

Канаев А.Т., Макеева А.

**ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ НИТРИФИЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ НА УТИЛИЗАЦИЮ
НЕСИММЕТРИЧНОГО 1.1.-ДИМЕТИЛГИДРАЗИНА В ОБРАЗЦАХ
ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ В РАЙОНАХ ПАДЕНИЯ ОЧРН 15/25 В
КАРАГАНДИНСКОЙ ОБЛАСТИ**

А.Т. Канаев, А. Макеева

**STUDY OF NITRIFYING BACTERIA EFFECTS ON UTILIZATION OF
UNSYMMETRICAL 1.1.- DIMETHYLHYDRAZINE IN SAMPLES OF POLLUTED SOIL
IN AREAS OF OCHRN 15/25 FALL IN KARAGANDA REGION**

УДК: 628.516

В данной работе рассматривается вопрос деградация несимметрического диметилгидразина микроорганизмами.

The article deals with the problems of degradation of unsymmetrical dimethylhydrazine by microorganisms.

Выявление и восстановление территорий, загрязненных КРТ в РП является важнейшей экологической проблемой, для решения которой необходимо срочно разработать мероприятия и технологии реабилитации нарушенных земель.

В экспериментах для выделения бактериальных изолятов и определения активности нитридредуктазы использовали образцы почв, отобранные в местах падения рН - № 15, №25 с МП-1, содержащие 1.1.-диметилгидразин (НДМГ) в концентрациях: 1/6 – 13,68 мг/кг – 137 ПДК; 1/9 – 3,62 мг/кг – 36 ПДК; 1/12 – 0,23 мг/кг – 2,3 ПДК.

Изоляты выделяли методом накопительных культур – азотфиксирующих бактерий выращивали на среде Эшби, актиномицетов на среде сахаропептонном агаре Сабуро, микроскопических грибов на среде Чапека /1/.

Определение активности нитритредуктазы. Метод определения активности нитритредуктазы в почве основан на учете остаточного количества невосстановленных нитритов.

Активность нитритредуктазы выражали в миллиграммах восстановленного NO_2^- на 1 г почвы за сутки, который находят по разнице между количеством внесенного в инкубационную смесь (3,33 мг) и обнаруженного в фильтрате нитрита.

Содержания НДМГ в образцах почвы определяли газохроматографическим методом.

О биодegradации НДМГ судили по его убыли в опытных вариантах, содержащих микробные культуры, по сравнению с контролем (стерильная культура) /2/.

Результаты и обсуждение

Для проведения исследований территории районов падения отделяющихся частей ракет-носителей (РП ОЧ РН) были выбраны пункты № 15 и 25. В качестве мест обследования выбраны объекты 50-52 км южнее - юго-западнее пос. Карсакапай Улытауского района Карагандинской области, охватывая правобережье бассейна р.Калмаккырган (Белеуты) и среднюю часть бассейна р.Дуйсембай.

Районы падения имеют конфигурацию эллипсов, вытянутых с северо-востока на юго-запад и перекрывающих друг друга, что позволяет рассматривать РП-15 и РП-25 как единое целое.

Азимут наклона большой оси РП-15,25 составляет 65°. Длина большой оси РП-15 - 27 км, малой - 18 км; РП-25 - 60 км и 30 км соответственно. Центр эллипса РП-15 - с.ш. 45°20'00", в.д. 66°46'30"; РП-25 - с.ш. 47°14'00", в.д. 66°23'00".

Общая площадь территории РП-15,25 и сопредельных земель, покрытая изысканиями в 2000 году, составляет 280 тыс.га. Отведенная непосредственно под РП-15,25 - 167,8 тыс.га, сопредельных земель, обследованы для установления фонового уровня содержания химико-загрязняющих веществ – 112,2 тыс.га (рис.1).

