

ШИША О.М.^{1✉}, ЯМБОРКО Н.А.², ІУТИНСЬКА Г.О.², ЄМЕЦЬ А.І.¹

¹ ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, ORCID: 0000-0001-7575-987X, 0000-0001-6887-0705

² Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 154, ORCID: 0000-0001-7002-9536

✉ elenashysha@ukr.net

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ХЛОРОРГАНІЧНИХ ПЕСТИЦИДІВ ТА ПРОДУКТІВ ЇХ РОЗКЛАДУ НА ТОМАТИ В УМОВАХ *IN VITRO*

Мета. Зважаючи на перспективність використання методу детоксикації хлорорганічних забруднень у навколишньому середовищі за допомогою мікроорганізмів, дослідити вплив продуктів мікробної деструкції хлорорганічного пестициду гексахлорциклогексану (ГХЦГ) на морфогенетичні та морфологічні реакції *Solanum lycopersicum* Mill. в умовах *in vitro*.

Методи. Для тестування ГХЦГ та продуктів його мікробної деструкції, отриманих за допомогою штамів *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia*, сполуки додавали до середовища для культивування томатів. Для регенерації рослин використовували як експланти сегменти гіпокотилів проростків томату та середовища МС, доповнені 1 мг/л зеатину та 1 мг/л ІОК. **Результати.** Виявлено, що продукти деструкції ГХЦГ дещо стимулюють процес регенерації пагонів, однак гальмують їх коренеутворення, а ГХЦГ пригнічує формування пагонів та викликає морфологічні зміни у отриманих *in vitro* рослин томатів.

Висновки. Встановлено негативний вплив хлорорганічних пестицидів, зокрема ГХЦГ на клітини і тканини рослин томату в умовах *in vitro*. Виявлено, що продукти деструкції ГХЦГ не чинять негативного впливу на морфогенетичні процеси ізольованих клітин і тканин та не викликають морфологічних змін в отриманих *in vitro* рослин томату.

Ключові слова: хлорорганічні пестициди, мікробна деструкція, *Solanum lycopersicum* Mill., морфогенетичні та морфологічні реакції, *in vitro*.

Однією з найсерйозніших проблем сучасності є глобальне хімічне забруднення біосфери, що породжує загрозу техногенних катастроф і може завдати значної шкоди навколишньому середовищу та здоров'ю людей. Особливу небезпеку становлять хімічні сполуки, що потрапа-

ють у довкілля в результаті діяльності великих промислових комплексів, які є потужними джерелами практично всіх видів забруднень. Одними з найбільш небезпечних речовин штучного походження є хлорорганічні пестициди [1; 2], які протягом останніх десятиліть широко застосовувалися у сільському господарстві для хімічного захисту рослин від хвороб і шкідників. У природних умовах вони погано піддаються розпаду через свою високу стійкість до хімічного та фотолітичного розкладу. Поширення цих стійких органічних сполук несе шкоду навіть там, де вони не застосовувалися раніше [3]. Серед таких сполук найбільш відомий пестицид гексахлорциклогексан (ГХЦГ), який широко використовували для боротьби із шкідниками зернових культур, садів та лісових насаджень, а також із паразитами тварин. Ізомери ГХЦГ мають виражені кумулятивні властивості, затримуючись в органах та тканинах організму. На сьогодні застосування хлорорганічних пестицидів в Україні та більшості європейських країн заборонено Стокгольмською конвенцією щодо стійких органічних забруднень (<http://www.pops.int/documents/pops/default.htm>).

Відомо, що перспективним та економічно вигідним шляхом детоксикації хлорорганічних забруднень у навколишньому середовищі вважається використання мікроорганізмів як деструкторів ксенобіотиків для перетворення і утилізації залишків пестицидів до екологічно-безпечних сполук без великих економічних витрат [4; 5]. Встановлено здатність розкладати хлорорганічні пестициди окремими представниками родів *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Nitrococcus*, *Clostridium*, а також грибами *Trichoderma*, *Penicillium* [4; 6].

Зважаючи на це, актуальним є питання впливу залишкових кількостей хлорорганічних токсикантів (у тому числі і ГХЦГ), а також продуктів їх розкладу на живі об'єкти, в першу

© ШИША О.М., ЯМБОРКО Н.А., ІУТИНСЬКА Г.О., ЄМЕЦЬ А.І.

