

Министерство образования и науки Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

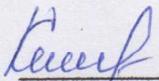
**ДЕСТРУКЦИЯ ПЕСТИЦИДА ДДТ МИКРООРГАНИЗМАМИ В  
МИКРОПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ**

**АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ**

Студента 2 курса 241 группы  
Направления 06.04.01 Биология  
Биологического факультета  
Филимоновой Екатерины Александровны

Научный руководитель:

к.б.н., доцент

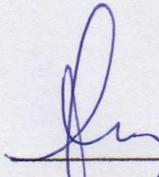
 19.06.18

дата, подпись

О.Ю. Ксенофонтова

Заведующий кафедрой:

д.б.н., профессор

 19.06.18

дата, подпись

С. А. Степанов

Саратов 2018

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** В настоящее время ведение сельского хозяйства предполагает использование химических средств борьбы с вредителями возделываемых растений – пестицидов. Интенсивное применение этих препаратов приводит к непрерывной закупке все новых пестицидов. Большую проблему представляют старые, пришедшие в негодность и запрещенные препараты, которые необходимо как-то утилизировать. Потенциальную опасность для окружающей среды и человека несут места их захоронения – специальные подземные бетонированные бункеры, колодцы и склады. В результате нарушения режимов хранения пестициды проникают в почву, распространяются с осадками и грунтовыми водами и накапливаются в почве [1-4]. В результате длительного контакта почвы с химикатами среди почвенных микроорганизмов происходит адаптация к высоким концентрациям пестицидов и происходит накопление штаммов деструкторов.

**Цель и задачи исследования.** В связи с этим целью работы явилось выделение из почвы территории захоронения пестицидов микроорганизмов, способных к разложению ДДТ и изучении их деструктивной активности. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Выделить из почвы с места захоронения пестицидов штаммы, способные использовать ДДТ как источник углерода.
2. Изучить деструктивную активность выделенных штаммов в жидких питательных средах;
3. Отобрать наиболее активные штаммы и идентифицировать их;
4. Изучить деструкцию пестицида ДДТ в микрополевых условиях;
5. Провести мониторинг численности интродуцированного штамма деструктора в почве.

**Материал исследований.** 1. Почва с места захоронения пестицидов и фоновой территории (почва территории, на расстоянии 1-3 км от места захоронения) в Краснопартизанском районе Саратовской области. 2. ГСО

пестицида трихлорметилди(Н-хлорфенил)метана (ДДТ). 3. Культуры микроорганизмов, выделенные из почвы с места захоронения пестицидов

**Структура и объем работы.** Работа изложена на 52 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 4 таблицами и 12 рисунками. Список использованных источников включает 69 наименований.

**Научная новизна.** Выделены штаммы микроорганизмов, на основе которых можно создавать высокоэффективный экологически безопасный препарат, предназначенный для очистки почвы, загрязненной большим количеством пестицида ДДТ.

#### **Публикации.**

1. Филимонова Е.А., Тихонова Д.А., Тяпкин С.А., Нестерова И.С., Ксенофонтова О.Ю. деструктивная активность почвенных микроорганизмов, выделенных с мест захоронения пестицидов // Экологические проблемы промышленных городов: сборник научных трудов по материалам 8-й Международной научно - практической конференции. Саратов. Издательство СГТУ, 2017 г.
2. Тихонова Д.А., Филимонова Е.А., Тяпкин С.А., Нестерова И.С., Ксенофонтова О.Ю. Влияние аэрации и кислотности среды на деструкцию пестицида прометрина штаммом *Pseudomonas sputida* П2 // Экологические проблемы промышленных городов: сборник научных трудов по материалам 8-й Международной научно - практической конференции. Саратов. Издательство СГТУ, 2017 г.
3. Васнецова Е.В., Ксенофонтова О.Ю., Тихонова Д.А., Филимонова Е.А., Савина К.В. Поиск штаммов – деструкторов пестицидов прометрина, ГХЦГ и 4,4 – ДДТ в почве территории захоронения пестицидов в Саратовской области // Известия Саратовского

университете. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2016. Т. 16, выпуск 3.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Доминирующими популяциями среди органотрофных бактерий в загрязненной почве явился штамм рода *Bacillus*.
2. Бактерии рода *Bacillus* в качестве единственного источника углерода используют ДДТ.
3. Интродуцированный штамм активно размножается в загрязненной почве, выдерживает конкуренцию с аборигенной микрофлорой и сохраняет высокую численность.

