

ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ ДИОКСИНАМИ

Нго Као К., Нгуен Тхи Ким Т., Нгуен Вьет К., Ле Ван Т., К. А. Сапармырадов, Э. Н. Комиссаров, М. Д. Фролов, А. Ю. Суханов, Н. В. Трахтман, Ш. З. Валидов

Реферат. Загрязнение почв диоксинами представляет серьёзную экологическую проблему, особенно во Вьетнаме, где военное применение гербицидов армией США привело к долговременной контаминации. Существующие физико-химические методы очистки малоэффективны для обширных территорий, что делает актуальным развитие биологических подходов, в частности фиторемедиации с использованием микробных деструкторов. Целью данной работы было выделение из загрязнённых почв аэродрома Бьен Хоа (Вьетнам) бактериальных штаммов, способных к деградации диоксинов, и оценка их потенциала для фиторемедиации. Методами селекции на среде с 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-п-диоксином выделено 37 морфологически различных изолятов. Таксономический анализ по гену 16S рРНК выявил доминирование грамположительных спорообразующих бактерий родов *Bacillus*, *Priestia*, *Niallia* (около 41%) и актиномицетов рода *Rhodococcus* (около 14%). BOX-PCR генотипирование подтвердило генетическое разнообразие коллекций. Отобраны непатогенные штаммы, среди которых выявлены активные колонизаторы корней томата (*Pseudomonas putida* D01L2B02, *Bacillus amyloliquefaciens* D01L2B03, *Bacillus tropicus* PIB0314/5), обладающие комплексом энзиматических активностей (протеаза, амилаза, липаза, фитаза) и способностью к фиксации азота. Штамм *B. tropicus* PIB0314/5 продемонстрировал статистически значимый фитостимулирующий эффект на томатах. Полученные результаты показывают, что выделенные аборигенные бактериальные штаммы являются перспективными кандидатами для разработки микробных препаратов и создания эффективных систем фиторемедиации почв, загрязнённых диоксинами.

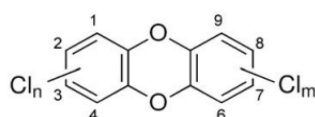
Ключевые слова: диоксины, колонизация растений, стимуляция роста растений, фитобиоремедиация, ИУК.

Для цитирования: Выделение микроорганизмов из почв, загрязнённых диоксинами / Нго Као К., Нгуен Тхи Ким Т., Нгуен Вьет К., Ле Ван Т., Сапармырадов К.А., Комиссаров Э.Н., Фролов М.Д., Суханов А.Ю., Трахтман Н.В., Валидов Ш.З. // Агробиотехнологии и цифровое земледелие. 2025. № 4(16). С. 73-84 <http://dx.doi.org/10.12737/2782-490X-2025-4-4-73-84>

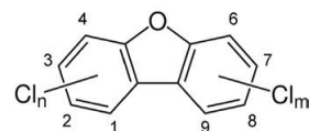
Введение. Диоксин и соединения, подобные диоксину, представляют собой группу, состоящую из сотен ароматических органических веществ, содержащих хлор, включая полихлорированные dibenzo-п-диоксины, полихлорированные dibензофураны и полихлорированные бифенилы (рис. 1). Данные

соединения характеризуются выраженной токсичностью, высокой экологической персистентностью и способностью к биологическому накоплению в живых организмах, что обуславливает их значительную опасность для здоровья человека и состояния окружающей среды [1].

А



Б



В

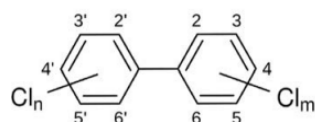


Рис. 1 – Общая структура диоксинов и соединений, подобных диоксину: (А) полихлорированные dibenzo-п-диоксины (PCDDs, сокращенно диоксины), включают 75 гомологов; (Б) полихлорированные dibензофураны (PCDFs, сокращенно фураны), включают 135 гомологов и (В) полихлорированные бифенилы с плоской структурой (копланарные PCBs или диоксиноподобные PCBs, сокращенно dl-PCBs), включают 209 гомологов

Токсическое действие диоксинов опосредовано их связыванием с арил-углеводородным рецептором (AhR), что запускает каскад патологических процессов. Ключевыми проявлениями являются индукция экспрессии генов цитохрома P450, в частности изоформ CYP1A1 и CYP1A2. Это приводит к репродуктивным дисфункциям, тератогенным эффектам и нарушениям развития. Согласно современным представлениям инициирующим звеном этих нарушений выступает именно аномальная модуляция генной экспрессии, которая детерминирует последующую цепь биохимических, клеточных и тканевых повреждений, формируя целостную картину интоксикации [2].

Загрязнение окружающей среды диоксином, в частности, загрязнение почвы постоянно растет в основном из-за сжигания топлива, металлургии, производства пестицидов и их использования в сельском хозяйстве [3]. Ежегодные глобальные выбросы диоксина составляют 17 226 кг, что эквивалентно примерно 287 кг-TEQ [4]. Многие страны мира в настоящее время являются горячими точками загрязнения диоксином, включая Германию, Южную Корею, страны Средиземноморского бассейна, ЮАР, Польшу, Китай, Вьетнам и т.д. Если в европейских странах диоксины попали в почву благодаря обильному использованию пестицидов в сельском хозяйстве, то в Социалистической Республике Вьетнам диоксин в почве присутствует из-за военных действий США в период с 1961 по 1971 год, когда американские войска использовали более 71,7 миллиона литров ядовитых веществ, содержащих диоксин, для уничтожения джунглей Вьетнама [5]. Согласно исследованию Комитета 10-80, во Вьетнаме насчитывается около 28 регионов загрязнения диоксином, включая военные и полевые аэродромы, где складировались диоксины до распыления армией США. Среди них аэродромы Бьен Хоа, Дананг, Фу Кат и А Со, которые являются районами, с максимальным загрязнением диоксинами. Спустя более четырех десятилетий после окончания войны во Вьетнаме последствия тех действий по-прежнему негативно сказываются на жителях и окружающей среде этих регионов.

Несомненно, ликвидация подобных загрязнений представляет собой одну из приоритетных задач как на территории Вьетнама, так и в других регионах мира, подверженных воздействию данных соединений. В настоящее время для снижения уровня загрязнения применяется ряд подходов, таких как экскавация и захоронение зараженного грунта, а также термическая обработка загрязненных почв [5]. Однако ни один из этих методов не может считаться достаточно эффективным, поскольку либо неприменим для обширных территорий, либо характеризуется чрезмерной энергоемкостью.

Таким образом, биологическое разрушение диоксинов, возможно, является единственным

действенным способом очистки почв от диоксина, которое может быть масштабировано до нужных объемов и эффективно в широком диапазоне концентраций этих токсических веществ. Почвенные микроорганизмы обладают обширным спектром систем деградации, что позволяет им утилизировать широкий круг соединений, многие из которых являются токсичными соединениями – ксенобиотиками. Биodeградация хлор-органических соединений не является исключением, в настоящее время известно множество бактериальных штаммов, способных использовать диоксины в качестве единственного источника углерода и энергии [6, 7, 8, 9]. Ключевым моментом в деградации диоксинов является удаление атомов хлора дегалогеназами [10], хотя это не во всех случаях является первой реакцией метаболических путей деградации этих ксенобиотиков. Хлорированные диоксины могут быть дехлорированы в анаэробной среде с помощью восстановительных дегалогеназ некоторых видов бактерий, таких как бактерии рода *Dehalococcoides* [11]. В аэробных условиях различные микроорганизмы (*Sphingomonas*, *Pseudomonas* и *Burkholderia*) могут разлагать некоторые хлорированные диоксины под действием первоначальной атаки угловых диоксигеназ, однако немногие из них могут разлагать более сложный и токсичный диоксин 2,3,7,8-ТХДД [10]. Ранее было показано, что удаление хлоридов имеет решающее значение для снижения токсичности и риска образования токсичных промежуточных продуктов в процессе разложения [12]. После удаления атомов хлора оставшаяся молекула может быть деградирована классическим набором ферментов деградации алифатических или ароматических соединений [13, 14].