чергу на ґрунтову мікробіоту і рослини. Тому нами було проведено дослідження токсичного впливу хлорорганічного пестициду ГХЦГ, а також продуктів його деструкції певними мікроорганізмами на сільськогосподарські рослини, зокрема, на морфофізіологічні параметри та морфогенетичний потенціал ізольованих клітин і тканин томату (*Solanum lycopersicum*) в умовах *in vitro*.

Матеріали і методи

У роботі досліджували вплив ГХЦГ та продуктів його мікробної деструкції, отриманих як результат життєдіяльності ізольованих штамів культур *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas sputide* 3, *Stenotrophomonas maltophilia* 6 [7], на морфогенетичний потенціал клітин і тканин, а також морфофізіологічні параметри регенованих рослин томату сорту Лагідний *in vitro*, який вводили в культуру згідно з методом, описаним нами раніше [8].

Як експланти в роботі використовували сегменти гіпокотилів проростків томату, які вирощували на відповідних середовищах, що містили продукти деструкції ГХЦГ або досліджуваний пестицид – ГХЦГ у концентрації 20 мг/л. Як контроль були використані середовища, що не містили досліджуваних речовин.

Пестицид у концентрації 20 мг/л або продукти його деструкції (в об'ємі 1 мл) наносили на поверхню агаризованих живильних середовищ. Кожні три тижні досліджуваний рослинний матеріал пасували на свіжі живильні середовища МС [9], доповнені 1 мг/л зеатину (Зеа) та 1 мг/л індоліл-оцтової кислоти (ІОК).

Досліди проводили не менш ніж 3 рази, статистичну достовірність отриманих даних підтверджували за допомогою критерію Стюдента для 5 % рівня значущості.

Результати та обговорення

У ході проведення аналізу впливу продуктів мікробної деструкції циклічного хлорорганічного пестициду ГХЦГ на морфогенетичний потенціал томату сорту Лагідний було встановлено, що продукти деструкції ГХЦГ бактеріями *P. putide* 3, *S. maltophilia* 6 та *B. megaterium* не чинять негативного впливу на морфогенетичні процеси, що відбуваються в культурі тканин *S. lycopersicum in vitro*. Зокрема, через тиждень культивування на живильному середовищі МС, що містило 1 мг/л ІОК, 1 мг/л Зеа та продуктів деструкції ГХЦГ, спостерігали формування первинного калюсу на зрізах гіпокотилів (рис. 1). Через три тижні на експлантах з'явилися перші пагони (рис. 2).

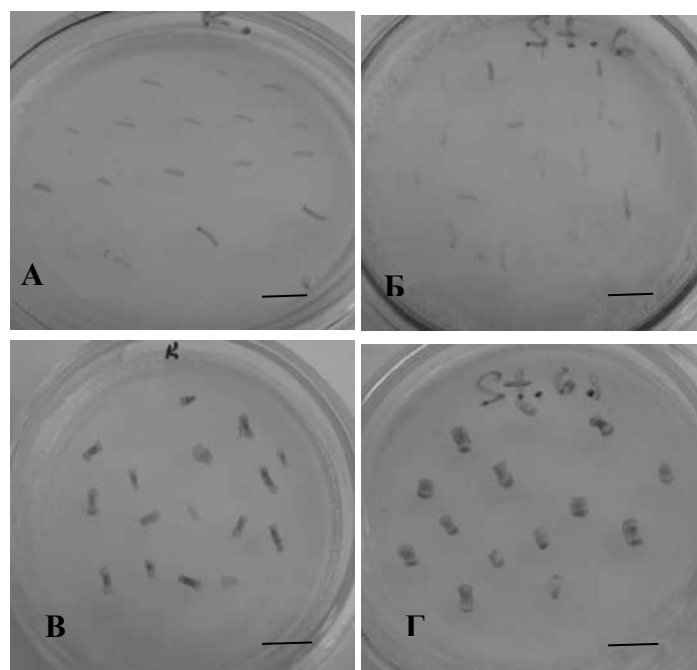


Рис. 1. Культивування експлантів (сегментів гіпокотилів) томату на середовищі МС + 1 мг/л Зеа + 1 мг/л ІОК без додавання (контроль – А, В) та з додаванням у середовище продуктів деструкції ГХЦГ культурою *S. maltophilia* 6 (Б, Г) на початку експерименту (А, Б) та через 7 діб (В, Г). Масштабна позначка – 1,1 см.

