



УДК: 579.26.(579.24.579.8.06)

Дина БАЗАРБАЕВА,

Самостоятельный соискатель Каракалпакского научно-исследовательского института естественных наук Каракалпакского отделения Академии наук РУз
E-mail: dbazarbaeva@mail.ru

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРИРОДНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ - ДЕСТРУКТОРОВ ХЛОРООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Abstract

Bacterial strains were screened, which isolated from soils contaminated with organochlorine pesticides. Identified bacterial strains capable of growing on a mineral medium with the γ -isomer of hexachlorocyclohexane and dichlorodiphenyl trichloroethane as the sole carbon source. Studied the destructive properties of the isolated bacterial strains. Effective destructive bacteria that decompose the organochlorine pesticide hexachlorocyclohexane were selected and their taxonomic affiliation was determined.

Keywords: pesticides, bacteria, hexachlorocyclohexane, lindane, dichlorodiphenyltrichloroethane, destruction.

Аннотация

Хлорорганик пестицидлар билан ифлосланган тупроқлардан ажратилган бактерия штамлари скрининг қилинди. Бактерия штамларининг ягона углерод манбаи сифатида гексахлорциклогексани ва дихлордифенилтрихлорэтаном γ -изомери билан минерал озиқа муҳитида ўсиши аниқланди. Ажратилган бактерия штамларининг деструкциялаш хусусияти ўрганилди. Хлорорганик пестицидлар - гексахлорциклогексанни парчалайдиган самарали деструктор-бактериялар танлаб олинди ва уларнинг таксономик мансублиги аниқланди.

Калит сўзлар: пестицидлар, бактериялар, гексахлорциклогексан, линдан, дихлордифенилтрихлорэтан, деструкция.

Аннотация

Проведен скрининг штаммов бактерий, выделенных из загрязненных хлорорганическими пестицидами почв. Выявлены штаммы бактерий, способные к росту на минеральной среде с γ -изомером гексахлорциклогексана и дихлордифенилтрихлорэтаном в качестве единственного источника углерода. Изучены деструктивные свойства выделенных штаммов бактерий. Отобраны эффективные бактерий-деструкторы, разлагающие хлорорганический пестицид – гексахлорциклогексан и определена их таксономическая принадлежность.

Ключевые слова: пестициды, бактерии, гексахлорциклогексан, линдан, дихлордифенилтрихлорэтан, деструкция.

Введение. Одной из серьезных современных экологических проблем является загрязнение природных объектов пестицидами, в том числе хлорорганическими, обладающими высокой токсичностью и персистентностью. Пестициды ухудшают качество почв, оказывают пагубное действие на живые организмы, в первую очередь на микроорганизмы, которые участвуют в почвообразовательных процессах. Самоочищение почвы от пестицидов происходит в результате химических, физических и биологических процессов (Головлева, Финкельштейн, 1984). В последние годы в мировой литературе и практике микробиологическая деградация стойких соединений признается одной из самых перспективных (Боронин А.М., 1999; Магофонова Г.Г., Батаева В.Б., 2006; Domsh K.N., 1999). Преимущество использования микробиологических методов деструкции пестицидов объясняется тем, что микроорганизмы минерализуют пестициды и продукты их метаболизма в естественном цикле круговорота веществ. Многочисленные формы микроорганизмов обладают способностью использовать загрязнители в конструктивном и энергетическом метаболизме клетки (Решетов, Тугаева, 2012). В результате обменных процессов происходит не только очистка почвы от ксенобиотиков, но и повышение плодородия почвы, восстановление ее основных функций (Мотузова, Безуглова, 2007).

Многие исследователи (Головлева Л.А., 1983; Мильто и др., 1984) утверждают, что не имеется таких форм органических природных и искусственных соединений, которые не могли бы использоваться в качестве источников питания для определенных форм микроорганизмов.

Наиболее распространенный метод ремедиации загрязненных пестицидами почв заключается в подборе культуры микроорганизма-деструктора, накоплении биомассы и смешивании с почвой в местах

наличия ксенобиотиков. Однако их эффективность не всегда бывает одинаково высока, поскольку многие культуры “работают” лишь в относительно узком диапазоне условий. Кроме того иногда происходит вырождение микроорганизмов до достижения необходимого уровня очистки. Их применение может нарушить естественные биоценозы. Обычно для очистки используют бактерии *Bacterium*, *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Sphingomonas*, *Desulfotomaculum*, *Pseudomonas*, *Hydromonas*, *Bacillus* и другие (Лисина Т.О и др., 2001; Lopez L. et al, 2005).