### **Основное содержание работы**

#### *Микробиологический анализ почвы с мест захоронения пестицидов*

Учет микроорганизмов проводили методом Коха – метод основан на механическом разведении микробных клеток. Проводили учет микроорганизмов различных физиологических групп: аммонифицирующие бактерии; азотфиксирующие бактерии; плесневые грибы; актиномицеты. Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Численность почвенных микроорганизмов на территории захоронения пестицидов

Физиологическая группа бактерий	Численность микроорганизмов, КОЕ/г ( $M \pm m$ )	
	Загрязненная почва	Фоновая территория (на расстоянии 1000 м)
Аммонифицирующие бактерии	$(4,0 \pm 0,2) * 10^8$	$(3,7 \pm 0,4) * 10^6$
Азотфиксирующие бактерии	$(3,8 \pm 0,1) * 10^4$	$(1,1 \pm 0,2) * 10^5$
Плесневые грибы	$(1,6 \pm 0,2) * 10^3$	$(12,7 \pm 1,1) * 10^3$

Актиномицеты	$(2,7 \pm 0,2) * 10^3$	$(2,5 \pm 0,4) * 10^3$
Целлюлозоразлагающие микроорганизмы	0	$(2,3 \pm 0,1) * 10^3$

### *Получение чистых культур микроорганизмов деструкторов*

Важным условием для дальнейшей микробиологической работы являлось изолирование отдельных штаммов микроорганизмов и получение чистых культур для изучения индивидуальных деструктивных свойств.

Получение чистых культур осуществляли механическим разобщением на поверхности плотной питательной среды (метод штриха с обжигом петли) [7] (рисунок 1).

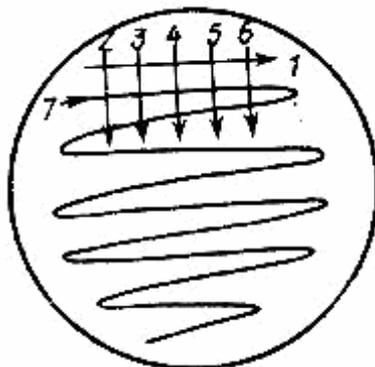


Рисунок 1 – Пример метода штриха с обжигом петли

### *Изучение биологических свойств микроорганизмов деструкторов*

Для характеристики и идентификации микроорганизмов деструкторов проводили изучение культуральных, морфологических и биохимических признаков исследуемых штаммов [4].

Культуральные свойства изучали путем описания характера роста бактерий на твердых и жидких средах в течение 14 дней.

Морфологические свойства изучали путем микроскопирования, измерения клеток, выявления подвижности и принадлежности к грамположительным или грамотрицательным бактериям.

Изучение биохимических свойств проводили следующими тестами: определение способности к анаэробному росту, изучение сахаролитической активности, оксидазы, образование промежуточного продукта – ацетоина на среде Кларка (тест Фогес-Проскауера), выявление способности к гидролизу крахмала осуществляли на крахмальной среде с последующей обработкой раствором Люголя, определяли способность к гидролизу мочевины, желатина и казеина, определяли образование побочных газообразных продуктов расщепления пептонов (аммиак, сероводород и индол).

Идентификацию выделенных деструкторов проводили по совокупности культуральных, морфологических, тинкториальных и биохимических признаков с использованием девятого и десятого изданий определителя бактерий Берджи [8-9].

#### *Отбор штаммов деструкторов*

Отбор штаммов деструкторов проводили на минеральной (синтетической) среде М9 (использовали в качестве базовой безуглеродной среды для культивирования микроорганизмов, селективных по углероду) с добавлением ТТХ [5]. В качестве источника углерода использовали ГСО пестицида ДДТ. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Анализ способности использовать пестициды в качестве единственного источника углерода в концентрации 200 мкг/мл в среде М9

Штаммы бактерий	Концентрации пестицида ДДТ в среде М9		
	ПДК, 0,1 мкг/мл	10 ПДК, 1 мкг/мл	100ПДК, 10 мкг/мл
<i>Brevibacterium sp.</i> 111	++	++	-
<b><i>Bacillus sp.</i> 114</b>	++	++	+
<i>Bacillus sp.</i> 129	++	+	-
<i>Bacillus sp.</i> 102	+	–	–
<i>Bacillus sp.</i> 105	–	–	–
<i>Bacillus sp.</i> 106	+	+	–
<i>Bacillus sp.</i> 107	–	–	–
<i>Bacillus sp.</i> 109	–	–	–
<i>Bacillus sp.</i> 110	+	+	–
<i>Bacillus sp.</i> 111.1	–	–	–
<i>Bacillus sp.</i> 112	+	–	–
<i>Bacillus sp.</i> 123	–	–	–
<i>Bacillus sp.</i> 128	+	–	–
<i>Bacillus sp.</i> 140	–	–	–
<i>Bacillus sp.</i> 140.1	+	–	–