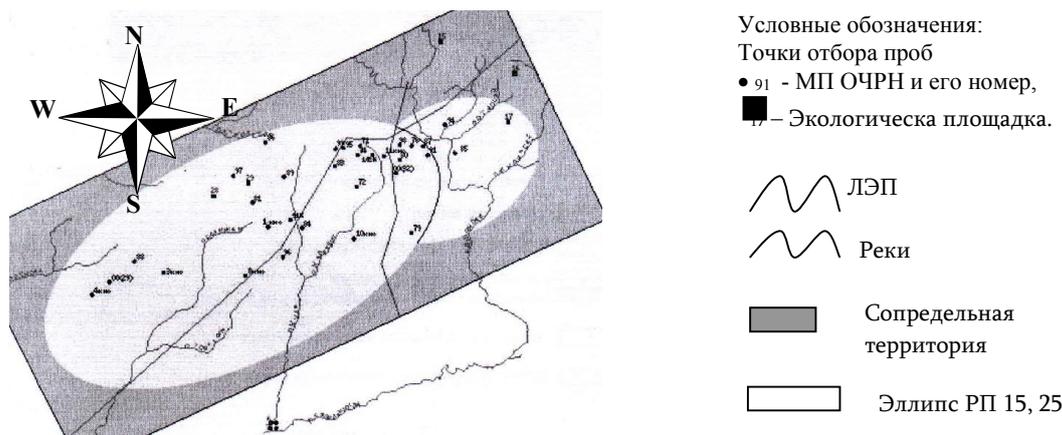
В связи с этим в наших исследованиях были поставлены следующие задачи:

– оценить роль почвенных микроорганизмов, связанных с утилизацией и трансформацией азота в детоксикации НДМГ.

– определить активность нитритредуктазы в образцах почв с добавлением почвенных микроорганизмов

В наших предыдущих экспериментах при исследовании процесса биодegradации НДМГ в почвах в присутствии ассоциации различных микроорганизмов, были получены достоверные данные по детоксикации НДМГ /1/.

Рисунок 1. Схема расположения экологических площадок и МП ОЧРН на территории РП – 15, 25



В биогеоценозах почвенных биогумусов велика роль геохимической деятельности микроорганизмов, в связи с чем уделяется большое внимание изучению их экологии. Однако сведения о микробных детоксикациях НДМГ отсутствуют. Поэтому нами проведены исследования по изучению активных видов микроорганизмов на деструкцию НДМГ.

Анализируя данные о численности микроорганизмов – основных показателей степени окислительно-восстановительных процессов, необходимо отметить, что они встречались в значительных количествах. Содержание *азотфиксирующих* и

биологических методов очистки почвогрунтов, загрязненных компонентами ракетного топлива (НДМГ). Не смотря на это, характер воздействия НДМГ на природные экосистемы, пути его трансформации в окружающей среде, биологическая и биохимическая устойчивость, реакционная способность в процессах самопроизвольной деградации изучены недостаточно.

Нами было исследована почва зараженная НДМГ в лабораторных условиях, где были проведены микробиологические работы. Нам казалось, что это даст возможность лучше представить обстановку, в которой происходят процессы микробиологической деструкции НДМГ.

Для проведения эксперимента 100 г почву изучаемого объекта обработали с НДМГ в течение суток. На почву с исходным содержанием $1,49 \pm 0,3$ НДМГ добавляли соответствующие культуральные суспензии, из расчета Т:Ж=1:20. Опыт продолжался в течение 30 суток в термостате, при 28°C . Окислительная способность исходных штаммов, выращиваемых на соответствующих средах, определялась 2, 10 и 30 суток в процессе роста культур.

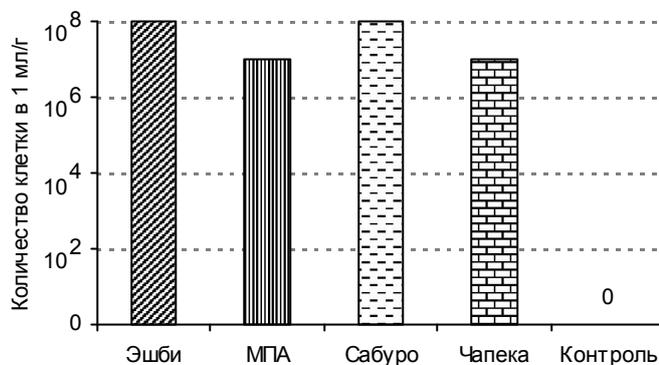


Рисунок 2. Количество микроорганизмов в исследуемых почвах

актиномицетов на среде Эшби и Сабуро, был отмечен в пробах почвы, имеющих нейтральную реакцию (рН 7,0), а численность клеток его достигала до 10^8 клеток на 1г почвы (рис.2).

