O‘ZBEKISTON MILLIY UNIVERSITETI XABARLARI, 2023, [3/2/1]
ISSN 2181-7324

BIOLOGIYA
http://journals.nuu.uz
Natural sciences

УДК: 631.466.1

Диёрбек КОСИМОВ,
М.н.с. института Микробиологии АН РУз, PhD
Рустамбек ЭРГАШЕВ,
М.н.с. института Микробиологии АН РУз
Людмила ЗАЙНИТДИНОВА,
Д.б.н. проф., института Микробиологии АН РУз
E-mail: diyor-qosimov91@mail.ru

Под редакцией с.н.с. ЦПТ, PhD, Х.Сохибназаровой

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ В ПРОЦЕССЕ ДЕГРАДАЦИИ ЦИПЕРМЕТРИНА

Аннотация

Циперметрин – является синтетическим пиретроидным инсектицидом. Из почв искусственно загрязнённых циперметрином выделены 3 изолята, устойчивые к высоким концентрациям циперметрина, изучены их морфолого-культуральные и биохимические свойства. На основе полученных штаммов создан бактериальный консорциум, который состоит из культур *Pseudomonas sp., Bacillus sp.* и *Ochrobactrum sp.* Изучено разложение циперметрина на основе отдельного штамма (*Ochrobactrum sp.*) и бактериального консорциума. Полученные результаты показали полное разложение исходной концентрации циперметрина (40 мг/кг) в течение 28 дней.

Ключевые слова: биодеградация, бактериальный консорциум, *Pseudomonas, Ochrobactrum, Bacillus,* пестициды, циперметрин.

SIPERMETRIN PARCHALANISH JARAYONIDA DESTRUKTOR BAKTERIYALARDAN FOYDALANISH

Annotatsiya

Sipermetrin sintetik piretroid insektitsid hisoblanadi. Sipermetrin bilan sun’iy ravishda ifloslangan tuproqlardan yuqori konsentratsiyali sipermetringa chidamli uchta izolat ajratilib, ularning morfo-kultural va biokimyoviy xususiyatlari o‘rganildi. Olingan shtammlar asosida *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. va *Ochrobactrum* sp. kulturalaridan iborat bakterial konsortsium yaratildi hamda bitta shtamm (*Ochrobactrum* sp.) va bakterial konsortsium asosida sipermetrinning parchalanishi o‘rganildi. Olingan natijalar 28 kun ichida sipermetrin boshlang‘ich konsentratsiyasining (40 mg / kg) to‘liq parchalanganligini ko‘rsatdi.

Kalit so‘zlar: biodegradatsiya, bakterial konsortsium, *Pseudomonas, Ochrobactrum, Bacillus,* pestitsidlar, sipermetrin.

USE OF DESTRUCTOR BACTERIA IN THE PROCESS OF CYPERMETHRIN DEGRADATION

Annotation

Cypermethrin is a synthetic pyrethroid insecticide. Three isolates resistant to high concentrations of cypermethrin were isolated from soils artificially contaminated with cypermethrin, and their morphological, cultural and biochemical properties were studied. Based on the obtained strains, a bacterial consortium was developed, which consists of cultures of Pseudomonas sp., Bacillus sp. and Ochrobactrum sp. The degradation of cypermethrin based on a single strain (Ochrobactrum sp.) and a bacterial consortium was studied. The results obtained showed complete degradation of the initial concentration of cypermethrin (40 mg/kg) within 28 days.

Key words: biodegradation, bacterial consortium, *Pseudomonas, Ochrobactrum, Bacillus,* pesticides, cypermethrin.

