



– ассортимент видов, используемых в озеленении города, трансформируется; вместо вяза приземистого, клена ясенелистного и ясеня ланцетного чаще используются каштан конский обыкновенный, клен остролистный, катальпа бигнониевидная, липа крупнолистная;

– жизненное состояние большей части древесных растений (68,7%) характеризуется как «здоровое», количество ослабленных и сильно ослабленных деревьев составляет 27,1%, к категории усыхающих и сухостойных относится 4,2%;

– лучшее состояние на всех обследованных объектах отмечается у тополя пирамидального и каштана конского, индекс жизненного состояния изменяется от 1,0 до 1,5;

– в сильно ослабленном состоянии находятся ель европейская и ель колючая, расположенные на улице Астраханской; индекс жизненного состояния составляет 3,44 и 2,56.

#### Список литературы

1. Видякина А. А., Семенова М. В. Древесные растения в озеленении г. Тюмени // Аграрная Россия. М. : Фолиум, 2009. С. 54–55.
2. Гуненко Т. Г., Ганжа М. Т., Котова И. Ю., Шаропова Э. П. Декоративное садоводство и садово-

парковое строительство : справ. пособие. Киев : Будивельник, 1985. 182 с.

3. Заигралова Г. Н. Состояние и перспективы использования хвойных древесных растений в озеленении г. Саратова // Вестн. Сарат. гос. аграр. ун-та. 2013. № 6. С. 50–53.
4. Черепанов С. К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). СПб. : Мир и семья-95, 1995. 510 с.
5. Макаров В. З. Ландшафтно-экологический анализ крупного промышленного города. Саратов : Изд-во Сарат. ун-та, 2001. 176 с.
6. Министерство природных ресурсов Российской Федерации : об утверждении санитарных правил в лесах [Утверждено Приказом МПР РФ от 27 декабря 2005 г. № 350]. М., 2005.
7. Шмидт В. М. Математические методы в ботанике : учеб. пособие. Л. : Изд-во Ленингр. ун-та, 1984. 288 с.
8. Миловидова И. Б., Таренков В. А. Деревья и кустарники зеленых насаждений г. Саратова // Материалы по флоре и растительности Юго-Востока. Саратов : Изд-во Сарат. ун-та, 1968. С. 17–29.
9. Филатов В. Н., Сазонова Е. С. О годичных приростах боковых побегов у елей колючей и обыкновенной в зонах разного загрязнения атмосферного воздуха // Материалы Первых науч. чтений, посвящ. 110-летию со дня рождения Т. Б. Дубяго. СПб. : Изд-во Политехн. ин-та, 2010. С. 65–70.

УДК 579. 017.8; 574.24

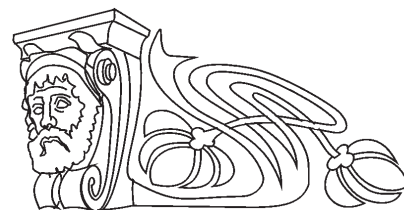
## ПОИСК ШТАММОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ПЕСТИЦИДОВ ПРОМЕТРИНА, ГХЦГ И 4,4-ДДТ В ПОЧВЕ ТЕРРИТОРИИ ЗАХОРОНЕНИЯ ПЕСТИЦИДОВ В САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Е. В. Васнецова, О. Ю. Ксенофонтова, Д. А. Тихонова,  
Е. А. Филимонова, К. В. Савина

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского  
E-mail: ksenofontova64@mail.ru

Проведено микробиологическое исследование почвы с места захоронения пестицидов в Саратовской области и определены доминирующие популяции микроорганизмов. Анализ численности микроорганизмов показал, что доминирующей группой в почве явились гетеротрофные бактерии, а наиболее чувствительными – плесневые грибы. Выделены эффективные микроорганизмы-деструкторы, разрушающие пестициды прометрин, гексахлорциклогексан (ГХЦГ) и дихлордифенилтрихлорметилметан(4,4-ДДТ). Штаммы *Pseudomonas putida* П2, *P. putida* П6, *P. putida* 8.3.2 и *Jonesia denitrificans* 151 в течение семи дней способны трансформировать от 60 до 90% пестицидов.