В условиях лимита доступного углерода основная часть почвенной микробиоты пребывает в метаболически неактивном состоянии [15]. Растение, которое выделяет в почву до 10% фиксируемого углерода [16], создает «оазис» в котором эффективно размножаются микроорганизмы-колонизаторы [17]. Таким образом, в отличие от почвы, растение (его ризосфера) может поддерживать в активном состоянии значительно большее количество микроорганизмов. Это явление используется для фитобиоремедиации, когда растение увеличивает численность микроорганизмов-деструкторов ксенобиотиков, что позволяет микро- и макроорганизму совместно более эффективно удалять ксенобиотики из почвы.

Большинство загрязненных диоксинами территорий во Вьетнаме уже покрыто растительностью, таким образом для этих территорий применим метод фиторемедиации. Для создания технологии фиторемедиации необходимы микроорганизмы-деструкторы диоксина, одновременно полезные для растений, т.е. способные к активной колонизации корней растений и стимуляции роста для поддержки растений в условиях загрязнения.

Целью данной работы было выделение бактериальных штаммов-деструкторов из почв, загрязненных диоксинами, идентификация и анализ колонизационных и фитостимулирующих свойств изолятов, для их дальнейшего использования в качестве микробных агентов фиторемедиации почв, загрязненных этим классом ксенобиотиков.

Условия, материалы и методы. Отбор проб для выделения микроорганизмов. Пробы почвы для выделения микроорганизмов отбирали в районе аэродромов Бен Хоа и Фу Кат (Вьетнам). Для экспериментов был отобран 1 кг почвы вместе с корнями растений. Концентрация диоксинов в почве составляла в среднем 35 865 ppt.

Среды и бактериальные штаммы, использованные в работе.

Для приготовления почвенной суспензии и ее разведения использовали фосфатно-солевой буфер (ФСБ) pH 7.0 (Компания «Хеликон», Россия). Для посева разведений почвенной суспензии использовали минеральную среду BM (K_2HPO_4 – 5.8 г/л, KH_2PO_4 – 3 г/л, $(NH_4)_2SO_4$ – 1 г/л) без добавления глицерина. В качестве источника углерода и энергии использовали 2,3,7,8 тетрахлордibenзо-п-диоксин (ТХДД, 50мкг/мл стоковый раствор в толуоле), (ООО «Экрос», Россия), который добавляли в количестве 100 мкл на 20 мл среды. Для дальнейшего поддержания выделенных микроорганизмов использовали агаризованную среду LB (Difco, США).

Выделение бактериальных штаммов. Для выделения микроорганизмов 1 грамм исследуемой почвы ресуспендировали в 10 мл стерильного ФСБ. Разведения почвенной суспензии (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} и 10^{-5}), также приготовленные в ФСБ, объемом 100 мкл высевали на поверхность чашек BM с добавлением диоксида. Чашки Петри с посеянными разведениями почвенной суспензии инкубировали при 28°C. После 72 – 120 часов инкубации отдельные колонии, отличающиеся по морфологии, пересеивали на ту же среду и инкубировали еще 120 часов, до появления видимого роста культур микроорганизмов. Далее изоляты выращивали на среде LB для получения биомассы и последующего выделения ДНК.

Выделение препаратов тотальной ДНК и таксономическая идентификация выделенных бактериальных штаммов

Биомассу штаммов собирали с поверхности чашек Петри со средой LB, ДНК выделяли с помощью набора HiPure Bacterial DNA Kit, (Magen, KHP), в полном соответствии с рекомендациями производителя.

Видовая идентификация изолятов была проведена на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рРНК. Фрагмент гена 16S рРНК был амплифицирован с помощью праймеров 27fm (5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3')

и 1522R (5'- AAGGAGGTGATCCAGCCGCA -3') [18]. Амплифицированный фрагмент очищали из 1% агарозного геля с использованием набора Cleanup Mini (Евроген, Москва, Россия). Нуклеотидные последовательности полученных фрагментов ДНК определяли методом секвенирования по Сэнгеру (Евроген, Москва, Россия). Последовательности объединяли с помощью программы Clon Manager 9.0 (США) и анализировали в системе. Штамм идентифицировали по наибольшему совпадению последовательностей со штаммами известных видов в коллекции GenBank с помощью системы BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Сравнительный анализ выделенных штаммов с помощью Vox-PCR

Полученные образцы ДНК использовали в качестве матричной ДНК для проведения ВОХ-ПЦР с праймером BOXA1R (5' - CTACGGCAAGGCGACGCTGACG - 3'). В реакционную смесь объемом 25 мкл добавляли 100 нг ДНК. Программа проведения ВОХ-ПЦР: 95°C – 3 мин, (95°C – 20 с, 53°C – 1 мин, 65°C – 8 мин, 34 цикла), 65°C – 18 мин, после выполнения ПЦР программы образцы хранили при 12 °C. Далее проводили электрофорез в 2% агарозном геле с использованием маркера молекулярных масс 1kb (ЗАО Евроген, Россия). Изображения получали с помощью гель-документирующей системы BioRad GelDoc Go (США). Далее проводили обработку и анализ полученных графических данных с помощью программы GelJ [19].

Определение ферментативных активностей полученных изолятов.

Определение амилазной активности. Для определения амилазной активности использовали модифицированную среду следующего состава: пептон – 0.5 г/л; KCl – 0.1 г/л; $MgSO_4 \times 7 H_2O$ – 0.5 г/л; $(NH_4)_2SO_4$ – 0.1 г/л; крахмал – 20.0 г/л; агар микробиологический – 20.0 г/л. Культуры высевали на поверхность крахмального агара и инкубировали при 30°C в течение 48 часов. Индикацию проводили окрашиванием 3% раствором йода и выдерживали 20 минут. Раствор йода сливали, чашки промывали дистиллированной водой для удаления остатков йодного раствора. О наличии амилазной активности судили по появлению неокрашенной зоны вокруг колоний.

Определение липазной активности. Для определения липазной активности использовали питательную среду с добавлением Tween 80 (Sigma, США), г/л: пептон – 10.0; NaCl – 5.0; $CaCl_2 \times 2 H_2O$ – 1.0; агар – 20.0; Tween 80 – 10.0. Культуры высевали на чашки с селективной средой и инкубировали при 30°C в течение 48 часов. О наличии липазной активности судили по появлению мелких белых кристаллов вокруг колоний микроорганизмов.

Определение протеолитической активности
Протеолитическую активность выявляли на базовой среде (BM) следующего состава, г/л: K_2HPO_4 – 5.8 г/л; KH_2PO_4 – 3.0 г/л; $(NH_4)_2SO_4$ – 1.0 г/л; агар – 20.0 г/л с добавлением глицерина 10 г/л и 1% сухого обезжиренного молока, стерилизованного кипячением. Культуры высевали на поверхность питательного агара и инкубировали при 30°C в течение 48 часов. Учет протеазной активности проводили визуально по образованию зон просветления (зон гидролиза) вокруг бактериальных колоний, что является индикатором деградации казеина под действием внеклеточных протеаз.

Определение фитазной активности
Фитазную активность определяли на среде PSM следующего состава: глюкоза – 2.0; фитат натрия – 5.0; NH_4NO_3 – 5.0; $MgSO_4 \times 7 H_2O$ – 0.5; KCl – 0.5; $FeSO_4 \times 7 H_2O$ – 0.01; $Mn(SO_4) \times 4 H_2O$ – 1.0; $CaCl_2$ – 2.0; агар микробиологический – 20.0. Культуры высевали на селективную среду и выращивали при 30°C в течение 48 часов. Учет фитазной активности проводили по образованию прозрачных зон гидролиза вокруг колоний, возникающих вследствие деградации нерастворимой фитиновой кислоты и образования хелатного комплекса кальция с фосфатом.

Определение целлюлолитической активности

Для выявления целлюлолитической активности использовали среду BM с добавлением 1% карбоксиметилцеллюлозы натриевой соли (КМЦ), г/л: триптон – 1.0; K_2HPO_4 – 5.8; KH_2PO_4 – 3.0; КМЦ – 10.0; агар микробиологический – 18.0. О наличии целлюлолитической (эндоглюконазной) активности судили по визуализации зон просветления.

Определение способности штаммов к фиксации атмосферного азота.

Способность микроорганизмов усваивать атмосферный азот проверяли на среде Эшби (HiMedia, Индия) не содержащей источника азота, поэтому на данной среде колонии образуют только бактерии, способные фиксировать азот из атмосферы.

Статистическая обработка данных.

Статистический анализ проводился с использованием статистического пакета программ (OriginLab Pro SR1 b9.5.1.195 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA). Эффект стимуляции роста между группами анализировался с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA test) ($p < 0.05$)

Определение колонизационных свойств непатогенных изолятов.

