

УДК 579.22; 57.033

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ РЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПЕСТИЦИДОМ ПРОМЕТРИН, В ЛАБОРАТОРНЫХ И ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ

© 2016 О.Ю. Ксенофонтова¹, С.Э. Третьякова², Е.И. Тихомирова², Е.В. Васнецова¹

¹ Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского

² Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.

Статья поступила в редакцию 14.11.2016

Изучен процесс деструкции пестицида прометрина штаммом *Pseudomonas putida* П2 в лабораторных и полевых условиях в экспериментально загрязненной почве. Проведена химико-аналитическая и токсикологическая оценка эффективности ремедиации почвы при использовании агротехнических приемов и внесении штамма-деструктора. Показано, что при внесении в загрязненную почву биодеструктора степень деградации пестицида в течение 30 суток возрастает до 70%. Использование только технологии активизации почвенной микрофлоры агротехническими приемами приводит к деструкции 13,5% прометрина. Применение технологических агроприемов в сочетании с внесением штамма-биодеструктора в почву оказывает значительное влияние на активность и скорость процессов биоремедиации.

Ключевые слова: биоремедиация, микроорганизмы деструкторы, пестицид прометрин, *Pseudomonas putida*, биопрепарат

Одной из актуальных задач современной биотехнологии является создание биопрепаратов на основе штаммов-деструкторов, выделенных из аборигенной микрофлоры, для решения комплекса задач, связанных с реабилитацией почв, загрязненных ксенобиотиками. Особенно сильному разрушающему влиянию подвергаются почвы вследствие интенсивного применения пестицидов с нарушением норм и правил их использования, что приводит к их значительному накоплению в почвах. Также особую опасность представляют полигоны захоронения неиспользованных или запрещенных химикатов. Естественные процессы самоочищения почв не способны справиться с такими объемами загрязнений [1, 2].

Известно, что плодородие и самоочищение почв напрямую зависят от активности микробиологических процессов, однако в результате высокой интоксикации почвы автохтонная микрофлора ингибируется [3]. Поэтому разработка комплексных технологий, направленных на восстановление основных функций почв и повышение их плодородия представляет значительный научный интерес, как для теоретической, так и для прикладной микробиологии. В настоящее время для решения проблем очистки загрязненных почв в качестве приоритетных рассматриваются методы биологической ремедиации [4-

6]. Биодеструкция считается наиболее перспективным направлением в технологиях рекультивации почвенных систем, зараженных органическими поллютантами, в том числе и пестицидами. На настоящий момент выделено и депонировано большое количество штаммов пестицид-деструкторов, как в виде монокультур, так и в консорциумах [7-9], однако практическое их применение в целях биоремедиации почв возможно только после изготовления из них биопрепаратов и разработки технологии применения.

Цель исследования: разработка технологии использования биопрепарата для ремедиации почв, загрязненных пестицидом прометрином, в лабораторных и полевых условиях на примере чернозема южного.

Материалы и методы.

Объекты исследования: прометрин [N₂,N₄ –ди-изопропил-6-метилтио-1,3,5-триазин-2,4-диамин] – высокоэффективный гербицид с однолетними двудольными и злаковыми сорняками. «Гезагард» – препаративная форма пестицида с действующим веществом прометрин. Штамм бактерий, выделенный из почвы, экспериментально загрязненной пестицидом прометрин, *Pseudomonas putida* П2, депонированный в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина РАН в качестве прометрин-деструктора (свидетельство о депонировании №12310/02-1-4-940 от 28.03.2013). Биопрепарат на основе данного штамма [10]. Почва – чернозем южный, среднесуглинистый, мощность 0,8 м, содержание гумуса по ГОСТ 26213 – 2,8%, содержание общего азота по ГОСТ 26107 – 0,15%, содержание аммонийного азота – 1,3 мг/кг, содержание нитратного азота – 89,1 мг/кг, объемная масса почвы – 1,43 см³, общая

Ксенофонтова Ольга Юрьевна, кандидат биологических наук, доцент. E-mail: ksenofontova64@mail.ru

Третьякова Светлана Эдуардовна, кандидат биологических наук, заведующая биотехнологическим отделом. E-mail: treste1@mail.ru

Тихомирова Елена Ивановна, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой экологии. E-mail: tichomirova_ei@mail.ru

Васнецова Елена Владимировна, аспирантка

пористость почвы – 46%, соотношение C:N – 9,1, кислотность водного раствора почвы 7,79, емкость катионного обмена по ГОСТ 17.4.4.01 – 30,0, насыщенность основаниями – 90%, содержание подвижного фосфора по ГОСТ 26205 – 407 мг/кг, подвижного калия – 407 мг/кг, сумма анионов и катионов – 0,079%.