**Ключевые слова:** микроорганизмы-деструкторы, *Pseudomonas putida*, трансформация пестицидов, прометрин, гексахлорциклогексан (ГХЦГ), дихлордифенилтрихлорметилметан(4,4-ДДТ).



### Search of Bacteria Destroyers of Pesticides Prometrin, Hexachlorocyclohexane (HCH), Dihlordifeniltrihlormetilmetan (4,4-DDT) in Soil with Pesticides Burial Places in the Saratov Region

Е. В. Vasnetsova, О. Y. Ksenofontova, Д. А. Tikhonova,  
Е. А. Filimonova, К. V. Savina

A microbiological study of soil with pesticides burial places in the Saratov region and identified the dominant microbial populations. The number of microorganisms analysis determined that the dominant group in the soil were heterotrophic bacteria and most sensitive – microscopic fungi. Obtained destructors effective microorganisms that break down pesticides prometrin, hexachlorocyclohexane and dihlordifeniltrihlormetilmetan (4,4-DDT). Strains of *Pseudomonas putida* P2, *P. putida* P6, *P. putida* 8.3.2 and *Jonesia denitrificans* 151 for seven days able to transform from 60 to 90% of the pesticides.



**Key words:** bacteria destructors, *Pseudomonas putida*, transformation of pesticides prometrin, hexachlorocyclohexane (HCH), dihalordifeniltrihlormetilmetan (4,4-DDT).

DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-3-349-354

Изучение состава микробоценозов загрязненных почв, а также почв с территории захоронения ядохимикатов представляет значительный научный интерес как для мониторинга окружающей среды, так и для выделения микроорганизмов, устойчивых к высоким дозам токсикантов.

Для различных видов загрязнений почв используют соответствующие специфичные штаммы-деструкторы. Доказано, что выделение микроорганизмов, устойчивых к ксенобиотикам, целесообразно проводить из почвы, длительно содержащей высокие концентрации ксенобиотиков [1]. Причем для каждого типа почвы свойственны определенные штаммы-деструкторы, желательны из представителей аборигенной микрофлоры. При использовании метода внесения деструктор-аборигенов непосредственно с зараженной территории выделяют наиболее активные штаммы из сообщества естественной микрофлоры, подбирают оптимальные условия культивирования, производят биомассу и вносят ее в загрязненную среду с последующей активизацией стандартными агротехническими приемами [2]. На настоящий момент выделено и депонировано большое количество штаммов-деструкторов как в виде монокультур, так и в консорциумах [3]. Однако практически нет препаратов, предназначенных для деструкции сразу нескольких видов пестицидов.

В связи с вышесказанным целью работы явилось микробиологическое исследование почвы с места захоронения пестицидов и поиск эффективных микроорганизмов-деструкторов прометрина (метилтио-4,6-бис(изопропиламино)-симм-триазин), ГХЦГ (гексахлорциклогексан) и 4,4-ДДТ (дихлордифенилтрихлорметилметан).

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1) изучить микробиологический состав почвы с мест захоронения пестицидов и фоновой территории в Краснопартизанском и Советском районах Саратовской области;

2) определить доминирующие популяции микроорганизмов в почве;

3) выделить чистые культуры микроорганизмов доминирующих популяций;

4) отобрать штаммы деструкторов, использующие пестициды прометрин, ГХЦГ и 4,4-ДДТ в качестве единственного органического источника углерода;

5) изучить морфологические, культуральные и биохимические свойства штаммов-деструкторов с целью идентификации;

6) определить антагонистические взаимоотношения штаммов-деструкторов по отношению друг к другу с целью совместного культивирования и создания комплексного биопрепарата;

7) определить деструктивный потенциал культур и отобрать наиболее перспективные штаммы для создания биопрепаратов, предназначенных для очистки почв от пестицидов прометрина, ГХЦГ и 4,4-ДДТ.