«+» - наличие роста; «++» - хороший рост; «+++» - интенсивный рост;  
«-» - отсутствие роста

Из 14 штаммов микроорганизмов, деструктивную активность проявили 3 штамма: *Brevibacterium sp.* 111, *Bacillus sp.* 114, и *Bacillus sp.* 129.

#### *Изучение биологических свойств микроорганизмов деструкторов*

При отборе штаммов, рекомендуемых для практического использования в объектах окружающей среды, необходимо проводить их полную биологическую характеристику. Важным условием, предъявляемым к

производственным штаммам, является отсутствие у них свойств патогенности. В связи с этим, у отобранных штаммов были изучены такие факторы патогенности, как: мацерация клубней картофеля, моркови и свёклы; способность к гемолизу эритроцитов; плазмокоагулазная и лецитиназная активность [4]. Результаты представлены в таблице 3.

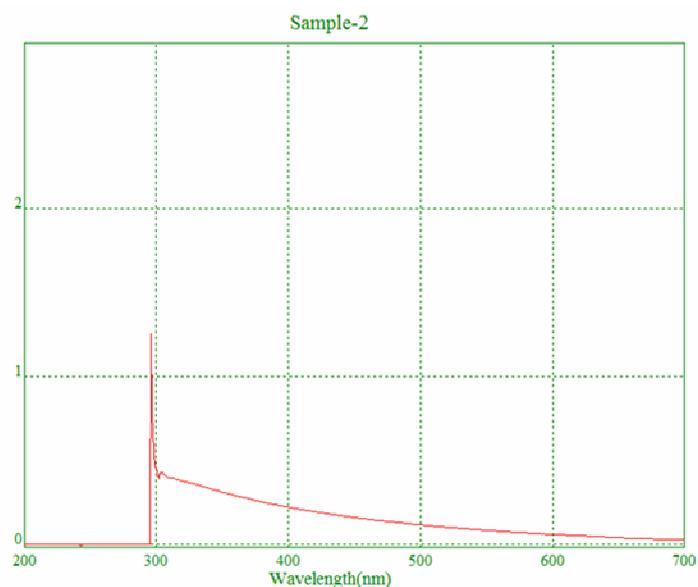
Таблица 3 – Анализ патогенных свойств штаммов деструкторов

Штамм деструктор	Патогенные свойства			
	Гемолитическая активность	Плазмокоагулазная активность	Лецитиназная активность	Мацерация
<i>Brevibacterium sp. 111</i>	–	–	–	–
<i>Bacillus sp.114</i>	–	–	–	–
<i>Bacillus sp.129</i>	–	–	–	–

По результатам эксперимента ни один из штаммов не обладает патогенными свойствами.

*Изучение деструкции пестицида ДДТ штаммом Bacillus sp.114 в жидкой среде М9*

Так как штамм *Bacillus sp.114* проявил дегидрогеназную активность на среде М9 с пестицидом ДДТ в качестве единственного источника углерода, нами был проведен спектрофотометрический анализ для подтверждения деструкции. При анализе спектров ГСО пестицида ДДТ в течение 7 дней были установлены пики, которые не подвергались изменениям. При добавлении микроорганизмов в среду, наблюдение вели именно за этими пиками. Спектрограммы деструкции пестицидов представлены на рисунках 2, 3.