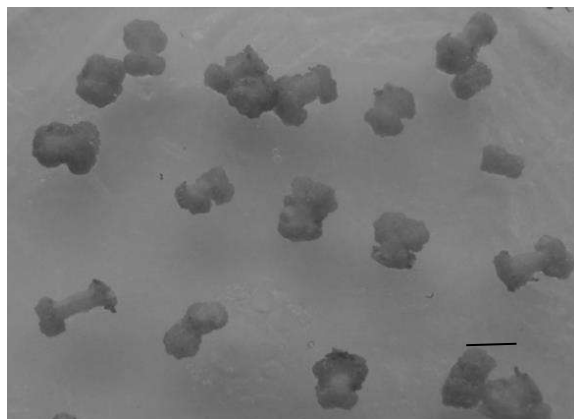


Рис. 2. Індукція регенерації пагонів на поверхні утвореного на експлантах томатів калюсу через 3 тижні культивування на середовищі МС + 1 мг/л Зеа + 1 мг/л ІОК з додаванням продуктів деструкції ГХЦГ культурою *B. megaterium*. Масштабна позначка – 0,8 см.



Рис. 3. Пагони томату, регеновані на середовищі МС+ 1 мг/л Зеа + 1 мг/л ІОК: А – контроль; Б – з додаванням продуктів деструкції культурою *P. putide* 3, В – з додаванням 20 мг/л ГХЦГ. Масштабна позначка – 0,9 см (А, Б) і 0,5 см (В).

Отримані результати досліджень були співставними або перевищували такі в контрольних зразках. Зокрема, встановлено, що ефективність регенерації на середовищах, що містили досліджувані деструктори, була вищою за контроль, а саме для *P.putide* 3 вона складала приблизно 60 %, *S. maltophilia* 6 – 53 %, *B. megaterium* – 48 %. Ефективність регенерації на контрольних зразках була на рівні 46 %. Натомість додавання у живильне середовище 20 мг/л ГХЦГ гальмувало процес формування пагонів, і ефективність регенерації рослин не перевищувала 12 %.

Відтак отримані пагони висаджували на середовище МС, на поверхню якого також наносили продукти деструкції пестициду ГХЦГ, або за їх відсутності (контроль). Нами було встановлено, що отримані рослини томатів на середовищах, що містили продукти деструкції ГХЦГ, морфологічно не відрізнялися від контрольних зразків, однак під час подальшого культивування у більшості з них спостерігали пригнічення процесу ризогенезу (рис. 3).

На середовищах із пестицидом ГХЦГ морфологічні процеси відбувалися дуже

повільно. Під час вирощування рослин за присутності 20 мг/л ГХЦГ спостерігали пригнічення формування пагонів *L. esculentum*, а сформовані пагони мали потовщені стебла та листки, в подальшому вони змінювали колір, а в їх клітинах відбувався некроз.

Отже, нами встановлено, що досліджувані продукти деструкції ГХЦГ уповільнюють процес коренеутворення, а ГХЦГ в концентрації 20 мг/л викликає морфологічні зміни у отриманих *in vitro* рослин томатів. Таким чином, отримані дані свідчать про ефективність використання зазначених бактерій для розкладу ГХЦГ з метою зниження його токсичного впливу на рослинні об'єкти.

Висновки

Помічено виражений негативний вплив хлорорганічного пестициду ГХЦГ на морфогенетичні реакції експлантів томатів, зокрема на ефективність регенерації, ріст і розвиток пагонів в умовах *in vitro*. Водночас встановлено, що всі досліджувані продукти деструкції ГХЦГ, отримані в результаті діяльності мікроорганізмів *P.putide* 3, *S. maltophilia* 6 та *B. megaterium*, не

викликають суттєвих морфогенетичних порушень, що свідчить про відсутність їх токсичного впливу на клітини і тканини *S. lycopersicum* в культурі *in vitro*.