Материалом исследований явилась почва с места захоронения пестицидов и фоновой территории (на расстоянии 1 км от места захоронения) в Советском и Краснопартизанском районах Саратовской области. Почва для исследований была предоставлена специалистами Управления Россельхознадзора по Саратовской области. На данной территории произведено захоронение симтриазиновых и хлорорганических пестицидов. По данным ежегодного мониторинга, в 2014 г. было установлено превышение ПДК таких пестицидов, как прометрин, ГХЦГ и ДДТ. Это и обусловило поиск микроорганизмов-деструкторов именно этих пестицидов.

Характеристика пестицидов:

– прометрин – гербицид сим-триазинового ряда,  $C_{10}H_{19}N_5S$ , 2-метилтио-4,6-бис-(изопропиламино)-симм-триазин – производное циануровой кислоты (1,3,5-тригидрокси-симм-триазин), широко используется на территории Саратовской области, с 1992 г. им обрабатывается около 70% полей подсолнечника, моркови, кукурузы и картофеля. Коммерческие названия препаратов, с прометрином в качестве основного действующего вещества: «Гезагард», «Мерказин», «Прометрин», «Капарол», «Селектин», «Гексазол», «Зиразин» [4];

– 4,4-ДДТ (дихлордифенилтрихлорметилметан) – хлорорганический инсектицид, известен в разных странах под различными названиями – ДДТ, гезарол, гуезарол, неоцид, дикофан и др. Применялся от мух, комаров и саранчи. ДДТ получил широкое распространение в 1940–1970 гг. и стал самым известным и широко используемым химическим средством борьбы с насекомыми-вредителями. Ежегодно в течение трех десятилетий применение ДДТ во все возрастающих масштабах привело к значительному накоплению его во внешней среде, в почве, воде, растительных и животных организмах, в том числе и в организме человека. В настоящее время ДДТ запрещен для использования [5, 6];

– ГХЦГ (гексахлорциклогексан) – хлорорганический инсектицид, обладает высокой острой токсичностью в отношении теплокровных животных, не обладает канцерогенным действием. В настоящее время запрещен для использования [6].



В экспериментах использовали государственные стандартные образцы пестицидов прометрина, 4,4-ДДТ и ГХЦГ.

#### Методы исследований

Определение численности почвенных микроорганизмов необходимо для определения физиологических групп устойчивых к загрязнителю и для сравнения микробиологического состава микрофлоры почвы на месте захоронения (опытные образцы) и фоновой территории (контрольные образцы), удаленной на расстоянии 1 км.

Численность микроорганизмов в почве определяли методом последовательных разведений почвенной суспензии на плотных питательных средах [7]. Исследования почвенных проб были направлены на определение численности аммонифицирующих, целлюлозоразрушающих, азотфиксирующих бактерий, актиномицетов и плесневых грибов, так как именно эти группы обеспечивают самоочищающую способность почвы и участвуют в почвообразовательных процессах [8].

Плесневые грибы учитывали на агаризованной среде Чапека–Докса, аммонифицирующие бактерии выявляли на ГРМ-агаре, азотфиксирующие бактерии – на среде Эшби, аэробные целлюлозоразрушающие бактерии учитывали на плотной питательной среде Хетчинсона и Клейтона [9]. Культивирование посевов осуществляли в термостате при 28°C в течение 2 суток при выделении гетеротрофных бактерий, 5–7 суток при выделении актиномицетов, азотфиксирующих и плесневых грибов и 7–9 суток при выделении целлюлозоразрушающих бактерий. После инкубации посевов проводили количественный учет выросших колоний и определяли количество колониобразующих единиц (КОЕ) в 1 г почвы.

Важным условием для дальнейшей микробиологической работы являлось изолирование отдельных штаммов доминирующих популяций 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) [9]. Отдельные колонии проверяли на чистоту путем микроскопирования и отсеивали на скошенный питательный агар для культивирования.

При всем разнообразии микроорганизмов частота встречаемости отдельных штаммов деструкторов в почве относительно невелика. Адаптация происходит, как правило, очень медленно. Поэтому для поиска деструкторов

мы использовали штаммы из доминирующих популяций бактерий. Для этого производили посев всех выделенных штаммов на чашки Петри с агаризованной средой М9 [10] (состав, г/л:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 6,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3,0;  $\text{NaCl}$  – 0,5;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1,0; вода дистиллированная 1000 мл, 2% голодного агара) с пестицидом, к которому осуществляли поиск деструкторов в концентрации 100 ПДК, культивировали в течение 5 суток при 28 °С.