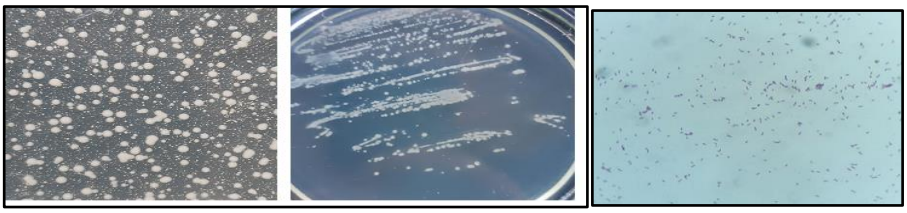
Введение. Несмотря на то, что в последнее время стали в большинстве случаев применять новые поколения пестицидов, которые менее токсичны и разлагаются быстрее, проблема остается открытой. Одним их пестицидов нового поколения является циперметрин – синтетический пиретроидный инсектицид. Циперметрин является перитроидом II типа [1-2], впервые он был синтезирован в 1974 году [3]. В сравнении с перитроидами I типа, циперметрин содержит цианогруппу, именно эта группа усиливает их инсектицидные свойства [2]. Он используется в сельском и личных приусадебных хозяйствах для борьбы вредными насекомыми, а также в практике медицинской, санитарной и бытовой дезинфекции для борьбы с вредными и синантропными насекомыми, в том числе для борьбы с муравьями и тараканами [4]. Циперметрин, как и другие пестициды, оказывает токсическое действие на млекопитающих [5]. У многих людей вызывает аллергические кожные реакции и раздражение глаз [6], а также нарушает эндокринную систему [7]. Интенсивное использование циперметрина может нанести экологический ущерб и неблагоприятное воздействие на здоровье человека и окружающую среду [8]. Самым эффективным способом уменьшить количество ксенобиотиков, в том числе и циперметрина, на данный момент является микробная деградация [5]. Есть данные, что некоторые микроорганизмы, относящиеся к роду *Pseudomonas* [9], *Micrococcus* [10] и *Ochrobactrum* [5] разлагают циперметрин. Наиболее эффективное применение микробной деградации предполагает использование не одного вида, а консорциумов, состоящих из различных микроорганизмов [11-12].

Материалы и методы исследования. В работе использовалась сероземная почва фермерского поля, на котором в течение многих лет проводили обработку пестицидами (циперметрин, хлорпирифос и др.). Образцы почв отбирались с глубины около 0-15 см. Предварительно образцы почвы очищали от крупных включений, просеивали через сито из нержавеющей стали диаметром 2 мм и высушивали в лабораторных условиях.

Стандарт циперметрина (чистота 97%), ацетон хроматографической чистоты и все другие использованные химические вещества и реагенты были чистыми аналитическими и коммерчески доступными. Исходные растворы (20 мг/кг; 40 мг/кг;) готовили с ацетоном. Для улучшения растворения хлорпирифоса в жидкой среде добавляли эмульгаторы. В работе использовался pH-метр Metler toledo. Для выращивания микроорганизмов использовали питательные среды МПА, МПБ (HiMedia Pvt Ltd Mumbai, India), Минеральная солевая среда (MSM) (pH 6,8-7,0), содержащая (г/л): K_2HPO_4 -1,5; KH_2PO_4-0,5; NaCl 0,5; $(NH_4)_2SO_4$ - 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2 и 1 мл раствора микроэлементов.

Результаты. В процессе исследований были выделены более 17 изолятов, способных к росту на среде с 10 мг/кг циперметрина. Методом постепенного увеличения концентрации для дальнейших исследований были отобраны три наиболее эффективных изолята (№ 3, 6 и 11) способные расти при концентрации циперметрина до 40 мг/кг почвы. На основании изучения морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств данные изоляты были идентифицированы до родовой принадлежности: № 3 - *Ocrobactrum sp.*, № 6 – *Pseudomonas sp.* и № 11 -*Bacillus sp.*

Штамм *Ocrobactrum sp.* - одиночные подвижные палочки с закругленными концами. Клетки примерно 0,6-1,2 до 2 мкм в длину, грамотрицательные, неспорообразующие, аэробы. Каталазоположительные, оксидазоотрицательные, индол, сероводород не образуют; желатину не разжижает; молоко не ферментирует, подщелачивает среду; нитраты не восстанавливает. Из источников углерода ассимилирует: глюкозу, сахарозу, галактозу, маннозу, раффинозу, крахмал, сорбит, глицерин. На МПА образует белые гладкие блестящие колонии, профиль равномерно возвышающийся, край ровный, диаметр 2,0-2,5 мм. Способен окислять углеводороды нефти. Растет в пределах температур 20-30°C, при pH среды 5,8-7,8. Не является патогеном (рис. 1).