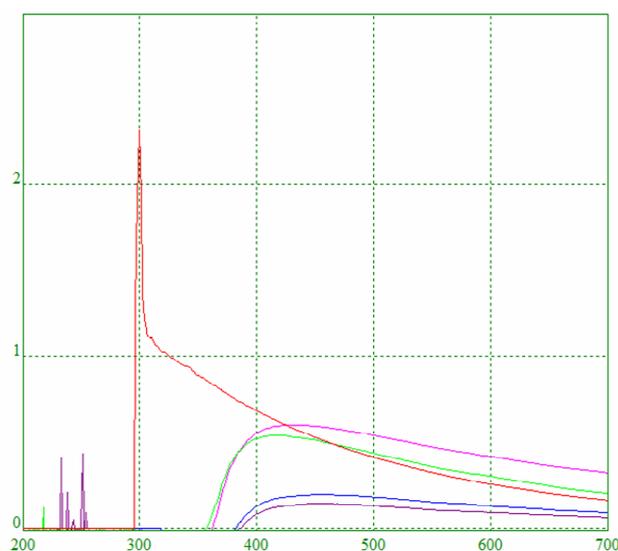


1-7 день 

Рисунок 2 – Спектрофотометрический анализ 200 мкг/мл (100 ПДК)

ДДТ в среде М9

Из рисунка видно, что на 7 день концентрация пестицида остается без изменений. Следовательно, пестицид не подвергается изменениям в среде М9 в течении 7 дней. В дальнейшем, нами были изучены спектры концентрации пестицида в среде с микроорганизмами. Таким образом, при добавлении микроорганизмов в среду любые изменения в спектре можно принимать за деструкцию пестицида.



1 день ■ 2 день ■ 3 день ■ 4 день ■ 5 день ■ 6 день ■

Рисунок 3 – Спектрофотометрический анализ деструкции 200 мкг/мл (100 ПДК) ДДТ штаммом *Bacillus sp. 114* в среде М9

Анализ деструкции 200 мкг/мл (100 ПДК) ДДТ штаммом *Bacillus sp. 114* в среде М9 показал, что на 3 день культивирования образуется новый продукт трансформации пестицида с пиком поглощения в области 400 нм. На 7 день отмечено снижение концентрации данного продукта.

#### *Изучение деструкции пестицида ДДТ штаммом Bacillus sp.114 в почве*

В почве кроме пестицида могут содержаться другие углеродные субстраты, которые будут более доступны в качестве питания, в результате чего, деструкция ДДТ будет проходить не столь эффективно, как в лабораторных условиях. Так же в почве, как многокомпонентной системе, содержащей различные органические и минеральные вещества может происходить и естественная деструкция пестицида. В связи с этим, мы изучили деструкцию пестицида ДДТ в почве.

Результаты химико–аналитических исследований концентрации пестицида в почве представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Динамика концентрации ДДТ в почве

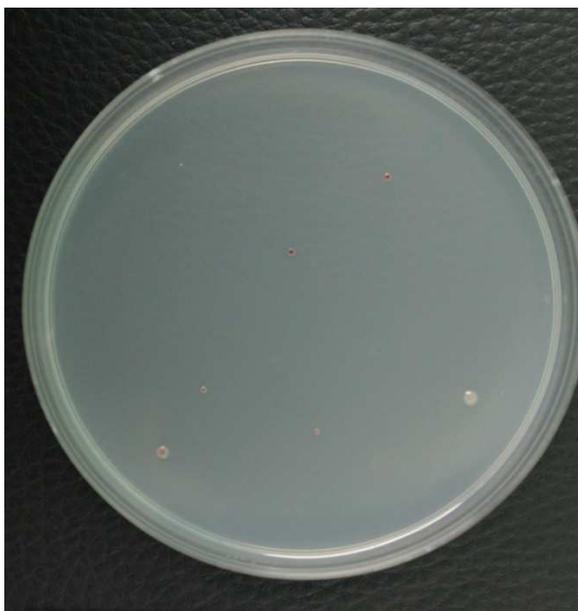
Образец почвы	Концентрация ДДТ, мкг/г ( $M \pm m$ )					
	<i>ex tempore</i>	7 сутки	14 сутки	21 сутки	30 сутки	Степень деструкции, %
Почва + пестицид (контроль)	10,0 ± 1,5	9,7±0,5	9,4 ± 0,4	9,2 ± 0,4	9,1±0,2	<b>9</b>
Почва + пестицид + деструктор	10,0±1,5	8,7±0,1	7,2±0,4	6,5±0,4	4,2±0,3	<b>58</b>