Колонизационные свойства изолятов определяли на томатах сорта Белый налив в гнотобиотической системе [20]. Для этого стерильные проростки с корешком размером не более 5 мм инокулировали суспензией штамма в ФСБ ($OP_{600}=0,1$). Штаммы, которые достигали численности более 10^5 клеток на см кончика корня считали активными колонизаторами.

Выявление фитостимулирующих свойств выделенных штаммов.

Для определения фитостимулирующих свойств использовали семена томата сорта Белый налив и яровой пшеницы сорта Ситара. Семена растений замачивали в суспензии клеток штаммов в стерильном ФСБ с плотностью $\sim 10^8$ клеток/мл ($OP_{600}=0,1$) в течении 30 минут при комнатной температуре. Далее семена высаживали в песок, смоченный PNS и инкубировали при комнатной температуре в течение 7 суток. Затем растения вынимали из песка и измеряли надземную часть растений. Эксперименты проводили в трех повторях. Для каждой обработки использовали не менее 10 семян. Результаты измерений обрабатывали с помощью программы MS Excel 2011 (Microsoft, США).

Детекция синтеза индолил-3-уксусной кислоты у выделенных штаммов.

Индолил-3-уксусная кислоту (ИУК), продуцируемую изолятами, определяли спектрометрически, в соответствии с методом Гордона и Вебера [21]. Для этого выделенные штаммы культивировали на среде LB с добавлением 1% L-триптофана в качестве предшественника при температуре 29°C при постоянном перемешивании (180 об/мин) в течение 3 дней. После инкубирования, бактериальную культуру центрифугировали при 9600 g в течение 5 мин при 4°C и фильтровали (с использованием мембранного фильтра 0,45 мкм). Далее, 1 мл полученной суспензии смешивали с реактивом Сальковского, состоящего из 0,5 М хлорида железа ($FeCl_3$) и 35%-ной хлорной кислоты ($HClO_4$) в соотношении 1:2. Смесь инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин, затем измеряли оптическую плотность при 530 нм. Концентрацию ИУК оценивали по стандартной кривой ИУК (0–1000 мкг/мл). Один мл стерильного среды LB, содержащей 1% L-триптофана, смешанной в соотношении 1:2 с реактивом Сальковского, использовали в качестве раствора сравнения. Результаты измерений обрабатывали с помощью программы MS Excel 2011 (Microsoft, США).

Результаты и обсуждения. Выделение и таксономическая идентификация выделенных бактериальных штаммов. В ходе работы методами накопительных культур с дальнейшим высевом на селективную среду, содержащую 2,3,7,8 тетрахлордibenзо-пдиоксин было отобрано 37 морфологически различающихся типа бактериальных колоний. Поскольку среда культивирования не содержала других источников углерода и энергии, за исключением ТХДД, мы предположили, что данные штаммы могут деградировать и ассимилировать продукты деструкции диоксина. Из клеток полученных изолятов была выделена тотальная ДНК и проведены работы по их таксономической идентификации.

Таксономическая идентификация изолятов,

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ

проведенная методом сравнительного анализа последовательностей гена 16S рРНК, показала значительное таксономическое разнообразие исследуемой микрофлоры, представленной

бактериями из филумов *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Bacteroidetes*, что характерно для сложной микробной экосистемы (табл.1).

Таблица 1 – Результаты идентификации выделенных изолятов на основе сравнения последовательности гена 16S рРНК

Изолят	Место отбора проб	Бактерии наиболее близкие к изолятам по последовательности гена 16S рРНК в базе данных NCBI	% идентичности с последовательностью в базе NCBI
NE09 B02-1	Аэродром Бьен Хоа	<i>Staphylococcus equorum</i>	99,38%
NE09 B02-2	Аэродром Бьен Хоа	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	100%
NE09 L1 B01	Аэродром Бьен Хоа	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	99,58%
R06 B01	Аэродром Бьен Хоа	<i>Bacillus sp. (in: firmicutes)</i>	99,93%
R05 B01	Аэродром Бьен Хоа	<i>Bacillus cereus</i>	99,73%
NE09 L2 B04	Аэродром Бьен Хоа	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	99,65%
NE09 L2 B03	Аэродром Бьен Хоа	<i>Chryseobacterium sp.</i>	99,93%
ZT B01	Аэродром Бьен Хоа	<i>Staphylococcus sp.</i>	99,93%
D04 B10 14/5	Аэродром Бьен Хоа	<i>Bacillus cereus</i>	99,93%
D03 L2 B06	Аэродром Бьен Хоа	<i>Rhodococcus phenolicus</i>	99,57%
D01 L2 B05	Аэродром Бьен Хоа	<i>Bacillus subtilis</i>	99,86%
D03 L2 B03	Аэродром Бьен Хоа	<i>Rhodococcus phenolicus</i>	99,71%
NE09 B03	Аэродром Бьен Хоа	<i>Providencia rettgeri</i>	99,51%
D05-1	Аэродром Фу Кат	<i>Providencia entomophila</i>	99,03%
D05-2	Аэродром Фу Кат	<i>Vitreoscilla sp.</i>	99,45%
R01 B01	Аэродром Бьен Хоа	<i>Bacillus sp. (in: firmicutes)</i>	99,45%
R06 Y02	Аэродром Фу Кат	<i>Bacillus cereus</i>	99,86%
PI B04	Аэродром Бьен Хоа	<i>Priestia megaterium</i>	99,72%
PI B03 14/5	Аэродром Бьен Хоа	<i>Bacillus tropicus</i>	99,86%
D03 L2 B01 14/5	Аэродром Бьен Хоа	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	99,58%
D02 B06	Аэродром Бьен Хоа	<i>Vitreoscilla sp.</i>	99,72%
D01 B01	Аэродром Бьен Хоа	<i>Niallia taxi</i>	99,72%
D05 B12	Аэродром Бьен Хоа	<i>Bacillus sp. (in: firmicutes)</i>	99,86%
D01 B03 14/5	Аэродром Бьен Хоа	<i>Bacillus velezensis</i>	100,00%
NE09 B05	Аэродром Бьен Хоа	<i>Lysinibacillus macroides</i>	98,95%
NE09 B06	Аэродром Бьен Хоа	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	99,93%
DB02	Аэродром Бьен Хоа	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	99,93%
DB01	Аэродром Бьен Хоа	<i>Sinomonas atrocyanea</i>	99,57%
R05 B01	Аэродром Бьен Хоа	<i>Bacillus cereus</i>	99,86%
R06 B03	Аэродром Бьен Хоа	<i>Bacillus velezensis</i>	99,79%
D01 L2 B02	Аэродром Бьен Хоа	<i>Pseudomonas putida</i>	98,95%
D01 L2 B01	Аэродром Бьен Хоа	<i>Pseudomonas sp.</i>	99,30%
D0 L2 B04	Аэродром Бьен Хоа	<i>Rhodococcus phenolicus</i>	99,79%
D01 L2 B04	Аэродром Бьен Хоа	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,79%
D01 L2 B03	Аэродром Бьен Хоа	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,86%
D03 L2 B02	Аэродром Бьен Хоа	<i>Rhodococcus ruber</i>	100,00%
D03 L2 B05	Аэродром Бьен Хоа	<i>Rhodococcus ruber</i>	99,86%

Ключевой особенностью данного микробиологического сообщества является абсолютное доминирование грамположительных, спорообразующих бактерий, в первую очередь представителей рода *Bacillus* и близкородственных родов (*Priestia*, *Niallia*), которые составляют около 41% всех изолятов, что часто указывает на их селекцию в стрессовых условиях. Параллельно выявлена важная группа актиномицеты рода *Rhodococcus* ($\approx 14\%$ изолятов), широко известных как активные деструкторы устойчивых ароматических соединений. Особый интерес представляют обнаруженные специализированные деструкторы, такие как *Rhodococcus phenolicus*, *R. ruber*,

а также различные виды *Pseudomonas* и *Stenotrophomonas*, обладающие высоким катаболическим потенциалом по отношению к ксенобиотикам [22, 23, 24]. Высокие проценты идентичности ($>99\%$ для большинства изолятов) подтверждают надежность определения. Таким образом, микрофлора представляет собой смешанное сообщество, где устойчивые сапрофитные формы соседствуют с ценными специализированными деструкторами и индикаторами контаминации ароматическими соединениями. Это хорошо согласуется с данными полученными другими авторами, которые показали, что эффективная минерализация группы поллютантов осуществляется не

единственным штаммом, но часто требует скоординированной работы микробных консорциумов, где различные виды дополняют катаболические пути друг друга [25].

