україні, Росії і в інших пострадянських і європейських країнах. Організації світового рівня в галузі охорони здоров'я і захисту довкілля, такі як Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), United States Environmental Protection Agency (USEPA), а також програма International Programme on Chemical Safety (IPCS), стверджують, що ізомери ГХЦГ поступово отруюють підземні води і ґрунти і, завдяки здатності пестициду швидко накопичуватися в біологічних об'єктах, їх високій токсичності для імунної, нервової, репродуктивної систем органів створюють серйозну загрозу здоров'ю людей у глобальному масштабі [9, 14].

У відділі загальної і ґрунтової мікробіології ІМВ НАНУ селекціоновані ґрунтові мікроорганізми-деструктори, які можуть ефективно розкласти комплекс ізомерів ГХЦГ на 46,3–87,6% від вихідного вмісту до цілого ряду проміжних продуктів [4]. Даних про генетичну активність проміжних продуктів деградації ізомерів ГХЦГ недостатньо, тому ми вважали за необхідне провести дослідження їх мутагенності у порівнянні із мутагенністю вихідної речовини – гексахлорану.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження була стійка до пестицидів мікробна асоціація Мікрос, попередньо виділена нами із ґрунтів місць локального забруднення хлорорганічними пестицидами. Як ефективні деструктори були взяті *Pseudomonas putida* штами 1, 3, 4, 4а і 9 [4], *Stenotrophomonas maltophilia* 6, які входили до складу асоціації Мікрос, а також фосфат-мобілізувальний штам *Bacillus megaterium* IMB B-7287 (з колекції відділу).

Досліджували мікробну деструкцію комерційного препарату гексахлорану (20 мкг/мл) із вмістом діючої речовини – 7 % ГХЦГ [4].

Як посівний матеріал використовували культури мікроорганізмів, вирощені на рідкому модифікованому середовищі Менкіної [5] (з гексахлораном) до середини експоненційної фази росту, оптична густина клітинної суспензії була однаковою у всіх варіантах. Концентрація інокуляту становила 10 % від об'єму середовища. Культивування проводили на качалках при

28°C зі швидкістю перемішування 280 об/хв упродовж 10 діб. Після цього клітини відділяли центрифугуванням при 5600 g (30 хв). У супернатанті визначали залишкові кількості ізомерів методом високоефективної рідинної хроматографії [13].

Визначали мутагенну активність супернатантів у напівкількісному тесті Еймса із метаболічною активацією і без неї із використанням ауксотрофних штамів *S. typhimurium* TA100 і TA98 [7]. Для метаболічної активації досліджуваних речовин використовували комплекс ферментів цитохрому Р-450 з печінки щурів, який отримували за методикою [11].

Позитивними контролями були сильні мутагени прямої дії N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин (у концентрації 3 мкг/мл) і $K_2Cr_2O_7$ (у концентрації 100 мкг/мл в рідкій культурі та 100 мкг/чашку) [3], та слабкі мутагени для контролю системи метаболічної активації – бензидин (200 мкг/чашку) для штаму *S. typhimurium* TA 98 та циклофосфан (200 мкг/чашку) – для штаму *S. typhimurium* TA 100 [11]. Кореляційні залежності між активністю розкладу ізомерів ГХЦГ і мутагенною активністю супернатантів штамів-деструкторів розраховували непараметричним методом [6].