Методы исследования. Индикацию штамма-деструктора в составе общей микробиоты почвы проводили на твердой среде М9 (состав среды, г/л: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 6,0; KH_2PO_4 – 3,0; NaCl – 0,5; NH_4Cl – 1,0, вода дистиллированная – до 1000 мл; pH среды до стерилизации – 6,8–7,0) с добавлением в нее пестицида в качестве источника углерода 0,01% 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ) в качестве индикатора дегидрогеназной активности бактерий [11]. Выращивание биомассы прометрин-деструктора *Pseudomonas putida* П2 проводили методом ферментации культивирования в лабораторном ферментере в модифицированной среде КГКДЭ (состав среды, г/л: кислотный гидролизат казеина (КГК) (производство HighMedia, Индия) – 10; дрожжевой экстракт (ДЭ) (производство HighMedia, Индия) – 5; глюкоза – 25; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 4,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; K_2HPO_4 – 2,0; пеногаситель «Пента-474» (производство ООО «Пента-91») – 0,3 мл, вода дистиллированная – до 1000 мл, pH – 6,8–7,0. Процесс ферментации проводили в 3 цикла в лабораторном ферментере с общим объемом 1 л. Рабочий объем среды составлял 600 мл (60% от общего объема). Параметры культивирования подбирались экспериментально.

Определение концентрации бактериальных клеток в культуральной жидкости проводили на спектрофотометре СФ-102 (НПО «ИНТЕРФОТО-ФИЗИКА») при постоянных параметрах: длина волны $\lambda=630$ нм, длина кюветы $l=10$ мм (ОП₆₃₀). Количество клеток определяли по калибровочному графику, выражающему зависимость оптической плотности ОП₆₃₀ культуральной жидкости от количества клеток, определенного по стандарту мутности БАК-10 (производство ООО «ОРМЕТ»). Внесение пестицида и биопрепарата в почву: при загрязнении почвы использовали промышленный препарат «Гезагард» с действующим веществом (ДВ) прометрином, который вносили в почву с таким расчетом, чтобы конечная концентрация ДВ в почве соответствовала 100 ПДК (50 мг/кг). Концентрация и объем вносимой бактериальной суспензии был рассчитан так, чтобы конечная концентрация микроорганизмов была порядка 10^8 клеток на 1 г воздушно-сухой почвы, а увлажненность почвы составляла не более 60% от ПВ. В качестве жидкой фазы суспензии использовали минеральную среду М9 с 0,1% сахарозой. Отбор проб и определение концентрации пестицидов проводили на 7-е, 14-е и 30-е сутки. Определение концентрации пестицидов проводили на хромато-

масс-спектрометре Agilent Technologies (GH 7820A, MS 5975) с низкополярной колонкой HP-5MS. Условия программы и режима прибора подбирали для каждого из веществ индивидуально в соответствии с данными библиотеки спектров MS Search v.2.0. Пробоподготовку и экстракцию проводили в соответствии со стандартными методиками (РД 52.18.188–2001; РД 52.24.411–2009). Токсичность почвы определяли с использованием стандартных тест-объектов *Daphnia magna* Straus и *Chlorella vulgaris* Beijer в соответствии с ПНД Ф Т 14.1:2:4.12–06 (Т16.1:2:3:3.9–06, ФР.1.31.2009.066410) и ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10–04 (16.1:2.3.7–04). Отбор образцов почв на все виды исследований проводили согласно нормативным документам (ГОСТ 28168–89; ГОСТ 17.4.3.01–83; ГОСТ 17.4.4.02–84). Статистическую обработку данных проводили по общепринятым методикам с использованием программ статистического пакета Excel (MS Office 2007). Повторность всех экспериментов трехкратная.