Сравнительный анализ штаммов с помощью метода Вох-PCR. Учитывая высокую степень филогенетического сходства, выявленную для ряда штаммов при анализе последовательностей гена 16S рРНК, для верификации их геномной идентичности был применен метод ВОХ-PCR (генотипирование на основе повторяющихся последовательностей). Данный подход, также известный как ПЦР-фингерпринтинг, основан на амплификации с использованием праймеров, комплементарных консервативным повторяющимся элементам, мозаично распределенным в бактериальных геномах. В результате формируется уникальный профиль дискретных ампликонов, представляющий собой характерный геномный паттерн («Finger print»). Наиболее воспроизводимым вариантом данного метода считается гер-PCR, который подразделяется на REP-, ERIC- и BOX-ПЦР в зависимости от типа таргетируемых повторяющихся элементов (соответственно, REP-последовательностей, ERIC-элементов и BOX-мотивов). Хотя эволюционное происхождение и функциональная

роль некоторых из этих элементов окончательно не установлены, их видо-специфичный полиморфизм в количестве и геномной локализации позволяет эффективно использовать гер-PCR для дифференциации бактерий на внутривидовом и межвидовом уровнях.

Анализ геномных профилей позволил выявить пять четких кластеров штаммов с идентичными или практически идентичными спектрами ампликонов, что с высокой вероятностью указывает на их принадлежность к одному и тому же виду, а в пределах кластера – на клональное родство или принадлежность к одному штамму. Группа 1: штаммы 4 (R06 B01) и 11 (D01 L2 B05), Группа 2: штаммы 10 (D03 L2 B0) и 12 (D03 L2 B03), Группа 3: штаммы 9 (D04 B10 14/5) и 16 (R06 Y02), Группа 4: штаммы 5 (R05 B01), 24 (D01 B03 14/5) и 30 (R06 B03) и Группа 5: штаммы 36 (D03 L2 B02) и 37 (D03 L2 B05). Остальные проанализированные штаммы (например, *Staphylococcus equorum* NE09 B02, *Pseudomonas monteilii* NE09 L2 B04, *Priestia megaterium* PI B04 et al.) продемонстрировали уникальные BOX-PCR профили, что подчеркивает их генетическую индивидуальность и подтверждает таксономическую уникальность в рамках данной коллекции (рис. 2).

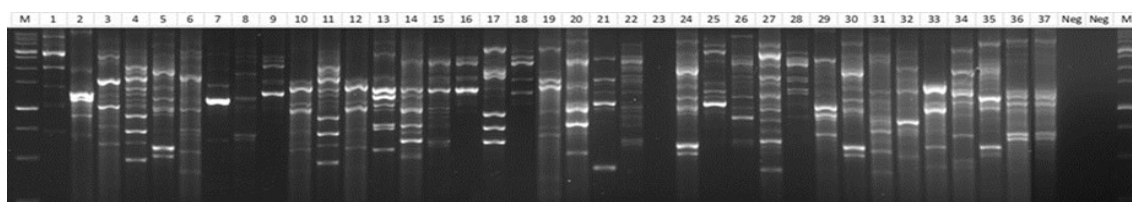


Рис. 2 - Электрофореграмма (0.8% TAE агарозный гель) ампликонов, полученных в ходе Вох-PCR. М. маркер длин ДНК «DNA ladder 1 kb» (Евроген, Москва, Россия); 1. NE09 B02-1; 2. NE09 B02-2; 3. NE09 L1 B01; 4. R06 B01; 5. R05 B01; 6. NE09 L2 B04; 7. NE09 L2 B03; 8. ZT B01; 9. D04 B10 14/5; 10. D03 L2 B06; 11. D01 L2 B05; 12. D03 L2 B03; 13. NE09 B03; 14. D05-1; 15. D05-2; 16. R01 B01; 17. R06 Y02; 18. PI B04; 19. PI B03 14/5; 20. D03 L2 B01 14/5; 21. D02 B06; 22. D01 B01; 23. D05 B12; 24. D01 B03 14/5; 25. NE09 B05; 26. NE09 B06; 27. DB02; 28. DB01; 29. R05 B01; 30. R06 B03; 31. D01 L2 B02; 32. D01 L2 B01; 33. D0 L2 B04; 34. D01 L2 B04; 35. D01 L2 B03; 36. D03 L2 B02; 37. D03 L2 B05. Neg. отрицательный контроль

Таким образом, применение метода ВОХ-PCR в сочетании с сравнительным анализом профилей позволило надежно дифференцировать исследуемые штаммы по видовой принадлежности и выделить предполагаемые внутривидовые группы.

Биотехническое применение в открытых системах предполагает использование непатогенных микроорганизмов. На основе данных идентификации штаммы *B. subtilis* R06B01, *P. plecoglossica* NE09L2B04, *R. phenolicus* D03L2B06, *P. megaterium* PIB04, *B. tropicus* PIB0314/5, *L. macroides* NE09B05, *P. tai-chungensis* NE09B06, *B. amyloliquefaciens* R06B03, *P. putida* D01L2B02, *B. amyloliquefaciens* D01L2B03, *R. ruber* D03L2B02 были выбраны как непатогенные бактериальные штаммы перспективные для создания системы фитобиоремедиации почв, загрязненных диоксином.

Определение энзиматических свойств непатогенных изолятов. Энзиматические свойства штаммов важны как для фенотипирования штаммов, так и для их дальнейшего использования в биотехнологии. Семь из одиннадцати штаммов секретируют протеазы. Амилолитической активностью обладали штаммы *B. amyloliquefaciens* R06B03 и *B. amyloliquefaciens* D01L2B03, что характерно для данного вида бацилл [26, 27]. Липазная активность была обнаружена у штамма *P. plecoglossica* NE09L2B04 и *R. ruber* D03L2B02. Фиксация атмосферного азота, является признаком, ценным для взаимодействия с растением [28]. Способность фиксировать азот показана для четырех штаммов (табл. 2). Целлюлолитической способностью обладали только бациллярные штаммы (табл. 2), что характерно для микроорганизмов С-цикла [29]. Так же, как и фиксация азота, фитазная активность

улучшает минеральное питание растений [30, 31]. *P. plecoglossicida* NE09L2B04 был единственным штаммом, обладающим фитазной активностью. На основании полученных данных энзиматической

активности наибольшую ценность как симбионты растений могут представлять штаммы *P. plecoglossicida* NE09L2B04, *P. putida* D01L2B02 и *R. ruber* D03L2B02.

Таблица 2 - Энзиматические активности выделенных штаммов

Штамм	Амилаза	Липаза	Протеаза	Фиксация азота	Целлюлаза	Фитаза
<i>B. subtilis</i> R06B01	—	—	+	—	+	—
<i>P. plecoglossicida</i> NE09L2B04	—	+	+	+	—	+
<i>R. phenolicus</i> D03L2B06	—	—	—	—	—	—
<i>P. megaterium</i> PIB04	—	—	—	—	—	—
<i>B. tropicus</i> PIB0314/5	—	—	+	—	+	—
<i>L. macroides</i> NE09B05	—	—	—	+	—	—
<i>P. taichungensis</i> NE09B06	—	—	+	—	+	—
<i>B. amyloliquefaciens</i> R06B03	+	—	+	—	—	—
<i>P. putida</i> D01L2B02	—	—	—	+	—	—
<i>B. amyloliquefaciens</i> D01L2B03	+	—	+	—	+	—
<i>R. ruber</i> D03L2B02	—	+	+	+	—	—

Фитостимулирующие свойства изолятов. Ризосферные микроорганизмы часто выделяют фитогормоны или аналогичные им вещества для стимуляции роста растения-хозяина [32]. Бактериальные агенты, способные стимулировать рост растения также могут быть полезны для повышения эффективности общего процесса фиторемедиации, поскольку в условиях загрязнения часто наблюдается угнетение роста растений [33]. При инокуляции семян томата в случае штаммов *Bacillus tropicus* PIB0314/5,

P. putida D01L2B02, *L. macrolides* NE09B05 и *R. ruber* D03L2B02 показали стимуляцию роста растений, однако только для штамма *B. tropicus* PIB0314/5 эта разница была статистически достоверной (рис. 3А). Инокуляция также приводила к небольшому увеличению роста пшеницы у штаммов *B. tropicus* PIB0314/5, *B. amyloliquefaciens* R06B03 и *L. macroides* NE09B05, однако разница была статистически не достоверной по сравнению с контрольным вариантом (рис. 3Б).