а *б* *с*

Рисунок 1. Рост на среде МСМ с циперметрином (а), суточные культуры (б) и Грамм окрашивание суточной культуры (с) (ув. х1000)

Штамм *Bacillus* sp. - клетки палочковидные, размер 2-3х0,5-0,6 мкм, одиночные или соединены в цепочки, образуют споры, грамположительные, аэробные. На МПА образует колонии плотные, беловато-серого цвета, округлой формы, мелкие, морщинистые. Оптимум роста при pH 6,8-7,0. В питательном бульоне образуют пленку и осадок (рис.2 а).

Штамм *Pseudomonas* sp. клетки палочковидные, размер 1-1,2х0,5 мкм, одиночные или соединены в короткие цепочки, грамотрицательные. Спор не образуют. На МПА образует округлые колонии, диаметром 2-6 мм, слегка выпуклые, гладкие, с ровным краем, пигмент не образуют. pH 7,2-7,4 (рис.2 б).

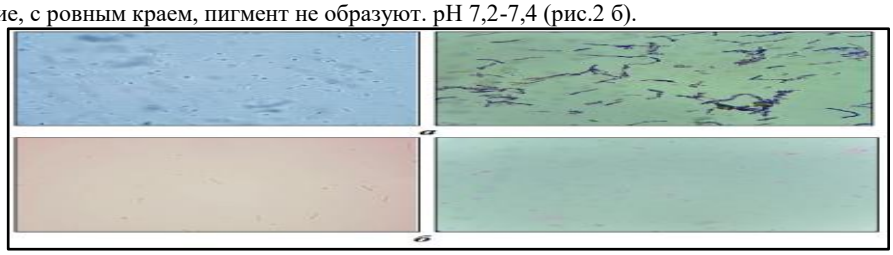


Рисунок 2. Микрофотографии и Грамм окрашивание устойчивых к циперметрину штаммов: a- *Bacillus sp.*, b- *Pseudomonas sp.* (ув. х1000).

На основе этих трех штаммов был разработан бактериальный консорциум, разлагающих циперметрин.

В процессе биодеградации пестицидов микроорганизмы-деструкторы используют субстрат в качестве единственного источника энергии. Благодаря биохимическому потенциалу микроорганизмов исходная молекула пестицида расщепляется до более простых соединений. Лабораторные эксперименты по биоразложению циперметрина поводились в течение 28 суток на стерильных почвах с добавлением как бактериального консорциума, так и отдельно одного штамма *Ochrobactrum sp.* Для поддержания влажности (65-70%) каждые 3-4 суток образцы испытуемых почв орошались стерильной дистиллированной водой. Каждую неделю отбирались пробы почв для хроматографического анализа. Результаты хроматографических анализов показывают, что концентрация пестицида в вариантах с добавлением как консорциума, так и отдельного штамма *Ochrobactrum sp.* со временем снижается и на 28 сутки падает до 0, тогда, как в контрольном варианте остается практически на одном уровне (рис.3).



а ***б***

Рисунок 3. а – Хроматограмма циперметрина; б - Динамика деградации циперметрина бактериальным консорциумом и *Ochrobactrum sp.*

Надо отметить, что при использовании консорциума идет разложение пестицида протекает с более высокой скоростью. На 28 сутки при использовании как отдельного штамма, так и консорциума содержание циперметрина в почвы достигает нулевых значений, но при использовании консорциума показатели деградации в динамике процесса выше, это свидетельствует о том, что бактериальный консорциум разлагает исходные молекулы быстрее, чем отдельный штамм. Эти данные согласуются с известными сведениями, что при использовани микробного консорциума для разложения органических веществ процесс идет эффективнее, чем при использовании отдельного штамма, т.к. при этом задействовано больше различных ферментов, вырабатываемых различными микроорганизмами. Проведенные с использованием разных концентраций циперметрина (до 40 мг/кг почвы) показали, что отобранные нами микроорганизмы полностью разлагают исходные концентрации циперметрина.