Результаты исследований и их обсуждение. Разработка технологии использования биопрепарата на основе штамма-деструктора проводилась в 2 этапа:

1 – изучение процесса деструкции пестицида прометрина штаммом *Pseudomonas putida* П2 в лабораторных условиях;

2 – испытание деструктивных свойств биопрепарата на основе модельного биодеструктора на экспериментально загрязненных почвенных системах в полевых условиях.

На 2 этапе представляло интерес оценить эффективность ремедиации экспериментально загрязненной почвы в естественных климатических условиях при использовании агротехнических приемов и внесении штамма деструктора по данным химико-аналитических и токсикологических исследований.

Изучение процесса деструкции пестицида в лабораторных условиях. Для определения разрушения пестицида под действием аборигенной микрофлоры или интродуцированного биодеструктора совместно с аборигенной микрофлорой нами были проведены лабораторные исследования деградации пестицида в стерильной и нестерильной почве, а также нестерильной почве с внесением биодеструктора в течение 30 суток. Анализ полученных результатов в стерильной почве не выявил снижения концентрации пестицида. В результате применения технологии активизации аборигенной почвенной микрофлоры классическими агротехническими приемами (внесение минерально-углеводных добавок, увлажнение, рыхление) степень деструкции к 30-м суткам составила только 16%. А в почве, инокулированной биодеструктором деградация прометрина была значительно выше и составила 70% (рис. 1).

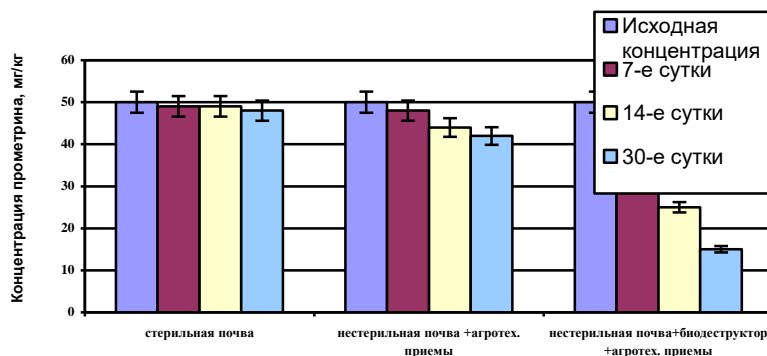


Рис. 1. Динамика деградации прометрина в почве в различных условиях

Внесение штамма *P. putida* П2 в стерильную и нестерильную почву с последующими периодическими высевами на два варианта сред (питательную МПА и селективную М9) показало его конкурентоспособность и сохранение деструктивных свойств в присутствии аборигенной микрофлоры. Концентрация интродуцированного штамма *P. putida* П2 на протяжении 30 суток оставалась стабильно высокой.

Изучение деградации пестицида прометрина в полевых условиях. Для проведения полевого эксперимента были подготовлены 3 экспериментальных участка площадью по 20 м², оборудованные тентованными навесами для укрытия от дождя, изолированные от прилегающей

территории и друг от друга. При помощи специально оснащенной агротехники почва была окультурена на глубину 10–12 см, на все участки был внесен агрохимикат «Гезагард» в количестве 50 мг/кг (100 ПДК) ДВ (прометрина) в почву. В соответствии с задачами эксперимента на участках оценивали эффективность технологий ремедиации земель, загрязненных «Гезагардом». Назначение участков и приемы ремедиации приведены в табл. 1. На протяжении всего эксперимента влажность полевой почвы поддерживали на уровне около 40% от ПВ. Эффективность проведенных технологических агроприемов оценивали по снижению концентрации пестицида (рис. 2) и показателям токсичности почвы.

Таблица 1. Назначение участков для проведения полевого эксперимента по оценке эффективности применяемых технологических агроприемов и внесения разработанного биопрепарата