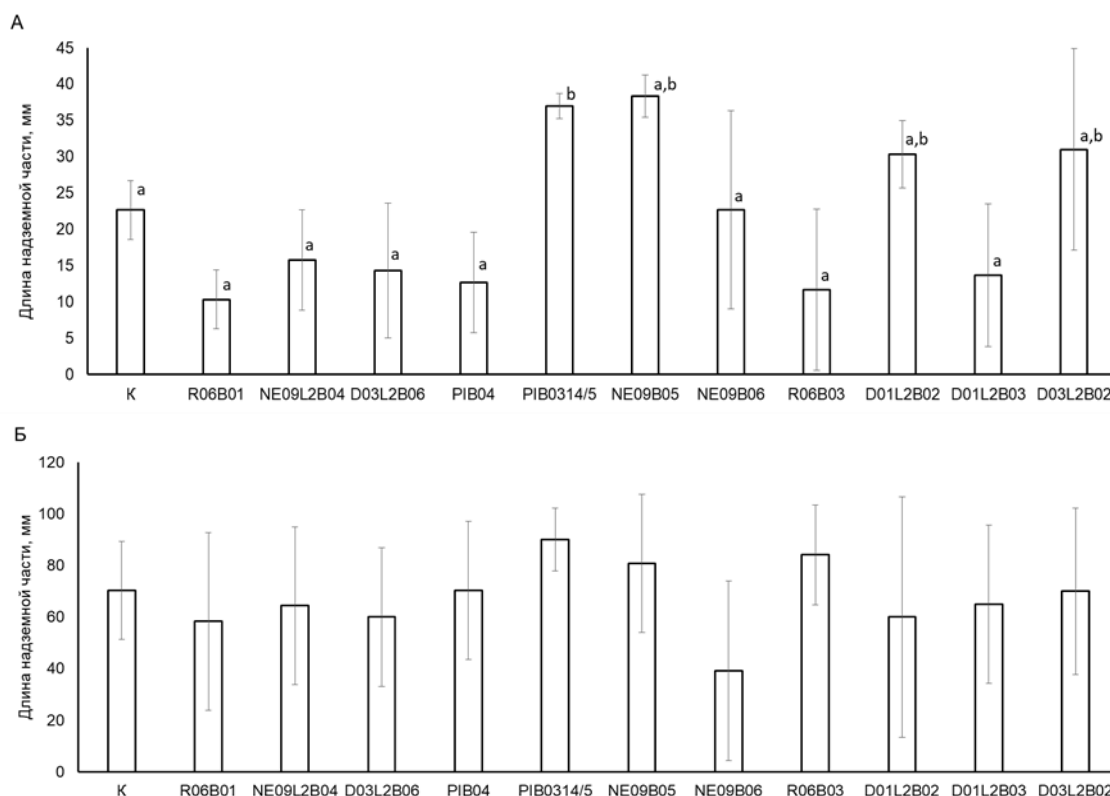


Рис. 3 - Определение фитостимулирующих свойств выделенными бактериальными деструкторами диоксинов штаммов на (А) томате и (Б) пшенице. Одинаковыми строчными латинскими буквами на панели А обозначены статистически не различающиеся варианты

Синтез индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) у выделенных изолятов.

Причиной фитостимулирующих свойств штаммов ризобактерий может быть синтез фитогормонов [34]. Мы анализировали синтез ИУК у выделенных непатогенных штаммов для объяснения фитостимулирующих свойств

штаммов. Результаты анализа показали, что ни один из изолятов не производит ИУК в значительных количествах (табл. 3). Таким образом, выявленный эффект фитостимуляции у штамма *B. tropicus* PIB0314/5, должен быть обусловлен какими-либо другими факторами.

Таблица 3 - Синтез индолил-3-уксусной кислоты

Штамм	Количество синтезируемого ИУК, мкг/мл
<i>B. subtilis</i> R06B01	0,72 ±0,4
<i>P. plecoglossicida</i> NE09L2B04	3,01±2,8
<i>R. phenolicus</i> D03L2B06	3,99±3,2
<i>P. megaterium</i> PI B04	2,48±0,9
<i>B. tropicus</i> PIB0314/5	3,31±2,8
<i>L. macroides</i> NE09B05	1,12±0,2
<i>P. taichungensis</i> NE09B06	0,85±0,7
<i>B. amyloliquefaciens</i> R06B03	0,91±0,2
<i>P. putida</i> D01L2B02	6,19±0,2
<i>B. amyloliquefaciens</i> D01L2B03	10,44±4,1
<i>R. ruber</i> D03L2B02	8,69±1,4

Определение колонизационных свойств непатогенных изолятов

Колонизационные свойства очень важны для штаммов, осуществляющих фитобиоремедиацию, поскольку эффективная колонизация корня растения с одной стороны является средством распространения агента ремедиации в почве, а с другой может частично обеспечивать защиту растения от токсичных веществ. Кроме того, активные колонизаторы могут защищать растение, ослабленное в условиях диоксинового загрязнения, от фитопатогенов, благодаря механизму конкурентной колонизации [35]. Штаммы, принадлежащие к непатогенным видам, выделенные из почвы аэродрома Бен Хоа тестировали на проростках томатов. Наилучшие

результаты показали четыре штамма: *B. amyloliquefaciens* D01L2B03 и *B. tropicus* PIB0314/5, которые колонизовали корни томатов с плотностью $6,25 \times 10^5$ и $2,01 \times 10^5$ клеток/см кончика корня, соответственно, *P. putida* D01L2B02, колонизационные способности которого были ещё выше и составляли $2,80 \times 10^6$ клеток/см и *P. plecoglossicida* NE09L2B04 $3,29 \times 10^5$ клеток/см (рис. 4). Выдающиеся колонизационные способности псевдомонад хорошо известны и описаны на примере штаммов *P. fluorescens* WCS365 [36], *P. fluorescens* PCL1751 [37] или *P. putida* PCL1760 [35]. Остальные тестированные штаммы колонизировали корень томатов с эффективностью 103 – 104 клеток на 1 см кончика корня.

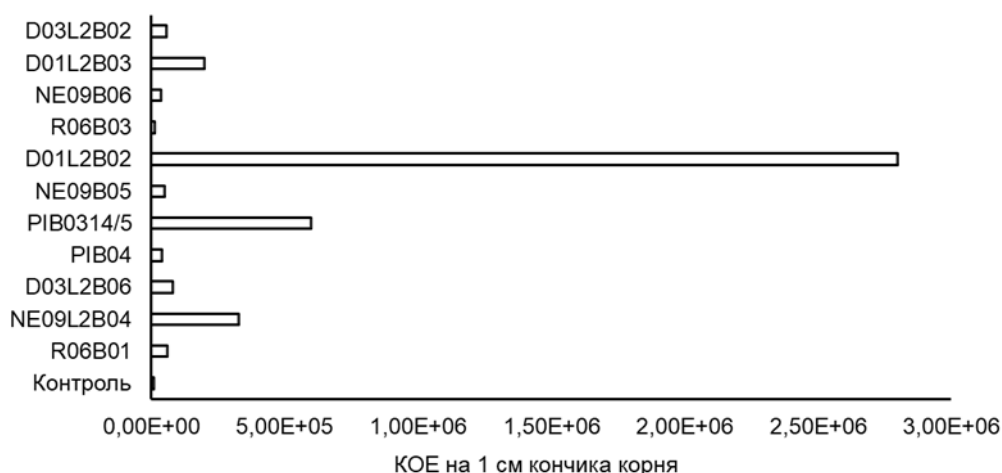


Рис. 4 - Колонизационная активность штаммов деструкторов диоксида. В качестве растения был использован томат сорта Белый налив

Помимо жгутиков, с помощью которых происходит перемещение этих бактерий в жидких средах, они также обладают многочисленными системами хемотаксиса, что позволяет им следовать по градиенту

питательных веществ в корневых экссудатах, эффективно колонизируя корень растения [38]. Представители рода *Bacillus* являются группой микроорганизмов, также широко представленной в ризосфере [39]. Кроме того,

анализ видового состава в почве аэродрома Бьен Хоа показал доминирование бациллярных штаммов (47%), что указывает на их важную роль в микробиоме загрязненных почв. По результатам данного эксперимента штаммы *B. amyloliquefaciens* D01L2B03, *Bacillus tropicus* PIB0314/5 и *P. putida* D01L2B02 можно рассматривать как бактериальные компоненты будущей фиторемедиационной системы.

