

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

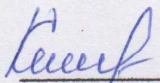
**ДЕСТРУКЦИЯ ПЕСТИЦИДА ДДТ МИКРООРГАНИЗМАМИ В
МИКРОПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

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

Научный руководитель:

к.б.н., доцент

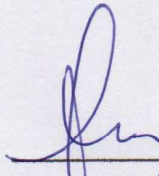
 19.06.18

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	$(4,0 \pm 0,2) \cdot 10^8$	$(3,7 \pm 0,4) \cdot 10^6$
Азотфиксирующие бактерии	$(3,8 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^5$
Плесневые грибы	$(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^3$	$(12,7 \pm 1,1) \cdot 10^3$

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).

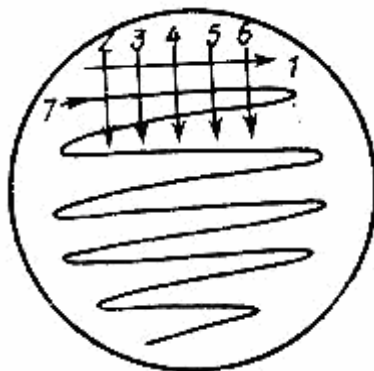


Рисунок 1 – Пример метода штриха с обжигом петли

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	++	++	-
<i>Bacillus sp.</i> 114	++	++	+
<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.

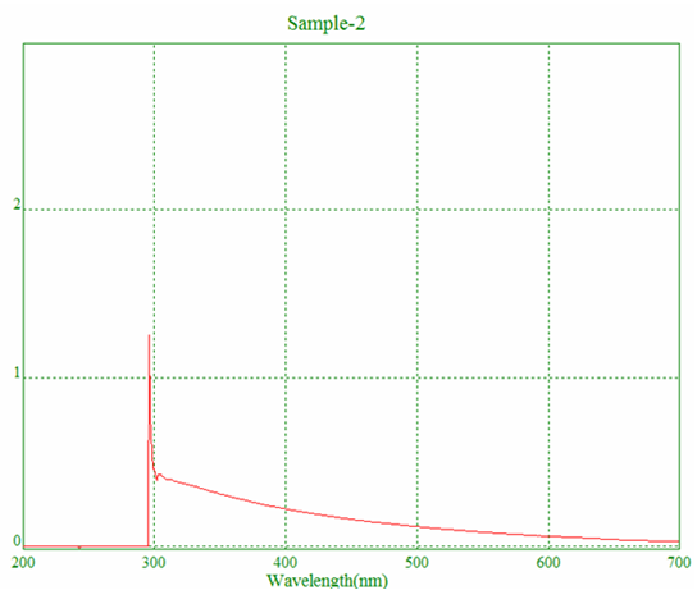
Таблица 3 – Анализ патогенных свойств штаммов деструкторов

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.

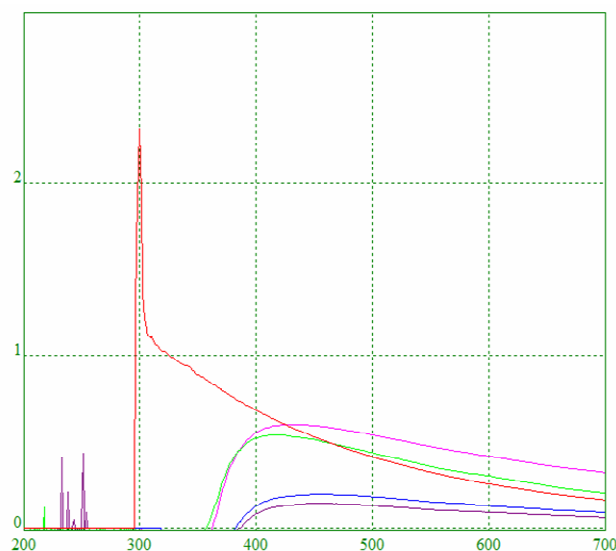


1-7 день

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	9
Почва + пестицид + деструктор	10,0±1,5	8,7±0,1	7,2±0,4	6,5±0,4	4,2±0,3	58

$P < 0,05$

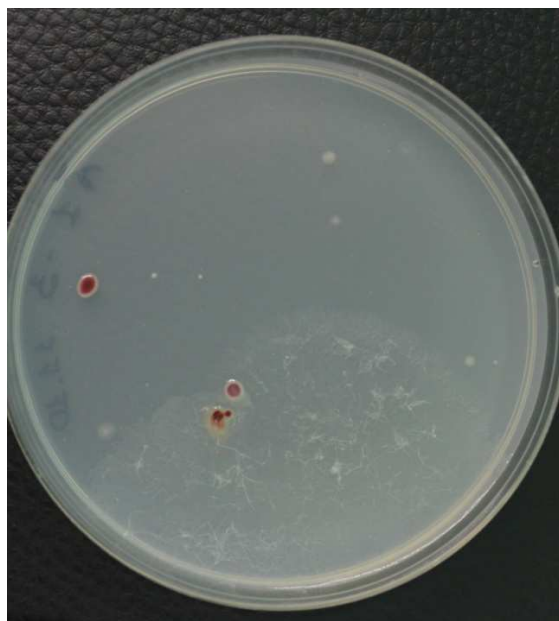
Анализ полученных данных показал, что под действием аборигенной микрофлоры и компонентов почвы происходит небольшая деструкция пестицида – 9 % от начальной концентрации. Наибольшая степень деструкции (58 %) отмечена в почве с интродуцированным штаммом деструктором.

*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

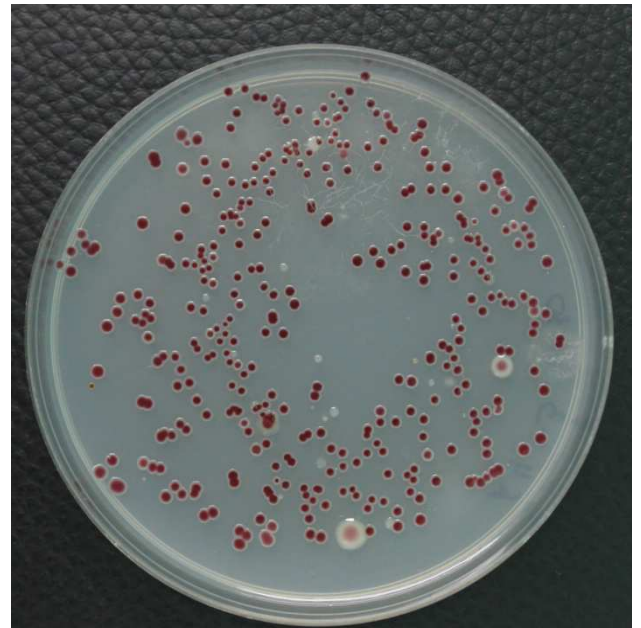
Рисунок 4 – Колонии штаммов деструкторов среди аборигенной микрофлоры на чашках со средой М9 с ТТХ, посев 0,1 мл почвенного разведения 10^{-3}

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.