№ уч-ка	Задачи эксперимента	Приемы ремедиации загрязненной почвы	Внесенные компоненты
1	деструкция пестицида под воздействием естественных факторов окружающей среды. Загрязненный контроль	агроприемы не проводились	«Гезагард», вода водопроводная
2	деструкция пестицида в почве под воздействием естественных факторов окружающей среды с применением агротехнических приемов	агротехнические приемы (полив и аэрация почвы рыхлением), стимулирование автохтонной микрофлоры	«Гезагард», вода водопроводная, углеводно-минеральные добавки
3	деструкция пестицида в почве под воздействием естественных факторов окружающей среды с применением агротехнических приемов и влиянием внесенного деструктора в виде водной суспензии	агротехнические приемы (полив и аэрация почвы рыхлением), стимулирование автохтонной микрофлоры, внесение суспензии деструктора	«Гезагард», вода водопроводная, углеводно-минеральные добавки, водная суспензия биомассы штамма-деструктора <i>P. putida</i> П2 (10 ⁸ кл/г почвы)

Установлено, что при внесении в загрязненную почву соответствующего биодеструктора степень деградации пестицида в течение 30 суток возрастает до 70%. Внесение биодеструктора оказалось наиболее эффективным, чем использование только технологии активизации почвенной микрофлоры агротехническими приемами, где степень деструкции прометрина составила 13,5% (участок № 2). На участке № 1 и концентрация

прометрина снизилась незначительно. Сразу после загрязнения почвы «Гезагардом», но до внесения биопрепаратов, с каждого участка были отобраны обобщенные образцы почв для определения исходной токсичности. Через 30 суток для определения остаточной токсичности также были отобраны обобщенные образцы почв индивидуально с каждого участка. Токсичность экспериментальных почв, загрязненных прометрином

определяли биотестированием. Установлено острое токсическое действие вытяжек почв на биотест-объекты *Daphnia magna* Straus и *Chlorella vulgaris* Beijer сразу после загрязнения

пестицидом. В результате проведенных мероприятий по биоремедиации токсичность почвы участка № 3 значительно снизилась по сравнению с контрольным участком № 1.

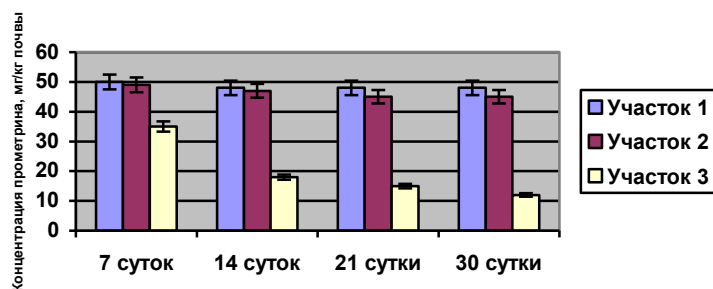


Рис. 3. Динамика изменения концентрации прометрина в почве экспериментальных участков