Результати та їх обговорення. Штами *S. typhimurium* TA98 і TA100 в тесті Еймса показали найкращі результати на етапі первинного скринінгу при перевірці антропогенних забруднень водою і ґрунтів, як з метаболічною активацією, так і без неї [1]. Тому, вони були використані нами як тест-об'єкти для виявлення токсичності і мутагенності проміжних продуктів мікробної деградації ГХЦГ. Насамперед, вивчали мутагенну активність технічного препарату гексахлорану (суміш ізомерів ГХЦГ) у діапазоні концентрацій від 0,5 до 100 мкг/чашку (табл. 1). Гексахлоран у концентраціях 10 і 20 мкг/чашку індукував максимальну кількість гістидинових ревертантів у *S. typhimurium* TA 100, перевищуючи спонтанний рівень у контролі відповідно на 27,9 і 24,7 %. Частота індукованих реверсій у *S. typhimurium* TA 98 за дії гексахлорану від 0,5 до 50 мкг/чашку перевищувала контроль від 4,4 % до 39,6 %, за сучасними уявленнями такий рівень мутацій відповідає активності слабких мутагенів [2]. За дії 200 мкг/мл гексахлорану спостерігали зниження частоти мутацій у двох тест-культур до рівня контролю і нижче, що пояснюється токсичною дією пестициду і зменшенням кількості виживших ревертантів. Зважаючи на таку нелінійну залежність коефіцієнти кореляції між дозою пестициду і її мутагенною дією були низькими: у тесті з *S. typhimurium* TA 98 $r = 0,13$, а з *S. typhimurium* TA 100 $r = 0,1$. Таку ж слабку кореляцію між вмістом хлороорганічних пестицидів і мутагенною активністю спостерігали інші дослідники [15].

Таблиця 1

Мутагенність гексахлорану (д.р. ГХЦГ) у тесті Еймса

Мутагенний фактор	Концентрація, мкг/чашку	Кількість колоній ревертантів на чашку	
		<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 98
Контроль (спонтанний)	відсутній	166±3	27±3
$K_2Cr_2O_7$	100	1465±23	4048±61
Нітрозогуанідин	3	5616±49	269±10
Гексахлоран	0,5	192±8	38±3
	1	162±5	32±3
	2	161±4	35±2
	5	173±5	24±2
	10	212±7	38±3
	20	207±7	28±3
	50	167±6	36±3
	100	105±7	28±2

Селекціоновані штами мікроорганізмів виявляли здатність розкласти всі ізомери ГХЦГ (табл. 2).

Супернатанти культуральних рідин після вирощування штамів-деструкторів різнилися за рівнем мутагенної активності (табл. 3). Найбільша частота мутацій типу заміни пар основ у штаму *S. typhimurium* TA 100 була у контрольному варіанті (без деструкції) – кількість ревертантів перевищувала спонтанний рівень на 56,8 %. Максимально знижувалась частота мутацій після трансформації пестициду асоціацією Мікрос і *P. putida* 1 – у 1,4–1,5 рази порівняно з мутагенністю ГХЦГ без деструкції. Супернатанти штамів *P. putida* 4 і 4а, а також *S. maltophilia* 6 спричиняли частоту мутацій на 7–26,9 % більшу від спонтанного рівня.

Залишкові кількості ізомерів ГХЦГ в супернатантах культуральних рідин штамів-деструкторів

Штам мікроорганізмів	Вміст ізомеру ГХЦГ, мг/л			
	α -ГХЦГ	β -ГХЦГ	γ -ГХЦГ, (ліндан)	δ -ГХЦГ
<i>P. putida</i> 3	0,609	0,183	0,252	0,103
<i>P. putida</i> 4	0,953	0,222	0,345	0,113
<i>P. putida</i> 4a	1,076	0,243	0,353	0,129
<i>P. putida</i> 5	0,726	0,232	0,277	0,121
<i>S. maltophilia</i> 6	0,711	0,236	0,299	0,128
<i>P. putida</i> 9	0,812	0,235	0,302	0,111
<i>P. putida</i> 9a	0,974	0,239	0,363	0,123
<i>B. megaterium</i> IMB B-7287	0,492	0,0659	0,144	0,063
Асоціація Мікрос	0,786	0,180	0,261	0,203
ГХЦГ, без мікробної деструкції	1,976	0,341	0,774	0,475