Так как в аэробных условиях первой стадией биodeградации ксенобиотиков являются реакции окислительного метаболизма, катализируемые различными оксидоредуктазами, основными из которых являются дегидрогеназы, то выявление именно этих ферментов у микроорганизмов свидетельствует о деструктивных возможностях культуры. Для обнаружения у бактерий дегидрогеназной активности использовали 5%-ный водный раствор 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ), который добавляли в среду М9. О способности микроорганизмов разрушать препарат свидетельствовало окрашивание колоний и среды вокруг них в красный цвет, что указывало на образование восстановленного трифенилформазана (ТФФ). По этому признаку отбирали штаммы-деструкторы [11].

Для характеристики и идентификации микроорганизмов-деструкторов проводили изучение культуральных, морфологических и биохимических признаков исследуемых штаммов [9]. Идентификацию выделенных деструкторов проводили по совокупности культуральных, морфологических, тинкториальных и биохимических признаков [12].

Для определения антагонистических свойств и биологической совместимости выделенных штаммов-деструкторов использовали принцип диффузии в агар продуктов метаболизма микроба при посеве перпендикулярными штрихами, методом лунок и дисков [7]. Использование данных методов позволило проверить чувствительность всех исследуемых штаммов-деструкторов друг к другу.

Изучение деструкции пестицидов проводили путем внесения чистых культур всех отобранных штаммов деструкторов в жидкую среду М9, содержащую пестицид в концентрации 100 ПДК. Посевная доза бактерий в 100 мл среды составляла 1 мл взвеси суточных культур, приготовленной по стандартам мутности БАК-10 (порядок =  $10^9$ ), что соответствовало  $10^9$  клеток в миллилитре физиологического раствора. Рост культуры контролировали на фотоэлектроколориметре КФК–2, измеряя оптическую плотность культуральной жидкости при длине волны  $\lambda = 600$  нм ( $\text{ОП}_{600}$ ) и длине кюветы  $l = 10$  мм. Концентрацию клеток



определяли по уравнению калибровочного графика зависимости ОП<sub>600</sub> от концентрации клеток в миллилитре. Концентрацию пестицида в среде культивирования деструкторов определяли по построенному калибровочному графику, отражающему зависимость оптической плотности от концентрации пестицидов. Для записи спектров использовали сканирующий спектрофотометр LEKI SS2109UV. Измерения проводили каждый день в течение 7 суток в диапазоне длин волн от 0 до 700 нм. Контролем служила среда М9 с пестицидом без микроорганизмов.

Статистическую обработку данных проводили с помощью встроенного статистического пакета Excel (MS Office 2007). Повторность всех экспериментов трехкратная.

**Результаты и их обсуждение**

Анализ микробиологического состава почвы с мест захоронения пестицидов показал, что в загрязненной почве увеличена численность аммонифицирующих бактерий и снижено количество плесневых грибов и аэробных целлюлозоразлагающих бактерий (табл. 1).

Таблица 1

**Численность почвенных микроорганизмов на территории захоронения пестицидов в Саратовской области**

| Физиологическая группа бактерий       | Численность микроорганизмов, КОЕ/г (M±m) |                          |   |                           |
|---------------------------------------|--|--------------------------|---|---------------------------|
|                                       | Загрязненная почва                       |                          | Фоновая территория (на расстоянии 1000 м) |                           |
|                                       | Краснопартизанский район                 | Советский район          | Краснопартизанский район                  | Советский район           |
| Аммонифицирующие бактерии             | 5,0*±0,6×10 <sup>6</sup>                 | 6,4*±0,6×10 <sup>6</sup> | 3,7*±0,4×10 <sup>6</sup>                  | 2,7*±0,4×10 <sup>6</sup>  |
| Азотфиксирующие бактерии              | 2,4±0,3×10 <sup>5</sup>                  | 2,6±0,2×10 <sup>5</sup>  | 1,1±0,2×10 <sup>5</sup>                   | 1,5±0,2×10 <sup>5</sup>   |
| Плесневые грибы                       | 1,9*±0,3×10 <sup>3</sup>                 | 2,9*±0,7×10 <sup>3</sup> | 12,7*±1,1×10 <sup>3</sup>                 | 16,2*±1,1×10 <sup>3</sup> |
| Актиномицеты                          | 2,1±0,4×10 <sup>3</sup>                  | 3,1±0,4×10 <sup>3</sup>  | 2,5±0,4×10 <sup>3</sup>                   | 3,5±0,4×10 <sup>3</sup>   |
| Аэробные целлюлозолитические бактерии | 1,2 ±0,2×10 <sup>3</sup>                 | 1,4 ±0,2×10 <sup>3</sup> | 1,5±0,2×10 <sup>3</sup>                   | 3,3±0,1×10 <sup>3</sup>   |