На территории Республики Каракалпакстан по сей день сохраняется большое количество запрещенных к использованию пестицидов. Они сконцентрированы на территории бывших сельхозаэродромов, складов для хранения пестицидов и на ядомогильниках. Особое беспокойство вызывают особо опасные хлорорганические пестициды - гексахлорциклогексан (ГХЦГ) и дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ), обладающие стойкостью, кумулятивностью и токсичностью. Остатки пестицидов, аккумулярованные в одном месте в больших количествах, представляют серьезную угрозу для окружающей среды и живых организмов, так как имеет место их выноса за пределы данной территории. К сожалению, в республике в настоящий момент нет эффективных технологий для очистки почвы с высоким уровнем загрязняющих веществ. В связи с этим утилизация хлорорганических препаратов в наиболее загрязненных природных объектов является важной задачей региона.

В настоящее время для решения данной проблемы наибольший интерес представляют микробиологические способы деструкции. Многими учеными выделены различные микроорганизмы (бактерии, водоросли, микроскопические грибы), разлагающие пестициды до не токсичных соединений. Однако экстремальное условие Каракалпакстана, как высокая засоленность и инсоляция, большая сухость, малогумусированность почв затрудняет процесс очищения выделенными микроорганизмами-деструкторами. Для этой цели целесообразно использовать естественную микрофлору, адаптированную к условиям изучаемого региона, увеличивающую их приживаемость в экстремальной зоне и эффективность в деструкции пестицидов.

Цель данной работы - выделение наиболее перспективных штаммов бактерий, способных активно деградировать хлорорганические пестициды ГХЦГ и ДДТ.

Основная часть. В качестве объекта исследования выбран модельный участок, расположенный в поселке Кызылуй Кегейлийского района Республики Каракалпакстан. Модельный участок включает бывшую площадку для складирования пестицидов и близлежащие окультуренные поля. Поиск бактерий-деструкторов проводился в засоленной почве, длительное время контаминированной хлорорганическими пестицидами. Путем прямого посева почвенную суспензию засекали на мясо-пептонный агар с техническим ГХЦГ в количестве 100 мг/л. В результате опыта было выделено 130 аборигенных культур микроорганизмов, которые отличались друг от друга по комплексу культуральных признаков. Далее посевом на мясо-пептонный агар, содержащий технический ГХЦГ в концентрации 500, 750 и 1000 мг/л, было отобрано 10 штаммов бактерий, которые были условно обозначены порядковым номером от 1 до 10.

Хроматографический анализ изучения содержания пестицидов в воде, почвах, пыли и донных отложениях модельного участка выявил преобладание хлорорганических соединений, основу которых составляли ГХЦГ и ДДТ и их производные. В связи с этим были определены способность отобранных чистых культур бактерий усваивать близкие по химической структуре соединения, а именно ГХЦГ и ДДТ. Для этого опытные культуры были высеваны на твердую минеральную среду М-9 и в качестве единственного источника углерода в одном варианте был добавлен ГХЦГ и в другом - ДДТ в концентрации 20 мкг/мл.

Результаты опыта показали, что на синтетической среде с ГХЦГ уже на третьи сутки после посева отмечался рост штаммов №2, 7 и 9, а в случае с ДДТ - штаммов №5, 6 и 7. На пятые сутки наблюдался рост штаммов №3, 4, 5, 6, 8 и 10 на среде с ГХЦГ и штаммов №3 и 4 на среде с ДДТ. На седьмые сутки культивирования выявлен рост штаммов №2 и 10. В течение эксперимента не был зафиксирован рост штаммов №1, 8 и 9 на синтетической среде с ДДТ и штамма №1 на среде с ГХЦГ. Таким образом, семь из десяти отобранных штаммов способны усваивать и ГХЦГ, и ДДТ на синтетической среде без дополнительного органического субстрата.

В следующей серии опытов изучали деструктивную активность выделенных в чистой культуре бактерий, растущих на среде в присутствии линдана. Способность монокультуры бактерий деградировать γ -изомер ГХЦГ проводили на газовом хроматографе.