Роботу виконано за фінансової підтримки проекту «Дослідити генетичні детермінанти, що визначають ключові етапи розкладу циклічних хлорорганічних пестицидів ґрунтовими бактеріями-деструкторами, розробити наукові основи біотехнологій відновлення забруднених пестицидами територій» цільової програми наукових досліджень НАН України «Геномні, молекулярні та клітинні основи розвитку інноваційних біотехнологій» (2020–2024 рр.).

цидів ґрунтовими бактеріями-деструкторами, розробити наукові основи біотехнологій відновлення забруднених пестицидами територій» цільової програми наукових досліджень НАН України «Геномні, молекулярні та клітинні основи розвитку інноваційних біотехнологій» (2020–2024 рр.).

References

1. Javaraj Megna P., Sreedev P. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *InterdiscipToxicol.* 2016. Vol. 9. P. 90–100. doi: 10.1515/intox-2016-0012.
2. Nakata H., Kawazoe M., Arizono K., Abe S., Kitano T., Shimada H et al. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyl residues in foodstuffs and human tissues from China: status of contamination, historical trend, and dietary exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2002. Vol. 43. P. 473–480. doi: 10.1007/s00244-002-1254-8.
3. Gill H., Garg H. Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies. Pesticides–Toxic Aspects, 2014.
4. Nagasawa S., Kikuchi R., Nagata Y., Takagi M., Matsuo M. Aerobic mineralization of gamma-HCH by *Pseudomonas spaucimobilis* UT26. 1993. *Chemosphere.* 1993. Vol. 26. P.1719–1728.
5. Philips T. M., Seech A. G., Hung L., Trevors J. Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms. *Biodegradation.* 2005. Vol. 16. P. 363–392. doi: 10.1007/s10532-004-2413-6.
6. Micu A. Biochemical aspects of double-nucleus pesticides degradation caused by the culture *Penicillium funiculosum* Thome CNM-FP-01. *Roman. Biotech. Lett.* 1997. Vol. 2, No. 4. P. 297–304.
7. Yamborko N., Iutynska G., Dugan A., Farfolameeva D. *Stenotrophomonas maltophilia* IMV B-7288 as the promising destructor of HCH-isomers complex at aerobic conditions. *Microbiol. Biotechnol.* 2020. Vol. 2. P. 24–32. doi: 10.18524/2307-4663.2020.2(49).205227.
8. Buziashvili A., Cherednichenko L., Kropyvko S., Yemets A. Transgenic tomato lines expressing human lactoferrin show increased resistance to bacterial and fungal pathogens. *Biocat. Agricult. Biotechnol.* 2020. Vol. 25. 101602. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101602>.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

SHYSHA O.M.¹, YAMBORKO N.A.², IUTYNSKA G.O.², YEMETS A.I.¹

¹ Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A

² D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotny str., 154

STUDY OF INFLUENCE OF ORGANOCHLORINE PESTICIDES AND THEIR DESTRUCTION PRODUCTS ON TOMATOES IN *IN VITRO*

Aim. Given the prospects of the method of detoxification of organochlorine contaminants in environment using microorganisms, the aim of the work was the investigation of the effect of microbial destruction products of pesticide hexachlorocyclohexane (HCCH) on morphogenetic and morphophysiological reactions of tomato *in vitro*. **Methods.** To test the effects of HCCH and its microbial degradation products obtained by strains of *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas putide* 3, *Stenotrophomonas maltophilia* 6, these compounds were added to nutrient medium for tomato cultivation. As explants the segments of hypocotyls of *L. esculentum* seedlings were used. For plant regeneration, MS medium supplemented with 1 mg/l of zeatin and 1 mg/l IAA was used. **Results.** It was found that the products of HCCH destruction stimulate the shoot regeneration, but inhibit their rooting, whereas HCCH inhibits the shoot formation and provokes further morphophysiological changes in plants. **Conclusions.** A pronounced negative effect of pesticide HCCH on cells and tissues of tomato *in vitro* was revealed. It was found that the products of HCCH destruction do not affect the morphogenetic processes of isolated tomato cells and tissues and do not cause morphophysiological changes in obtained *in vitro* tomato plants.

Keywords: organochlorine pesticides, microbial destruction, *Solanum lycopersicum* Mill., morphogenetic and morphophysiological reactions, *in vitro*.