Примечание. \*P ≤ 0,05.

Количественные показатели азотфиксирующих бактерий и актиномицетов в загрязненной почве существенно не отличались от показателей фоновой территории. Таким образом, наличие в почве пестицидов как органического вещества стимулировало размножение аммонифицирующих бактерий. А снижение плесневых грибов может быть вызвано наличием в загрязненной почве хлорорганических пестицидов, ингибирующих их рост. Анализ численности микроорганизмов в загрязненной

почве определил, что доминирующей группой в загрязненной почве явились гетеротрофные бактерии. Поэтому поиск деструкторов проводили именно в этой группе.

В ходе работы было выделено 18 штаммов бактерий доминирующих популяций, содержащихся в почве в концентрации 10<sup>6</sup> КОЕ/г. Данные культуры были идентифицированы и изучены на возможность использовать пестициды в качестве единственного источника углерода. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

**Определение способности использовать пестициды в качестве единственного источника углерода в концентрации 200 мкг/мл в среде М9**

| Штамм бактерий   | Пестицид (название) |           |      |
|--|---------------------|-----------|------|
|  | Прометрин           | 4,4 - ДДТ | ГХЦГ |
| <i>Pseudomonas putida</i> П2                                     | +                   | +         | +    |
| <i>Pseudomonas putida</i> П6                                     | +                   | +         | +    |
| <i>Pseudomonas putida</i> 8.3.2                                  | +                   | +         | +    |
| <i>Jonesia denitrificans</i> 151                                 | +                   | +         | +    |
| <i>Amphibacillus xylanus</i> 150.2                               | -                   | +         | -    |
| <i>Amphibacillus xylanus</i> 152                                 | -                   | +         | -    |
| <i>Amphibacillus xylanus</i> 165                                 | -                   | +         | -    |
| <i>Amphibacillus xylanus</i> 181                                 | -                   | -         | -    |
| <i>Bacillus</i> sp. 154, 166, 179, 180, П3, П4, П5, П7, 82, 831, | -                   | -         | -    |



Из 18 видов доминирующих органотрофных бактерий 11 штаммов из родов *Bacillus* и *Amphibacillus* не использовали углерод из пестицидов. Штаммы *Amphibacillus xylanus* 150.2, *A. xylanus* 152, *A. xylanus* 165 проявили деструктивную активность только по отношению к 4,4-ДДТ, а штаммы *Pseudomonas putida* П2, *P. putida* П6, *P. putida* 8.3.2 и *Jonesia denitrificans* 151 использовали углерод из всех изученных пестицидов.

Изучение антагонистических свойств у данных штаммов не выявило ингибирующих свойств по отношению друг к другу. Это позволяет осуществлять их совместное культивирование и использовать их в консорциуме при создании биопрепарата.

Для подтверждения деструкции пестицидов бактериями нами изучены спектры ГСО пестицидов в среде М9 в течение 7 дней и обнаружены пики в области 300 нм, которые не подвергались изменениям. При добавлении микроорганизмов в среду наблюдение вели именно за этими пиками.

В дальнейшем нами была изучена деструкция пестицидов созданным нами консорциумом бактерий, состоящим из штаммов *Pseudomonas putida* П2, *P. putida* П6, *P. putida* 8.3.2 и *Jonesia denitrificans* 151. Анализ полученных спектрограмм показал, что все исследуемые пестициды подвергаются деструкции штаммами бактерий (рис. 1–3).