Результаты хроматограммы показали, что в течение 30 дней процесс деструкции культурами бактерий протекал с различной скоростью. За один месяц из десяти испытуемых культур только четыре вызвали активную деструкцию линдана в питательной среде. Уже к концу первого месяца наблюдался полная деструкция пестицида культурой №4, 5, 7 и 10. Деструктивная активность остальных культур (№1, 2, 3, 6, 8 и 9) была невысокой, так как за данный промежуток времени отмечено весьма незначительное снижение концентрации линдана (на 5-10 %).

Таким образом, хроматографический анализ дает основание считать, что культуры почвенных бактерий №4, 5, 7 и 10 обладают высокой γ -ГХЦГ- деструктивной активностью и способны деградировать линдан в питательной среде в течение одного месяца.

Наряду с работами по деструкции γ – изомера ГХЦГ с чистыми культурами, было проведено исследование по деструкции γ -ГХЦГ сообществом исследуемых культур №4, 5, 7 и 10. Для проведения опыта был использован современный метод, который дает возможность оценить распределение радиоактивной метки между культуральной жидкостью и клетками бактерий. Контрольным образцом служила стерильная среда.

Полученные данные показали, что к концу 12 дня инкубации наблюдалось снижение исходной концентрации меченого тритием линдана с 100 мкг до 45,55 мкг. Из них 26,78% радиоактивной метки находилось в бактериальных клетках, что показывает частичную сорбцию поверхностными структурами клеток исследуемых культур. Присутствие большей части тритиевой метки - 73,22% в супернатанте позволило сделать вывод о том, что деструкция линдана в основном происходила внеклеточным путем. В то время в контрольном варианте убыль радиоактивной метки не наблюдалась, о чем свидетельствовало 100% обнаружение радиоактивности в культуральной жидкости. Таким образом, высокой деструктивной активностью по отношению к γ – изомеру ГХЦГ обладают не только монокультуры исследуемых бактерий, но их консорциум.

Полученные результаты исследований позволили отобрать наиболее активные культуры, перспективные для проведения дальнейших исследований. Впоследствии все четыре активные культуры-деструкторы были выбраны для определения видовой принадлежности.

Определение видовой принадлежности бактерий-деструкторов. Для дальнейших исследований были отобраны культуры бактерий-деструкторы № 4, 5, 7 и 10. Идентификацию исследуемых бактерий проводили на основании изучения их культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств.

Культура № 4. Штамм представляет собой грамположительные прямые палочки, расположенные в основном попарно. Штамм при культивировании на МПА в аэробных условиях образовывал круглые колонии, 4-5 мм в диаметре с изрезанным краем, матовые, плоские, складчатые, сухие с морщинистой поверхностью. На МПБ культура образует однородную муть, образуя на поверхности среды тонкую складчато-бугристую грязно-белую пленку. Образует споры, подвижные, размер клеток под микроскопом 0,8-1,0×5-6 мкм с закругленными концами. По физиолого-биохимическим свойствам культура является оксидазоотрицательной, каталазоположительной, галотолерантной. Гидролизует крахмал, разжижает желатин, разлагает казеин, реакция на Фогес-Проскауэра положительная, образует сероводород, индол и аммиак, образует кислоту из глюкозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, маннозы, арабинозы, рафинозы, трегалозы, дульцита.

Культура № 5. В мазках грамположительные, изогнутые палочки, расположенные в основном поодиночке, но имеются и парные. На мясо-пептонном агаре в аэробных условиях образуют мелкоморщинистые, плоские, сухие, круглые, матовые, грязно-белого цвета колонии диаметром 6-8 мм, имеют однородную структуру. Длина клеток под микроскопом 3-5 мкм, ширина 0,7-0,8 мкм, с закругленными концами. Подвижные, образуют споры. Клетки в основном одиночные, но встречаются и парные. Через 4-5 дней культивирования на твердой среде центральная часть колонии сморщивается. На МПБ рост в виде равномерного помутнения с образованием складчатой тонкой пленки. По физиолого-биохимическим свойствам культура является аэробной, оксидазоположительной, крахмал не гидролизует, разлагает казеин, желатин разжижает, реакция на Фогес-Проскауэра и тест на оксидазу положительная, обладает каталазной активностью, выделяет индол и аммиак, особенно сильно выделяет сероводород. Кислотообразование наблюдается при посеве на среду с глюкозой, сахарозой, лактозой, маннозой, трегалозой, дульцитом, арабинозой, не образует кислоты из мальтозы, рафинозы.