$P < 0,05$

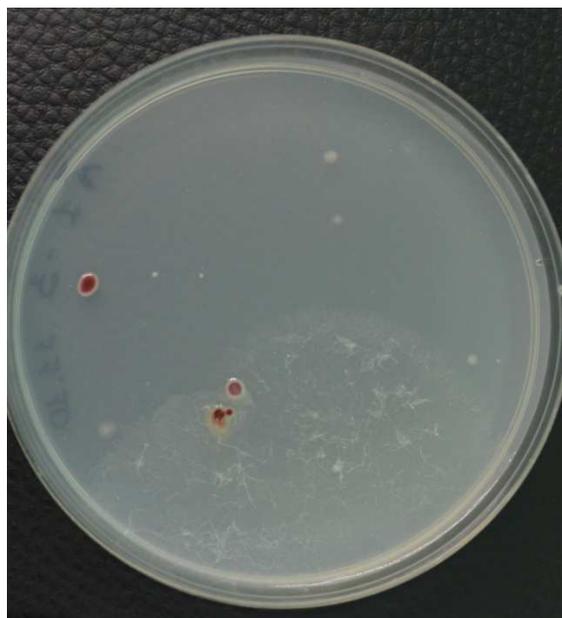
Анализ полученных данных показал, что под действием аборигенной микрофлоры и компонентов почвы происходит небольшая деструкция пестицида – 9 % от начальной концентрации. Наибольшая степень деструкции (58 %) отмечена в почве с интродуцированным штаммом деструктором.

*Индикация интродуцированного штамма–деструктора *Bacillus sp. 114* в экспериментальной почве*

Для индикации интродуцированного штамма – деструктора в почве применяли селективную среду М9 с пестицидом и ТТХ в качестве метода количественного контроля в почве ДДТ–деструкторов. Исследования проводили на модельном штамме–деструкторе ДДТ *Bacillus sp. 114*. В эксперименте сравнивали изменение численности аборигенных штаммов деструкторов и интродуцированного штамма *Bacillus sp. 114* в присутствии аборигенной микрофлоры с использованием селективной среды М9 для подсчета колоний. Полученные данные представлены на рисунке 4



1 сутки после загрязнения почвы  
100 ПДК ДДТ



30 сутки после загрязнения почвы  
100 ПДК ДДТ

Рисунок 4 – Колонии штаммов деструкторов среди аборигенной микрофлоры на чашках со средой М9 с ТТХ, посев 0,1 мл почвенного разведения  $10^{-3}$

Учет численности деструкторов пестицида ДДТ в почве выявил, что в течение 30 дней не происходит размножение культур деструкторов среди аборигенной микрофлоры. Таким образом, при загрязнении почвы ДДТ в дозе, равной 100 ПДК, аборигенная микрофлора в естественных условиях не способна к самоочищению.

Анализ численности внесенного в почву деструктора показал, что интродуцированный штамм активно размножается в загрязненной почве, выдерживает конкуренцию с аборигенной микрофлорой и сохраняет высокую численность на 30 сутки после внесения (рисунок 5).



1 сутки после загрязнения почвы  
100 ПДК ДДТ



30 сутки после загрязнения почвы  
100 ПДК ДДТ

Рисунок 5 – Колонии интродуцированного штамма деструктора среди аборигенных деструкторов на чашках со средой М9 с ТТХ, посев 0,1 мл почвенного разведения  $10^{-3}$

Таким образом, по результатам экспериментов, получен штамм бактерий *Bacillus sp.114*, который способен подвергать деструкции пестицид ДДТ является перспективным штаммом для создания биопрепарата, предназначенного для деструкции ДДТ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение численности микроорганизмов в почве территории захоронения пестицидов показало, что доминирующей популяцией среди микроорганизмов явились гетеротрофные бактерии. На основании изученных морфологических, культуральных и биохимических признаков штаммов, среди доминирующих популяций преобладали бактерии рода *Bacillus*. В связи с этим поиск микроорганизмов деструкторов проводили в этой группе. Для этого у выделенных штаммов изучена способность использовать углерод из пестицидов. В результате экспериментов установлено, что бактерии родов *Bacillus* и *Brevibacterium* в качестве единственного источника углерода использовали ДДТ в концентрации 10 и 100 ПДК. Наилучший рост при высоких концентрациях пестицида проявил штамм *Bacillus sp. 114*. Изучение у него биологических признаков, не выявило гемолитической, плазмокоагуляционной и лецитиназной активностей, что указывало бы на патогенные свойства. При изучении способности использовать пестицид как единственный источник углерода в жидкой среде М9 установлено, что в течение 7 дней данный штамм микроорганизмов разрушает не только пестицид ДДТ, но и продукты его полураспада.