Таблиця 3

Мутагенність супернатантів після культивування мікроорганізмів-деструкторів

Варіанти	Середня кількість колоній ревертантів на чашку	
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 98
Контроль (спонтанні мутації)	78±5	32±3
K ₂ Cr ₂ O ₇ (100 мкг/чашку)	9467±79	3410±73
Нітрозогуанідин (3 мкг/чашку)	5440±56	276±12
Гексахлоран без деструкції, 20 мкг/мл	122±8	43±4
Супернатанти:		
<i>P. putida</i> 1	99±5	84±5
<i>P. putida</i> 3	104±6	35±3
<i>P. putida</i> 4	99±6	31±2
<i>P. putida</i> 4a	87±4	28±2
<i>P. putida</i> 9	108±7	42±3
<i>S. maltophilia</i> 6	90±5	38±3
<i>B. megaterium</i> IMB B-7287	103±6	34±2
Асоціація Мікрос	84±3	34±2

У штаму *S. typhimurium* TA 98 найменшу частоту мутацій типу зсуву рамки зчитування викликали продукти деструкції пестициду культурами *P. putida* 4 і *P. putida* 4a – у 1,4–1,6 рази нижчу ніж ГХЦГ без деструкції. Проте, ці штами не проявляли високої деструкційної активності стосовно ізомерів ГХЦГ. Слід звернути увагу на те, що частота мутацій у варіанті з супернатантом *P. putida* 1 перевищувала активність ГХЦГ без деструкції у 1,9 рази. Це свідчить про підвищення мутагенності інтермедіатів порівняно із вихідними речовинами. Отже, штам *P. putida* 1 не бажано використовувати як деструктор ГХЦГ.

Оскільки у супернатантах культуральних рідин присутні залишкові кількості ізомерів ГХЦГ (див. табл. 2), мутагенність супернатантів може бути зумовлена як самими ізомерами, так і продуктами їх мікробної деструкції. Для перевірки цього розраховували коефіцієнти кореляції між цими показниками (табл. 4). Наведені результати свідчать, що достовірної кореляції між вмістом ізомеру в супернатанті та його мутагенною дією немає, отже, мутагенна активність супернатантів в основному зумовлена дією інтермедіатів.

Таблиця 4

Коефіцієнти кореляції між залишковим вмістом ізомерів ГХЦГ і мутагенною активністю супернатантів культуральних рідин штамів-деструкторів

Ізомери ГХЦГ	Тест-культури мікроорганізмів	
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 98	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100
α -ГХЦГ	0,06	- 0,23
β -ГХЦГ	0,33	0,17
γ -ГХЦГ, (ліндан)	0,11	0,23
δ -ГХЦГ	0,18	0,12

Відомо, що велика кількість хімічних речовин не проявляють мутагенної активності у вихідній нативній формі, але вони перетворюються на мутагенні субстанції трансформую-

чись у печінці теплокровних. У зв'язку з відсутністю у бактерій системи мікосомального окислення, властивого ссавцям, метаболічну активацію хімічних сполук *in vitro* досліджували з використанням фракції ферментів печінки шурів (S9) у напівкількісному тесті Еймса. Фракція S9 містить цитохром P 450 і здійснює метаболічне перетворення промутагенів на мутагени. Це дає змогу прогнозувати можливість перетворення ксенобіотиків в організмі теплокровних і виявляти їх потенційну мутагенність [11]. Деякі речовини є сильними мутагенами з метаболічною активацією і без неї, тоді як інші проявляють свої мутагенні властивості тільки в одному і з випадків [10].

Метаболічна активація комплексу ізомерів ГХЦГ практично не змінила їх мутагенності порівняно із варіантом без активації (табл. 5). Мутагенність супернатантів *P. putida* 3, *P. putida* 9 і *S. maltophilia* 6. незначно змінилася після їх метаболічної активації. Проте, підвищилась активність супернатанту *B. megaterium* IMB B-7287 і асоціації Мікрос – після їх метаболічної активації частота мутацій у *S. typhimurium* TA100 перевищувала спонтанний рівень. Підвищена мутагенна активність у даному разі може бути зумовлена присутністю у складі асоціації Мікрос великої кількості культур мікроорганізмів із різними шляхами розкладу ГХЦГ, а отже й утворенням інтермедіатів із різною (часто підвищеною) мутагенною активністю. Ці дані, з погляду екологічної безпеки, дозволяють прогнозувати небезпечність ГХЦГ в процесі його мікробної деструкції у ґрунті або у водному середовищі.