Культура № 7. Грамположительные прямые палочки. Колонии на МПА крупные размером 4-5 мм, сухие, грязно-белого цвета, сухие, поверхность мелкоморщинистая, форма колонии - неправильная, структура – однородная, профиль - плоский, края - волнистые, консистенция - маслянистая. Рост на МПБ показал равномерную муть с образованием тонкой пленки грязно-белого цвета. Размер клеток под микроскопом 0,7-0,8×3-5 мкм. Подвижные, образует споры. Одиночно расположенные клетки. По физиолого-биохимическим свойствам культура является аэробной, не гидролизует крахмал, разлагает казеин, разжижает желатин, реакция на Фогес-Проскауэра положительная, обладает каталазной активностью, выделяет индол, сероводород и аммиак, тест на оксидазу отрицательная, образует кислоты из глюкозы, сахарозы, лактозы, маннозы, рафинозы, арабинозы, дульцита, не использует трегалозы.

Культура № 10. Грамположительные кокки. На МПА колонии мелкие 3-4 мм, края ровные, колоний - блестящие, влажные, профиль - выпуклый, поверхность - гладкая. Колонии окрашены в красно-оранжевый цвет. Образующийся пигмент в субстрат не выделяется. Под микроскопом диаметр клеток около 1 мкм, в основном расположены попарно. По физиолого-биохимическим свойствам культура является аэробной, не гидролизует крахмал, казеин не разлагает, желатин разжижает, не выделяет индол, сероводород, аммиак, реакция на Фогес-Проскауэра отрицательная, не обладает каталазной активностью, тест на оксидазу положительная, образует кислоту из лактозы, арабинозы, трегалозы, рафинозы, дульцита, не образует кислоту из маннозы, глюкозы

Таким, образом, на основании изучения культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков культуры № 4, 5 и 7 отнесены к роду *Bacillus*, виду *Bacillus subtilis*, культура №10 – к роду *Micrococcus*, виду *Micrococcus roseus*.

Заключение. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что из загрязненного пестицидами почв выделены и идентифицированы штаммы бактерий, способные использовать хлорорганические пестициды ГХЦГ и ДДТ в качестве единственного источника углерода и обладающие высокой деструктивной активностью к γ -изомеру ГХЦГ как монокультурами, так и в ассоциации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бородин А.М. Микроорганизмы для биоремедиации // Проблемы медицины и экологической биотехнологии: Материалы Юбилейной научной конференции, посвященной 25-летию ГНЦ ПМ. - Оболенск, 1999. – С.23-29.
2. Головлева Л.А. Метаболизм и деградация пестицидов и ксенобиотиков // Ж. Агрехимия. - 1983. - №6. - С.123-132.
3. Головлева Л.А., Финкельштейн З.И. Условия деградации пестицидов // Ж. Агрехимия. – 1984. - №3. – С.105-120.
4. Лисина Т.О., Гаранькина Н.Г., Круглов Ю.В. Влияние интродуцируемых в почву микроорганизмов-деструкторов пестицидов на рост и развитие растений // Ж. Прикладной биохимия и микробиологии. – 2001. – т.37. - №3. – С.374-378.
5. Матофонова Г.Г., Батаева В.Б. Методы деградации галогенсодержащих пестицидов // Вестник Бурят. ун-та. – 2006. - №3. – С.85-97.
6. Мильто Н.И., Карбанович А.И., Ворочаева В.Т., Стефанович Л.И. Действие пестицидов и микроэлементов на почвенную микрофлору и ее взаимоотношения с бобовыми растениями / В кн.: Роль микрофлоры в защите почвы от агропроизводственных значений. - Минск: Наука и техника, 1984. – С.76-89.
7. Мотузова Г.В., Безуглова О.С. Экологический мониторинг почв. М.: Академический проект; Гаудеамус, 2007.
8. Решетов Г.Г., Тугаева Т.А. Эффективность метода микробной деструкции пестицида тетраметилтиурамдисульфида//Вестник Саратовского гос. социального университета. – 2012. -5(44). – P.220-223.
9. Domsh K.N. Principles of pesticide-microbe interaction in soil // Soil Biol. and Coserv. Biosphere. Budapest, 1999. – Vol.1.- P.179-184.
10. Lopez L., Pozo C., Roddas B., Calvo C., Juarez B. Identification of bacteria isolated from an oligotrophic lake with pesticide removal capacities // Ecotoxicology. – 2005. – 14, №3. – P.299-312.