Выводы: при анализе химических и токсикологических показателей выявлено, что под воздействием биотических и абиотических факторов в полевых условиях, но без проведения агротехнических и биоремедиационных мероприятий, концентрация прометрина в почве практически не изменяется. Применение технологических агроприемов без проведения биоремедиации незначительно стимулирует активность аборигенной микрофлоры к деструкции пестицида. Использование технологических агроприемов в сочетании с внесением штамма-биодеструктора в почву оказало значительное влияние на активность и скорость процессов биоремедиации почвы, загрязненной прометрином.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Бабкина, Э.И. Полигоны захоронения пестицидов как источник загрязнения окружающей среды / Э.И. Бабкина, В.А. Сурин, Д.П. Самсонов и др. // Природные ресурсы. Использование и охрана природных ресурсов в России. – 2003. Бюл. № 11–12. С. 115–122.
2. Ксенофонтова, О.Ю. «Микроорганизмы почвы и пестициды», LAP LAMBERT Academic Publishing, 2015-01-16. 136 с.
3. Терещенко, Н.Н. Эколого-биологические факторы и механизмы ремедиации антропогенно-нарушенных почв: Автореф. дис. ... д.б.н. – Томск, 2007. 42 с.
4. Савина, К.В. Изучение микроорганизмов почв с мест захоронений химикатов и анализ их способности к деструкции пестицидов различного химического состава / К.В. Савина, Д.А. Тихонова, Е.А. Филимонова, О.Ю. Ксенофонтова // Сборник статей V Междунар. науч.-практ. конф. «Изучение, сохранение и восстановление естественных ландшафтов» г. Волгоград, 12–16 октября 2015 г. – М.: Планета, 2015. С. 288–289.
5. Тихомирова, Е.И. Разработка методических подходов к использованию комбинированной сорбционно-биологической технологии ремедиации почв, загрязненных пестицидами / Е.И. Тихомирова, С.Э. Третьякова, В.В. Олискевич и др. // В сб. мат-лов I Кавказского экологического форума. – Грозный, 2013. С. 112–114.
6. Третьякова, С.Э. Использование комбинированной сорбционно-биологической технологии для ремедиации почв, загрязненных пестицидами / С.Э. Третьякова, В.В. Олискевич, Н.М. Талаловская и др. // Актуальные проблемы экологии промышленных городов: мат-лы Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Саратов, 2013. Т.2. С. 167–171.
7. Олискевич, В.В. Оптимизация технологий биоремедиации сельскохозяйственных земель, загрязненных гербицидом «Гезагард» / В.В. Олискевич, Н.М. Талаловская, С.Э. Третьякова и др. // Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология. 2013. Вып. 2. Т. 13. С. 101–107.
8. Третьякова, С.Э. Создание биопрепаратов на основе штаммов-деструкторов пестицидов прометрина и паратион-метила и испытание технологии ремедиации загрязненных почв в лабораторных и полевых условиях: Автореф. дис. ... к.б.н. – Саратов, 2013. 24 с.
9. Афанасьев, В.Н. Способ получения микробного препарата для утилизации пестицидов, способ утилизации пестицидов (варианты) и устройство для утилизации пестицидов / В.Н. Афанасьев, Н.В. Гамова, Н.Г. Гаранькина // Патент РФ №2279325, кл С12М1/10, С12М1, В09С1/10. – 2002.
10. Гранатская, Т.А. Способ выявления микроорганизмов-деструкторов ксенобиотиков // Патент РФ № 2051961, кл С12Н1/20. – 1996.
11. Третьякова, С.Э. Создание биопрепарата на основе штамма-деструктора прометрина *Pseudomonas putida* П2, иммобилизованного на микрокапсулах, для ремедиации загрязненных прометрином почв / С.Э. Третьякова, О.Ю. Ксенофонтова // Экология: синтез естественнонаучного, технического и гуманитарного знания: тезисы докл. III Всерос. науч.-практ. форума. – Саратов: СГТУ, 2012. С. 114–118.
12. Олискевич, В.В. Определение пестицид-деструктивной активности бактерий с помощью индикатора дегидрогеназной активности микроорганизмов 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида / В.В. Олискевич, С.Э. Третьякова, Н.В. Веденеева, В.В. Дмитриенко // Российский химический журнал. 2012. № 5. С. 56–61.

**DEVELOPMENT THE TECHNOLOGY OF USING THE BIOLOGICAL PRODUCT
FOR REMEDIATION THE SOILS, POLLUTED BY PROMETRIN PESTICIDE,
IN LABORATORY AND FIELD CONDITIONS**

© 2016 O.Yu. Ksenofontova¹, S.E. Tretyakova², E.I. Tikhomirova², E.V. Vasnetsova¹

¹ Saratov State University named after N.G. Chernyshevskiy

² Saratov State Technical University named after Gagarin Yu.A.

Process of destruction the pesticide prometrin by strain of *Pseudomonas putida* P2 in laboratory and field conditions in experimentally polluted soil is studied. The chemical analysis and toxicological efficiency evaluation of soil remediation during the using of agrotechnical acceptances and introduction of a strain destructor is carried out. It is shown that when entering into the polluted soil of biodestructor extent of pesticide degradation within 30 days increases up to 70%. Use only the technology of activation the soil microflora by agrotechnical acceptances leads 13,5% of prometrin to destruction. Application of technological agroacceptances in combination with entering of a strain biodestructor into the soil exerts considerable impact on activity and speed of processes of bioremediation.

Key words: *bioremediation, microorganisms destructors, pesticide prometrin, Pseudomonas putida, biological product*

Olga Ksenofontova, Candidate of Biology, Associate Professor. E-mail: ksenofontova64@mail.ru
Svetlana Tretyakova, Candidate of Biology, Chief of the Biotechnological Department. E-mail: treste1@mail.ru
Elena Tikhomirova, Doctor of Biology, Professor, Head of the Ecology Department. E-mail: tichomirova_ei@mail.ru
Elena Vasnetsova, Post-graduate Student