Таблиця 5

Мутагенність інтермедіатів розкладу ГХЦГ у супернатантах мікроорганізмів-деструкторів у тесті Еймса з метаболічною активацією

Варіанти досліджу	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 98
	% від контролю	% від контролю
Бензидин*, 200 мкг/чашку	—	205±8
Циклофосфан**, 200 мкг/чашку	122±4	—
Гексахлоран, 20 мкг/мл без деструкції	141±5	223±9
Супернатанти:		
<i>P. putida</i> 3	122±6	148±5
<i>S. maltophilia</i> 6	117±4	180±7
<i>P. putida</i> 9	109±	143±5
<i>B. megaterium</i> IMB B-7287	151±7	183±6
Асоціація Мікрос	165±7	312±14

Примітка: «—» - не досліджували; -*бензидин використовується тільки для штаму *S. typhimurium* TA 98; -**циклофосфан використовується тільки для штаму *S. typhimurium* TA 100.

Розрахунки показали відсутність кореляційної залежності між мутагенною активністю супернатантів без метаболічної активації та після її застосування: у досліді з *S. typhimurium* TA 100 коефіцієнт кореляції становив 0,09, а з *S. typhimurium* TA 98 – 0,20.

Отже, ізомери ГХЦГ і проміжні продукти його мікробної деструкції у тесті Еймса проявляють властивості слабких мутагенів як при активації мікосомальними ферментами печінки теплокровних так і без неї.

Мікробна деструкція пестициду досліджуваними штамми веде до зменшення кількості мутацій у тест-штамів *S. typhimurium* TA 100 і *S. typhimurium* TA 98 у 1,2–1,5 рази порівняно з ГХЦГ без деструкції. Тільки у випадку із супернатантом *P. putida* 1 частота мутацій типу зузу рамки зчитування зростала у 1,9 рази. Отримані результати необхідні для відбору найбільш перспективних штамів-деструкторів як основи біопрепаратів для ремедіації забруднених ГХЦГ ґрунтів.

Г.А. Иутинская, Н.А. Ямборко, А.А. Пиндрус

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

ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕКСАХЛОРОЦИКЛОГЕКСАНА И ПРОДУКТОВ ЕГО МИКРОБНОЙ ДЕГРАДАЦИИ

Резюме

Исследована мутагенная активность гексахлорциклогексана (ГХЦГ), γ -изомер которого характеризуется инсектицидными свойствами. Селекционированы штаммы микроорганизмов родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, разлагающие ГХЦГ на 46,3–86,7 % от исходного количества. Микробная деструкция ГХЦГ исследуемыми штаммами связана с изменением генетической активности пестицида: в

большинстве случаев при действии интермедиатов наблюдается уменьшение количества мутаций у тест-штаммов *S. typhimurium* TA 100 и *S. typhimurium* TA 98 в 1,2–1,5 раза по сравнению с исходным веществом. В отдельном случае после трансформации ГХЦГ штамом *P. putida* 1 интермедиаты увеличивали частоту мутаций в 1,9 раза. Полученные результаты необходимы для отбора наиболее перспективных штаммов-деструкторов как основы биопрепаратов для ремедиации загрязненных ГХЦГ почв.

Ключевые слова: пестицид, микроорганизмы-деструкторы, мутагенность.

G.O.Iutynska, N.A.Yamborko, A.A.Pindrus

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

INVESTIGATION OF MUTAGENIC ACTIVITY OF HEXACHLORO-CYCLOHEXANE AND PRODUCTS OF ITS MICROBIAL DEGRADATION

Summary

Mutagenic activity of hexachlorocyclohexane (HCH) was investigated. As is known, γ -isomer of HCH has insecticidal properties. The strains of microorganisms of genera *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus* decomposing HCH into 46.3-86.7% from initial quantity have been selected. Microbial HCH destruction by investigated strains made changes of pesticide genetic activity: in most cases in condition of intermediate action the quantity of mutations *S. typhimurium* TA 100 and *S. typhimurium* TA 98 have decreased 1.2-1.5 times in comparison with initial substance. In a single case after HCH transformation by strain *P. putida* 1 the intermediates have increased the mutation frequency 1.9 times. The obtained results are necessary for selection of the most promising strains-decomposers as a basis of biopreparations for remediation of HCH polluted soils.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у w o r d s: pesticide, microorganisms-decomposers, mutagenesis.