Однако, в почве кроме пестицида могут содержаться другие углеродные субстраты, которые будут более доступны в качестве питания, в результате чего, деструкция ДДТ будет проходить не столь эффективно, как в лабораторных условиях. Так же в почве, как многокомпонентной системе, содержащей различные органические и минеральные вещества может происходить и естественная деструкция пестицида. В связи с этим, мы изучили деструкцию пестицида ДДТ в почве с автохтонными микроорганизмами и интродуцированным штаммом деструктором.

Анализ полученных данных показал, что под действием аборигенной микрофлоры и компонентов почвы происходит небольшая деструкция пестицида – 9 % от исходной концентрации. Наибольшая степень деструкции (58 %) отмечена в почве с интродуцированным штаммом деструктором. Применение биодеструктора в ремедиации почвенной системы оказалось более эффективней, чем в почве без внесения суспензии биодеструктора. Однако, для определения сроков жизнедеятельности в почве интродуцента было необходимо изучить динамику численности интродуцированного штамма. В связи с этим, на лабораторном этапе исследований была изучена возможность применения селективной среды М9 с пестицидом и ТТХ в качестве метода количественного контроля в почве ДДТ–деструкторов. В эксперименте сравнивали изменение численности штамма *Bacillus sp. 114* как в отсутствии, так и в присутствии аборигенной микрофлоры. Учет численности деструкторов пестицида ДДТ в почве выявил, что в течение 30 дней не происходит размножение культур деструкторов среди аборигенной микрофлоры, их адаптация происходит очень медленно, а численность еле достигает 20 000 – 30 000 клеток в 1 г почвы. Таким образом, при загрязнении почвы ДДТ в дозе, равной 100 ПДК, аборигенная микрофлора в естественных условиях не способна к самоочищению.

Анализ численности внесенного в почву деструктора показал, что интродуцированный штамм активно размножается в загрязненной почве, выдерживает конкуренцию с аборигенной микрофлорой и сохраняет высокую численность (200 000 – 250 000 клеток в 1 г) на 30 сутки после внесения.

Таким образом, по результатам экспериментов, получен штамм бактерий *Bacillus sp.114*, который не обладает патогенными свойствами, способен подвергать деструкции пестицид ДДТ в почве и активно размножается в условиях конкуренции с почвенными бактериями.

## ВЫВОДЫ

1. Доказана способность использовать дихлордифенилтрихлорметилметан (ДДТ) в качестве единственного источника углерода штаммом бактерий *Bacillus sp. 114*.
2. Установлено, что в жидкой среде М9 с пестицидом в качестве единственного источника углерода штамм *Bacillus sp. 114* разлагает в течении 7 дней ДДТ в концентрации 10 мкг/мл.
3. Под действием аборигенной микрофлоры и компонентов почвы разлагается только 9 % пестицида. Наибольшая степень деструкции (58 %) отмечена в почве с интродуцированным штаммом деструктором *Bacillus sp. 114*.
4. Анализ численности внесенного в почву деструктора показал, что интродуцированный штамм активно размножается в загрязненной почве, выдерживает конкуренцию с аборигенной микрофлорой и сохраняет высокую численность (200 000 – 250 000 клеток в 1 г) на 30 сутки после внесения.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Сметник, А.А. Прогнозирование миграции пестицидов в почве: диссертация ... доктора биологических наук: 06.01.11; 03.00.27. М: 1999. 389 с.
2. Путилина, В.С. Миграция загрязняющих органических соединений в подземные воды / В.С. Путилина, Геозкология, инженерная геология, гидрогеология, геокриология. 2003. №4. С. 309-317.
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Н.С. Егоров М.: МГУ. 1995. 222 с.
4. Петерсон, А.М. Практические рекомендации для идентификации сапрофитных и условно-патогенных бактерий по фенотипическим признакам: для студ. биол. фак-та / А.М. Петерсон, П.А. Чиров Саратов: Изд-во ун-та. 2005. 20 с.
5. Способ выявления микроорганизмов – деструкторов ксенобиотиков / Т.А. Гранатская [и др.] // Патент Российской Федерации № 2051961, кл С12N1/20. 1996.
6. Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов [и др.] М.: Издательский центр «Академия». 2005. 608 с.
7. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта [и др.] // М.: Мир. 1997. Т. 2. 1232 с.
8. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria / G. M. Garrity, D.J. Brenner, N.R. Krieg et al. // New York: Springer. 2005. Vol. 2. 1388 p.
9. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes / P. De Vos, G. Garrity, D. Jones et al. // New York: Springer. 2009. Vol. 3.