Заключение. Поиск и выделение микроорганизмов-деструкторов является сложным, но важным для ремедиации способом. В почве живут различные микроорганизмы, но, не все могут расти и размножатся в пестицидной среде, потому что для большинства микроорганизмов и исходная структура пестицидов, и продукты их распада являются очень токсичными. В результате наших исследований получены активные штаммы микроорганизмов, на основе которых создан консорциум, способный за короткий период полностью разрушать такой пестицид, как циперметрин. Это открывает большие перспективы для использования отобранных микроорганизмов в целях биоремедиации почв, загрязненных пестицидами. Также, надо отметить, что использование микробного консорциума эффективнее, чем отдельный штамм, т.к. в данном случае задействованы разные устойчивые к циперметрину микроорганизмы, которые в силу своих биохимических особенностей могут разлагать также промежуточные соединения, образующиеся при разложении циперметрина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bhatt P, Huang Y, Zhan H and Chen S (2019) Insight Into Microbial Applications for the Biodegradation of Pyrethroid Insecticides. Front. Microbiol. 10: 1778.doi: 10.3389/fmicb.2019.01778
2. Proudfoot, A. T. (2005). Poisoning due to pyrethrins. Toxicol. Rev. 24, 107–113. doi: 10.2165/00139709-200524020-00003
3. R. Balagurunathan et al /International Journal of ChemTech Research, 2018,11 (05): 509-520.
4. Lin Q., Chen, S., Hu,Yang, L., Li, H. 2011. Biodegradation of cypermethrin by a newly isolated actinomycetes HU-S-01 from wastewater sludge. Int. J. Environ Sci. Tech. 8: 45–56.
5. Indratin, et al Degradation of Cypermethrin by Indigenous Bacteria from Contaminated Soil Makara Journal of Science, 23/4 (2019, 210-216 doi: 10.7454/mss. v23i4.7998.
6. Tallur, P.N., Megadi, V.B., Ninnekar, H.Z. 2008. Biodegradation of cypermethrin by Micrococcus sp. strain CPN 1. Biodegradation 19: 77–82. http://dx.doi.org/10.1007/s10532-007-9116-8.
7. Mc-Kinlay, R., Plant, J.A., Bell, J.N., Voulvoulis, N. 2008. Endocrine disrupting pesticides: implications for risk assessment. Environ. Int. 34: 168–183.
8. Pascual, J.A., Peris, S.J. 1992. Effects of forest spraying with two application rates of cypermethrin on food supply and on breeding success of the blue tit (Parus caeruleus). Environ. Toxicol. Chem. 11(9): 1271–1280. http://dx.doi.org/10.1002/etc. 5620110907.
9. Jilani, S., Khan, M.A. 2006. Biodegradation of cypermethrin by Pseudomonas in a batch activated sludge process. Int. J. Environ. Sci. Technol. 3:371–380
10. Tallur, P.N., Megadi, V.B., Ninnekar, H.Z. 2008. Biodegradation of cypermethrin by Micrococcus sp. strain CPN 1. Biodegradation 19: 77–82. http://dx.doi.org/10.1007/s10532-007-9116-8.
11. Sorensen, S.R., Aamand, J., Christian, N.A. 2008. Rapid mineralization of the phenylurea herbicide diuron by Variovorax sp. strain SRS16 in pure culture and within a two-member consortium. Appl. Environ. Microbiol. 74: 2332–2340.
12. Sorensen, S.R., Ronen, Z., Aamand, J. 2002. Growth in coculture stimulates metabolism of the phenylurea herbicide is oproturon by Sphingomonas sp. strain SRS2. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3478–3485.