Выводы. Из почв, загрязнённых диоксинами в районе аэродрома Бьен Хоа (Вьетнам), было выделено 37 бактериальных изолятов, демонстрирующих таксономическое разнообразие с преобладанием грамположительных спорообразующих бактерий родов *Bacillus*, *Priestia*, *Niallia*, а также актиноциетов рода *Rhodococcus*. Несомненно, дальнейшее изучение данных штаммов предполагает, как их полногеномное секвенирование, так и подробное биохимическое описание процесса дегградации диоксинов данными штаммами.

Среди выделенных штаммов идентифицированы непатогенные изоляты с комбинацией полезных свойств: способностью к активной колонизации корней растений (*P. putida*

D01L2B02, *B. amyloliquefaciens* D01L2B03, *B. tropicus* PIB0314/5 и *P. plecoglossicida* NE09L2B04), наличием ферментативной активности (*P. plecoglossicida* NE09L2B04, *B. amyloliquefaciens* D01L2B03 и *B. tropicus* PIB0314/5), а также способностью к фиксации атмосферного азота (*P. putida* D01L2B02 и *P. plecoglossicida* NE09L2B04).

Штамм *Bacillus tropicus* PIB0314/5 проявил статистически значимую фитостимулирующую активность на томатах, не связанную с синтезом индолил-3-уксусной кислоты. Поскольку данный микроорганизм не производит фитазу и не фиксирует атмосферный азот, мы предполагаем, что фитостимулирующий эффект данного штамма может быть обусловлен синтезом других стимулирующих веществ, отличных от ИУК.

Полученные штаммы-деструкторы, обладающие колонизационной и фитостимулирующей активностью, такие как *B. tropicus* PIB0314/5, *P. putida* D01L2B02, *B. amyloliquefaciens* D01L2B03 и *P. plecoglossicida* NE09L2B04 являются перспективными кандидатами для разработки микробных препаратов и создания эффективных систем фиторемедиации почв, загрязнённых диоксинами.

Литература

1. Kulkarni P. S., Crespo J. G., Afonso C. A. M. Dioxins sources and current remediation technologies — A review // *Environment International*. 2008. Т. 34, № 1. С. 139–153. doi: 10.1016/j.envint.2007.07.009
2. Mandal P. K. Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology // *J Comp Physiol B*. 2005. Т. 175, № 4. С. 221–230. doi: 10.1007/s00360-005-0483-3
3. Kirkok S. K. et al. A review of persistent organic pollutants: dioxins, furans, and their associated nitrogenated analogues // *SN Appl. Sci.* 2020. Т. 2, № 10. С. 1729. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03551-y>
4. Dopico M., Gómez A. Review of the current state and main sources of dioxins around the world // *Journal of the Air & Waste Management Association*. 2015. Т. 65, № 9. С. 1033–1049. doi: 10.1080/10962247.2015.1058869
5. Haemers J. et al. Bien Hoa Dioxin/Agent Orange thermal desorption treatment - Full report. Unpublished, 2022. doi: 10.13140/RG.2.2.13849.70248
6. Wittich R. M. et al. Metabolism of dibenzo-p-dioxin by *Sphingomonas* sp. strain RW1 // *Appl Environ Microbiol*. 1992. Т. 58, № 3. С. 1005–1010. doi: 10.1128/aem.58.3.1005-1010.1992
7. Saibu S., Adebuseye S. A., Oyetibo G. O. Aerobic bacterial transformation and biodegradation of dioxins: a review // *Bioresour. Bioprocess*. 2020. Т. 7, № 1. С. 7. doi: 10.1186/s40643-020-0294-0
8. Field J. A., Sierra-Alvarez R. Microbial degradation of chlorinated dioxins // *Chemosphere*. 2008. Т. 71, № 6. С. 1005–1018. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.10.039
9. Persistent, Bioaccumulative, and Toxic Chemicals I: Fate and Exposure / под ред. Lipnick R. L. et al. Washington, DC: American Chemical Society, 2000. Т. 772.
10. Nguyen B.-A. T. et al. Biodegradation of dioxins by *Burkholderia cenocepacia* strain 869T2: Role of 2-haloacid dehalogenase // *Journal of Hazardous Materials*. 2021. Т. 401. С. 123347. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123347
11. Pöritz M. et al. *Dehalococcoides mccartyi* Strain DCMB5 Respires a Broad Spectrum of Chlorinated Aromatic Compounds // *Appl Environ Microbiol* / под ред. Löffler F. E. 2015. Т. 81, № 2. С. 587–596. doi: 10.1128/AEM.02597-14
12. Gribble G. W. The diversity of naturally produced organohalogens // *Chemosphere*. 2003. Т. 52, № 2. С. 289–297. doi: 10.1016/S0045-6535(03)00207-8
13. Habe H. et al. Degradation of Chlorinated Dibenzofurans and Dibenzo-*p*-Dioxins by Two Types of Bacteria Having Angular Dioxygenases with Different Features // *Appl Environ Microbiol*. 2001. Т. 67, № 8. С. 3610–3617. doi: 10.1128/AEM.67.8.3610-3617.2001
14. Hong H.-B. et al. Biodegradation of Dibenzo-p-dioxin, Dibenzofuran, and Chlorodibenzo-p-dioxins by *Pseudomonas veronii* PH-03 // *Biodegradation*. 2004. Т. 15, № 5. С. 303–313. doi: 10.1023/b:biod.0000042185.04905.0d
15. Blagodatskaya E., Kuzyakov Y. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches // *Soil Biology and Biochemistry*. 2013. Т. 67. С. 192–211. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.024>
16. Bais H. P. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006. Т. 57, № 1. С. 233–266. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159
17. Berendsen R. L., Pieterse C. M. J., Bakker P. A. H. M. The rhizosphere microbiome and plant health // *Trends in Plant Science*. 2012. Т. 17, № 8. С. 478–486. doi: 10.1016/j.tplants.2012.04.001
18. Weisburg W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // *J Bacteriol*. 1991. Т. 173,