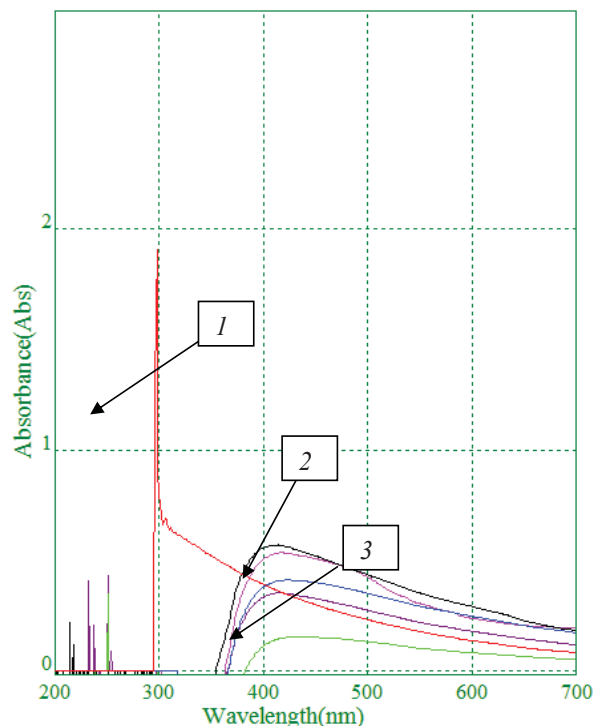


Рис. 2. Спектрофотометрический анализ деструкции 200 мкг/мл (100 ПДК) 4,4-ДДТ штаммами *Pseudomonas putida* П2, *P. putida* П6, *P. putida* 8.3.2 и *Jonesia denitrificans* 151 в жидкой среде М9 (1 – 1-й день, 2 – 3-й день, 3 – 7-й день)

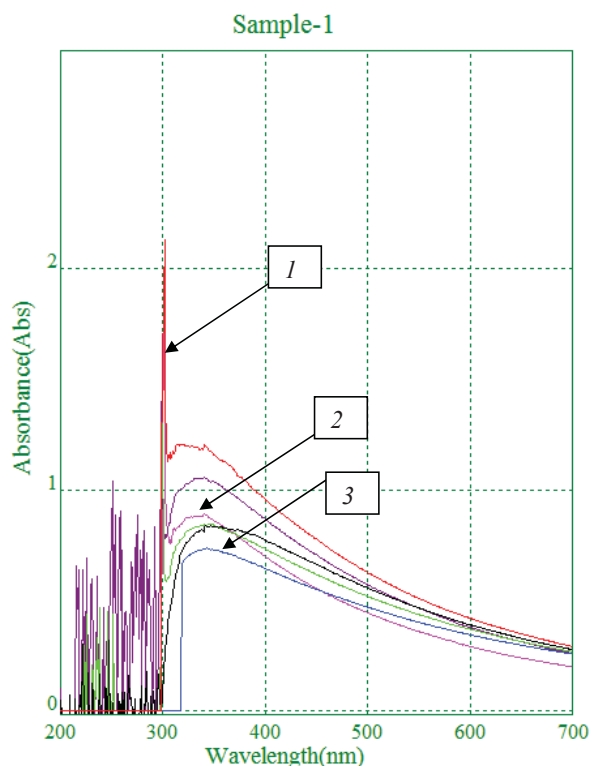


Рис. 1. Спектрофотометрический анализ деструкции 250 мкг/мл (100 ПДК) ГХЦГ штаммами *Pseudomonas putida* П2, *P. putida* П6, *P. putida* 8.3.2 и *Jonesia denitrificans* 151 в жидкой среде М9 (1 – 1-й день, 2 – 3-й день, 3 – 7-й день)