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. *Бабынин Э.В., Нуретдинов И.А., Губская В.П., Барабанищikov Б.И.* Изучение мутагенной активности фуллерена и некоторых его производных на примере His⁺- реверсий у *Salmonella typhimurium* // Генетика. – Т.38. – №4. –2002. – С. 453-458.
2. *Дуган А.М., Журков В.С., Абилев С.К.* Критерии учета мутагенных эффектов в тесте Эймса // Цитология и генетика. –1990. –Вып.24.- №6. –С. 41-45.
3. *Емнова Е. Е., Меренюк Г. В., Цуркан Л. Г., Сланина В. А.* Система оценки потенциальной генетической опасности химических загрязнителей для почвенных микроорганизмов/Методические рекомендации.- Кишинев, 1991.-47с.
4. *Іутинська Г.О., Ямборко Н.А., Піндрус А.А.* Дослідження деструкції ізомерів ГХЦГ мікроорганізмами роду *Pseudomonas* //Агрокол. журн.. – спец. випуск. – червень 2008. – С. 82 – 85.
5. Методы общей бактериологии и биохимии /Под ред. Д.Г. Звягинцева М.:Изд-во МГУ, 1991.-С.277-279.
6. *Политова И.Д.* Корреляция (Задачи и методические указания к их решению)- М.: Изд-во Московской с.-х. академии им. К.А.Тимирязева.- 1971.-70 с.
7. *Фонштейн Л.М., Калинина Л.М., Полухина Г.Н. Абилев С.К., Шануро А.А.* Тест-система оценки мутагенной активности загрязнителей среды на *Salmonella* / Методические указания.- Москва, 1977.- 36 с.
8. *Buck E.D., Pessah I.N.* Mechanisms of d-Hexachlorocyclohexane Toxicity: II. Evidence for Ca²⁺-Dependent K⁺-Selective Ionophore Activity // J. Pharmacol. Experim. Therap. – 1999. – **289**, N1. – P.486–493.
9. *Dirtu A.C., Cernat R., Dragan D., Mocanu R., Van Grieken R., Neels H., Covaci A.* Organohalogenated pollutants in human serum from Iassy, Romania and their relation with age and gender // Environ Int. – **32**, N6. –2006. – P. 797–803.
10. *Li Y.F., Zhulidov, A.V., Robarts, D.R., Korotova, L.G.* Hexachlorocyclohexane Use in the Former Soviet Union //Arch. Environ. Contam. Toxicol. – 2004. – **48**. – P.10–15.
11. *Mortelmans K., Zeiger E.* The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay // Mutat. Res. – 2000. – **455**, N 20. – P.29–60.
12. *Ronco A., Valdes K., Marcus D., Llanos M.* The mechanism for lindane-induced inhibition of steroidogenesis in cultured rat Leydig cells // Toxicol. – 2001. – **159**. – P.99–106.
13. Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, 3rd Edition. – Washington, DC: U.S. EPA, 1990. EPA. Method 8120 A. – Rev. 1. – Nov. – 1990. – 456 p.
14. *Walker K., Vallero D., Lewsi R.* Factors influencing the distribution of Lindane and other hexachlorocyclohexanes in the environment. //Environ. Sci. and Techn. – 1999. – **33**, N 24. – P.4373–78.
15. *Zhao Z., Zhang L., Wu J., Fan C., Shang J.* Assessment of the potential mutagenicity of organochlorine pesticides (OCPs) in contaminated sediments from Taihu Lake, China// Mutat. Res. /Gen. Tox. and Environ. Mut. – 2010. – **696**, N 1. – P. 62–68.

Отримано 28.09.2009