- № 2. С. 697–703. doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991
19. Heras J. et al. GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images // BMC Bioinformatics. 2015. Т. 16, № 1. С. 270. doi: 10.1186/s12859-015-0703-0
20. Simons M. Gnotobiotic System for Studying Rhizosphere Colonization by Plant Growth-Promoting *Pseudomonas* Bacteria Gnotobiotic System for Studying Rhizosphere // MPMI. 1996. Т. 9, № 7. С. 600. doi: 10.1094/mpmi-9-0600
21. Gordon S. A., Weber R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid // Plant Physiol. 1951. Т. 26, № 1. С. 192–195. doi: 10.1104/pp.26.1.192
22. Harms H. et al. Transformation of Dibenzo- *p* -Dioxin by *Pseudomonas* sp. Strain HH69 // Appl Environ Microbiol. 1990. Т. 56, № 4. С. 1157–1159. doi: 10.1128/aem.56.4.1157-1159.1990
23. Nakazawa T. Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world // Environmental Microbiology. 2002. Т. 4, № 12. С. 782–786. doi: 10.1046/j.1462-2920.2002.00310.x
24. Larkin M. J., Kulakov L. A., Allen C. C. Biodegradation and Rhodococcus – masters of catabolic versatility // Current Opinion in Biotechnology. 2005. Т. 16, № 3. С. 282–290. doi: 10.1016/j.copbio.2005.04.007
25. Chikere C. B., Okpokwasili G. C., Chikere B. O. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil // 3 Biotech. 2011. Т. 1, № 3. С. 117–138. doi: 10.1007/s13205-011-0014-8
26. Yuan S. et al. Improving thermostability of *Bacillus amyloliquefaciens* alpha-amylase by multipoint mutations // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2023. Т. 653. С. 69–75. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.02.064
27. Du R. et al. Purification and characterization of novel thermostable and Ca-independent α -amylase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BH072 // International Journal of Biological Macromolecules. 2018. Т. 115. С. 1151–1156. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.004
28. Smercina D. N. et al. Erratum for Smercina et al., “To Fix or Not To Fix: Controls on Free-Living Nitrogen Fixation in the Rhizosphere” // Appl Environ Microbiol. 2019. Т. 85, № 22. С. e02103-19. doi: 10.1128/AEM.02103-19
29. Johansen J. E., Binnerup S. J. Contribution of Cytophaga-like Bacteria to the Potential of Turnover of Carbon, Nitrogen, and Phosphorus by Bacteria in the Rhizosphere of Barley (*Hordeum vulgare* L.) // Microbial Ecology. 2002. Т. 43, № 3. С. 298–306. doi: 10.1007/s00248-002-2006-z
30. Kumar V. et al. Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (*Brassica juncea*) // World J Microbiol Biotechnol. 2013. Т. 29, № 8. С. 1361–1369. doi: 10.1007/s11274-013-1299-z
31. Gomez-Ramirez L. F., Uribe-Velez D. Phosphorus Solubilizing and Mineralizing *Bacillus* spp. Contribute to Rice Growth Promotion Using Soil Amended with Rice Straw // Curr Microbiol. 2021. Т. 78, № 3. С. 932–943. doi: 10.1007/s00284-021-02354-7
32. Lugtenberg B., Kamilova F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria // Annu. Rev. Microbiol. 2009. Т. 63, № 1. С. 541–556. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918
33. Xun F. et al. Effect of plant growth-promoting bacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation on oats in saline-alkali soil contaminated by petroleum to enhance phytoremediation // Environ Sci Pollut Res. 2015. Т. 22, № 1. С. 598–608. doi: 10.1007/s11356-014-3396-4
34. Ahmed A., Hasnain S. Auxins as One of the Factors of Plant Growth Improvement by Plant Growth Promoting Rhizobacteria // Pol J Microbiol. 2014. Т. 63, № 3. С. 261–266. PMID: 25546935
35. Validov S. et al. Selection of bacteria able to control *Fusarium oxysporum* f. sp. radicle-lycopersici in stone-wool substrate // J Appl Microbiol. 2007. Т. 102, № 2. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03083.x
36. De Weert S. et al. Flagella-Driven Chemotaxis Towards Exudate Components Is an Important Trait for Tomato Root Colonization by *Pseudomonas fluorescens* // MPMI. 2002. Т. 15, № 11. С. 1173–1180. doi: 10.1094/MPMI.2002.15.11.1173
37. Kamilova F. et al. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria // Environmental Microbiology. 2005. Т. 7, № 11. С. 1809–1817. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00889.x
38. Feng H. et al. Chemotaxis of Beneficial Rhizobacteria to Root Exudates: The First Step towards Root–Microbe Rhizosphere Interactions // IJMS. 2021. Т. 22, № 13. С. 6655. doi: 10.3390/ijms22136655
39. Hashem A., Tabassum B., Fathi Abd_Allah E. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress // Saudi Journal of Biological Sciences. 2019. Т. 26, № 6. С. 1291–1297. doi: 10.1016/j.sjbs.2019.05.004

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов. Работа была выполнена в рамках Государственного задания ФИЦ КазНИЦ РАН и проекта Эколан Э-2.2: Разработка биопрепаратов для фитобиоремедиации почвы загрязненных диоксинами программы научно-исследовательских и прикладных работ на период 2025-2029 гг., утвержденной Межправительственным Координационным Комитетом по Российско-Вьетнамскому Тропическому центру.

Сведения об авторах:

Нго Као Кьонг - доктор биологических наук, заведующий лабораторией Микробиологии, email: ngosaocuong2011@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9286-0571>
Нгуен Тхи Ким Тхань - научный сотрудник, email: kimthanhnt2301@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9840-7527>
Нгуен Вьет Кьонг - научный сотрудник, email: cuongnguyen300902@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0007-3309-234>
Ле Ван Тханг - научный сотрудник, email: lethang3128@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8726-0862>
Совместный Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр, Ханой, Вьетнам.
Сапармырадов Керемли Ашурмухамедович - кандидат биологических наук, научный сотрудник, e-mail: saparmuradov.k@knc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5640-8756>
Комиссаров Эрнест Наилевич - младший научный сотрудник, e-mail: e.komissarov@knc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5640-8756>

orcid.org/0000-0002-9112-6973

Фролов Михаил Дмитриевич - лаборант-исследователь, e-mail: m.frolov@knc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6751-436X>

Суханов Артемий Юрьевич - младший научный сотрудник, e-mail: ay.sukhanov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8697-9616>

Трахтман Наталия Викторовна - кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: n.trahman@knc.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3291-8329>

Валидов Шамиль Завдатович - PhD в биологии, заведующий лабораторией МГММ, e-mail: sh.validov@knc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9441-409X>

Федеральный Исследовательский Центр «Казанский Научный Центр Российской Академии Наук», Казань, Россия.

ISOLATION OF MICROORGANISMS FROM SOIL CONTAMINATED WITH DIOXINS

Ngo Cao C., Nguen Thi Kim T., Nguen Viet K., Le Van T., K. A. Saparmyradov,
E. N. Komissarov, M. D. Frolov, A. Yu. Sukhanov, N. V. Trakhtman, Sh. Z. Validov

Abstract. Soil pollution with dioxins is a serious environmental problem, especially in Vietnam, where the military use of herbicides by the US Army has led to long-term contamination. Existing physicochemical remediation methods are ineffective for large areas, which makes it urgent to develop biological approaches, particularly phytoremediation using microbial destructors. The aim of this study was to isolate bacterial strains capable of dioxin degradation from contaminated soils at Bien Hoa Airfield (Vietnam) and evaluate their potential for phytoremediation. Thirty-seven morphologically distinct isolates were isolated using selection methods on a medium containing 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Taxonomic analysis using the 16S rRNA gene revealed a predominance of gram-positive spore-forming bacteria of the genera *Bacillus*, *Priestia*, and *Niallia* (approximately 41%) and actinomycetes of the genus *Rhodococcus* (approximately 14%). Box-PCR genotyping confirmed the genetic diversity of the collection. Non-pathogenic strains were selected, including active tomato root colonizers (*Pseudomonas putida* D01L2B02, *Bacillus amyloliquefaciens* D01L2B03, *Bacillus tropicus* PIB0314/5), possessing a complex of enzymatic activities (protease, amylase, lipase, phytase) and the ability to fix nitrogen. *B. tropicus* PIB0314/5 demonstrated a statistically significant phytostimulating effect on tomatoes. The results indicate that the isolated native bacterial strains are promising candidates for the development of microbial preparations and the creation of effective phytoremediation systems for soils contaminated with dioxins.

Key words: dioxins, plant colonization, plant growth stimulation, phytobioremediation, IAA.

For citation: Ngo Cao C., Nguen Thi Kim T., Nguen Viet K., Le Van T., Saparmyradov K.A., Komissarov E.N., Frolov M.D., Sukhanov A.Yu., Trakhtman N.V., Validov Sh.Z. Isolation of microorganisms from soil contaminated with dioxins. Agrobiotechnologies and digital farming. 2025; 4(16). 73-84 p. <http://dx.doi.org/10.12737/2782-490X-2025-4-4-73-84>