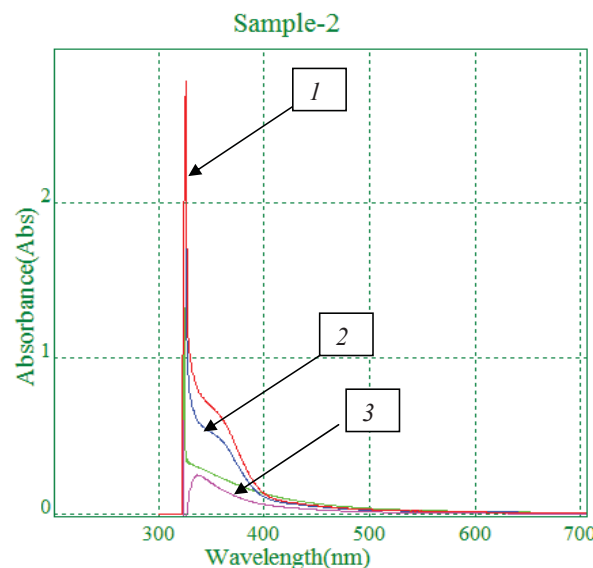


Рис. 3. Спектрофотометрический анализ деструкции 250 мкг/мл прометрина штаммами *Pseudomonas putida* П2, *P. putida* П6, *P. putida* 8.3.2 и *Jonesia denitrificans* 151 в жидкой среде М9 (1 – 1-й день, 2 – 3-й день, 3 – 7-й день)

Согласно калибровочным графикам пестицидов в среде с микроорганизмами отмечено снижение концентрации ГХЦГ с 250 до 86 мкг/мл. Таким образом, за 7 дней разрушается 164 мкг/мл, что составляет 66% препарата. В среде с 4,4-ДДТ на



3-й день отмечено образование промежуточного продукта с пиком поглощения в области 400 нм, который также подвергается разрушению консорциумом бактерий на 7-й день. В среде М9 с прометрином отмечено снижение концентрации с 250 до 18 мкг/мл. Следовательно, деструкции подвергается около 93% препарата.

Таким образом, штаммы *Pseudomonas putida* П2, *P. putida* П6, *P. putida* 8.3.2. и *Jonesia denitrificans* 151, выделенные с места захоронения пестицидов, обладают высокой деструкционной активностью по отношению к ГХЦГ, 4,4-ДДТ и прометрину. В течение 7 дней происходит разрушение от 60 до 90% препаратов. Данные штаммы могут быть рекомендованы для создания комплексного препарата, предназначенного для очистки земель, загрязненных триазинами и хлорорганическими пестицидами.

#### Список литературы

1. Колесников С. И., Казеев К. Ш., Вальков В. Ф. Биоэкологические принципы мониторинга и нормирования загрязнения почв. Ростов н/Д : Изд-во ЦВВР, 2001. 65 с.
2. Вельков В. В. Стандартизация формата описаний промышленных технологий биоремедиации // Биотехнология. 2001. № 2. С. 70–76.
3. Колупаев А. В. Почвенные микроорганизмы–биодеструкторы органических пестицидов : автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2010. 21 с.
4. Горбатова О. Н., Жердев А. В., Королева О. В. Триазинные пестициды : структура, действие на живые организмы, процессы деградации // Успехи биологической химии. 2006. Т. 46, № 2. С. 323–348.
5. Богуславская Н. В. Динамика ДДТ и его метаболитов в агроландшафте по сезонам года // Экологическая безопасность в АПК. Реферат. журн. М. : Изд-во Центр. науч. с/х библи., 2009. № 3. С. 693.
6. Мельников Н. Н. Пестициды. Химия, технология и применение. М. : Химия, 1987. 658 с.
7. Егоров Н. С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М. : Изд-во МГУ, 1995. 222 с.
8. Звягинцев Д. Г., Бабьева И. П., Зенова Г. М. Биология почв. М. : Изд-во МГУ, 2005. 445 с.
9. Большой практикум по микробиологии : учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / под ред. А. И. Нетрусова. М. : ИЦ «Академия», 2005. 608 с.
10. Маниатис Т. Молекулярное клонирование. М. : Мир, 1984. 477 с.
11. Пат. 2051961 Российская Федерация, С12N1/00, 1/14; С12Q1/00, 1/32. Способ выявления микроорганизмов – деструкторов ксенобиотиков / Гранатская Т. А.
12. Определитель бактерий Берджи : в 2 т. / пер. с англ.; под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. М. : Мир, 1997. 800 с.