References

1. Kulkarni PS, Crespo JG, Afonso CAM. Dioxins sources and current remediation technologies: a review. *Environment International*. 2008; Vol.34. 1. 139-153 p. doi: 10.1016/j.envint.2007.07.009
2. Mandal PK. Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *J Comp Physiol B*. 2005; Vol.175. 4. 221-230 p. doi: 10.1007/s00360-005-0483-3
3. Kirkok SK. A review of persistent organic pollutants: dioxins, furans, and their associated nitrogenated analogues. *SN Appl. Sci*. 2020; Vol.2. 10. 1729 p. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03551-y>
4. Dopico M, Gomez A. Review of the current state and main sources of dioxins around the world. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 2015; Vol.65. 9. 1033-1049 p. doi: 10.1080/10962247.2015.1058869
5. Haemers J. Bien Hoa Dioxin/Agent Orange thermal desorption treatment - Full report. Unpublished. 2022; doi: 10.13140/RG.2.2.13849.70248
6. Wittich RM. Metabolism of dibenzo-p-dioxin by *Sphingomonas sp.* strain RW1. *Appl Environ Microbiol*. 1992; Vol.58. 3. 1005-1010 p. doi: 10.1128/aem.58.3.1005-1010.1992
7. Saibu S, Adebosoye SA, Oyetibo GO. Aerobic bacterial transformation and biodegradation of dioxins: a review. *Bioresour. Bioprocess*. 2020; Vol.7. 1. 7 p. doi: 10.1186/s40643-020-0294-0
8. Field JA, Sierra-Alvarez R. Microbial degradation of chlorinated dioxins. *Chemosphere*. 2008; Vol.71. 6. 1005-1018 p. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.10.039
9. Lipnick RL. Persistent, bioaccumulative, and toxic chemicals I: Fate and Exposure. Washington, DC: American Chemical Society. 2000; Vol. 772.
10. Nguyen BAT. Biodegradation of dioxins by *Burkholderia cenocepacia* strain 869T2: Role of 2-haloacid dehalogenase. *Journal of Hazardous Materials*. 2021; Vol.401. 123347 p. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123347
11. Poritz J, Loffler FE. *Dehalococcoides mccartyi* Strain DCMB5 respire a broad spectrum of chlorinated aromatic compounds. *Appl Environ Microbiol*. 2015; Vol.81. 2. 587-596 p. doi: 10.1128/AEM.02597-14
12. Gribble GW. The diversity of naturally produced organohalogenes. *Chemosphere*. 2003; Vol.52. 2. 289-297 p. doi: 10.1016/S0045-6535(03)00207-8
13. Habe H. Degradation of chlorinated Dibenzofurans and Dibenzo-*p*-dioxins by two types of bacteria having angular dioxygenases with different features. *Appl Environ Microbiol*. 2001; Vol.67. 8. 3610-3617 p. doi: 10.1128/AEM.67.8.3610-3617.2001
14. Hong HB. Biodegradation of Dibenzo-p-dioxin, Dibenzofuran and Chlorodibenzo-p-dioxins by *Pseudomonas veronii* PH-03. *Biodegradation*. 2004; Vol.15. 5. 303-313 p. doi: 10.1023/b:biod.0000042185.04905.0d
15. Blagodatskaya E, Kuzyakov Y. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biology and Biochemistry*. 2013; Vol.67. 192-211 p. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.024>
16. Bais HP. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol*. 2006; Vol.57. 1. 233-266 p. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159
17. Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*. 2012; Vol.17. 8. 478-486 p. doi: 10.1016/j.tplants.2012.04.001
18. Weisburg WG. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*. 1991; Vol.173. 2. 697-703 p. doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991
19. Heras J. GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics*. 2015; Vol.16. 1. 270 p. doi: 10.1186/s12859-015-0703-0

20. Simons M. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria gnotobiotic system for studying rhizosphere. MPMI. 1996; Vol.9. 7. 600 p. doi: 10.1094/mpmi-9-0600
21. Gordon SA, Weber RP. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant Physiol. 1951; Vol.26. 1. 192-195 p. doi: 10.1104/pp.26.1.192
22. Harms H. Transformation of Dibenzo- *p* -Dioxin by *Pseudomonas* sp. Strain HH69. Appl Environ Microbiol. 1990; Vol.56. 4. 1157-1159 p. doi: 10.1128/aem.56.4.1157-1159.1990
23. Nakazawa T. Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world. Environmental Microbiology. 2002; Vol.4. 12. 782-786 p. doi: 10.1046/j.1462-2920.2002.00310.x
24. Larkin MJ, Kulakov LA, Allen CC. Biodegradation and Rhodococcus – masters of catabolic versatility. Current Opinion in Biotechnology. 2005; Vol.16. 3. 282-290 p. doi: 10.1016/j.copbio.2005.04.007
25. Chikere CB, Okpokwasili GC, Chikere BO. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. 3 Biotech. 2011; Vol.1. 3. 117-138 p. doi: 10.1007/s13205-011-0014-8
26. Yuan S. Improving thermostability of *Bacillus amyloliquefaciens* alpha-amylase by multipoint mutations. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2023; Vol.653. 69-75 p. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.02.064
27. Du R. Purification and characterization of novel thermostable and Ca-independent α -amylase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BH072. International Journal of Biological Macromolecules. 2018; Vol.115. 1151-1156 p. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.004
28. Smercina DN. Erratum for Smercina. To fix or not to fix: controls on free-living nitrogen fixation in the rhizosphere. Appl Environ Microbiol. 2019; Vol.85. 22. e02103-19 p. doi: 10.1128/AEM.02103-19
29. Johansen JE, Binnerup SJ. Contribution of Cytophaga-like bacteria to the potential of turnover of carbon, nitrogen, and phosphorus by bacteria in the rhizosphere of Barley (*Hordeum vulgare* L.). Microbial Ecology. 2002; Vol.43. 3. 298-306 p. doi: 10.1007/s00248-002-2006-z
30. Kumar V. Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (*Brassica juncea*). World J Microbiol Biotechnol. 2013. Vol.29. 8. 1361-1369 p. doi: 10.1007/s11274-013-1299-z
31. Gomez-Ramirez LF, Uribe-Velez D. Phosphorus solubilizing and mineralizing *Bacillus* spp. contribute to rice growth promotion using soil amended with rice straw. Curr Microbiol. 2021; Vol.78. 3. 932-943 p. doi: 10.1007/s00284-021-02354-7
32. Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annu. Rev. Microbiol. 2009; Vol.63. 1. 541-556 p. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918
33. Xun F. Effect of plant growth-promoting bacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation on oats in saline-alkali soil contaminated by petroleum to enhance phytoremediation. Environ Sci Pollut Res. 2015; Vol.22. 1. 598-608 p. doi: 10.1007/s11356-014-3396-4
34. Ahmed A, Hasnain S. Auxins as one of the factors of plant growth improvement by plant growth promoting rhizobacteria. Pol J Microbiol. 2014; Vol.63. 3. 261-266 p. PMID: 25546935
35. Validov S. Selection of bacteria able to control *Fusarium oxysporum* f. sp. radicis-lycopersici in stonewool substrate. J Appl Microbiol. 2007; Vol.102. 2. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03083.x
36. De Weert S. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. MPMI. 2002; Vol.15. 11. 1173-1180 p. doi: 10.1094/MPMI.2002.15.11.1173
37. Kamilova F. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. Environmental Microbiology. 2005; Vol.7. 11. 1809-1817 p. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00889.x
38. Feng H. Chemotaxis of beneficial rhizobacteria to root exudates: the first step towards root-microbe rhizosphere interactions. IJMS. 2021; Vol.22. 13. 6655 p. doi: 10.3390/ijms22136655
39. Hashem A, Tabassum B, Fathi Abd Allah E. *Bacillus subtilis*: a plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. Saudi Journal of Biological Sciences. 2019; Vol.26. 6. 1291-1297 p. doi: 10.1016/j.sjbs.2019.05.004

Conflict of interests

The authors declare no conflicts of interest. This work was carried out within the framework of the State Assignment of Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences and Ecolan E-2.2 project: Development of biopreparations for phytobioremediation of soil polluted with dioxins, part of the research and applied work program for the period from 2025 to 2029, approved by Intergovernmental Coordination Committee for the Russian-Vietnamese Tropical Center.

Authors:

Ngo Cao Cuong - Doctor of Biological Sciences, Head of Microbiology Laboratory, email: ngocaocuong2011@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9286-0571>
 Nguen Thi Kim Thanh - researcher, email: kimthanht2301@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9840-7527>
 Nguen Viet Cuong - researcher, email: cuongnguyen300902@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0007-3309-234>
 Le Van Thang - researcher, email: lethang3128@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8726-0862>
 Joint Russian-Vietnamese Tropical Research and Technology Center, Hanoi, Vietnam.
 Saparmuradov Keremli Ashurmukhamedovich – Ph.D. of Biological Sciences, researcher, e-mail: saparmuradov.k@knc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5640-8756>
 Komissarov Ernest Nailevich - junior researcher, e-mail: e.komissarov@knc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9112-6973>
 Frolov Mikhail Dmitrievich - Laboratory Research Assistant, e-mail: m.frolov@knc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6751-436X>
 Sukhanov Artemiy Yurevich - junior researcher, e-mail: ay.sukhanov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8697-9616>
 Trakhtman Nataliya Viktorovna – Ph.D. of Biological Sciences, senior researcher, e-mail: n.trakhtman@knc.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3291-8329>
 Validov Shamil Zavdatovich – Ph.D. of Biological Sciences, Head of Molecular Genetic and Microbiological Methods Laboratory, e-mail: sh.validov@knc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9441-409X>
 Federal Research Center “Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”, Kazan, Russia.