Вместе с тем, содержание общего количество микроорганизмов и микроскопических грибов достигает до 10^7 кл/г почвы. Тогда как в контрольном варианте микроорганизм отсутствовал.

Таким образом, в исследуемых почвах широко распространены представители бактерий, актиномицетов и грибов.

В последнее время все чаще проводятся исследования возможностей использования микро-

Влияние культур микроорганизмов на деструкцию НДМГ.

Среда	Исходная концентрация	Биодеградация НДМГ, мг/кг		
		2 сут.	10 сут.	30 сут.
Эшби	$1,49 \pm 0,3$	$1,45 \pm 0,4$	$1,40 \pm 0,4$	$1,22 \pm 0,4$
МПА	$1,49 \pm 0,3$	$1,39 \pm 0,5$	$1,24 \pm 0,4$	$1,14 \pm 0,3$
Сабуро	$1,49 \pm 0,3$	$1,34 \pm 0,4$	$1,20 \pm 0,3$	$0,93 \pm 0,3$
Чапека	$1,49 \pm 0,3$	$1,34 \pm 0,4$	$1,06 \pm 0,3$	$0,93 \pm 0,3$
Контроль	$1,49 \pm 0,3$	$1,49 \pm 0,3$	$1,45 \pm 0,3$	$1,37 \pm 0,3$

Как видно из табл.1 после инкубации с микробными ассоциациями, наблюдали биодеградацию НДМГ во всех вариантах опыта. После инкубации пульпы микробными

ассоциациями, предварительно выращенных на соответствующих средах, максимальная деградация НДМГ на вторые сутки составляет с культурами актиномицетов и микроскопических грибов на среде Сабуро и Чапека – 1,34 мг/кг НДМГ. Полученные данные показали, что все четыре штаммы на 10-11 сутки окисляют НДМГ интенсивно: ОМЧ – 1,24 мг/кг; актиномицеты – 1,20 мг/кг; грибы – 1,06 мг/кг. После 30 суточной обработки почвы культурами микроорганизмов по конечным результатам и срокам завершения окисления НДМГ, эффективным оказалось актиномицеты и грибы. В этих условиях наименьшую активность проявили культуры азотфиксирующие на среде Эшби (1,22 мг/кг) и ОМЧ на среде МПА (1,14 мг/кг). Однако разница между опытными и контрольными вариантами лучше выявлялась при воздействии в течение 30 суток.

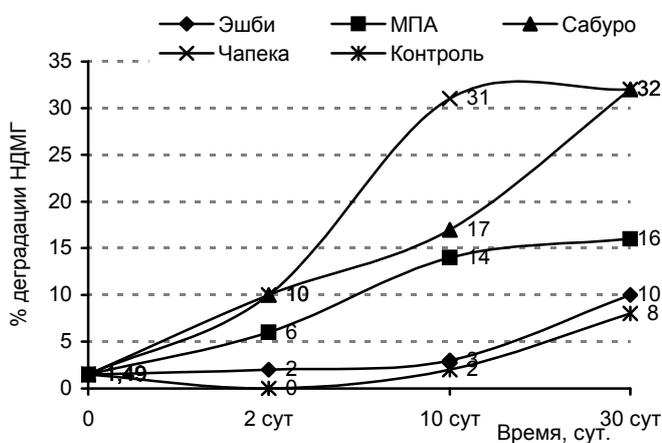


Рисунок 3. Динамика деструкции НДМГ микроорганизмами.

Результаты эксперимента представленный на рис. 3 указывает, динамика деструкции НДМГ всех четырех штаммов микроорганизмов показало, что разница между контролем и экспериментальным вариантом на 30 сутки составила: актиномицетами и грибами – 24,0%, ОМЧ – 8,0%, азотфиксирующими – 2,0%.

Таким образом, по конечным результатам и срокам завершения окисления НДМГ, эффективным оказались актиномицеты и грибы. В этих условиях на 2-ой сутки наиболее сильно активизировались

грибы и начиная с 10 сутки актиномицеты. Однако разница деградации между культурами лучше выявлялась при 30 суточной обработке.

На следующем этапе экспериментов в качестве объекта исследований использовали «активные» популяции нитрифицирующих бактерий, полученные путем последовательного пересева на свежие питательные среды.

Учитывая полученные результаты в пробах почв, содержащих одинаковые концентрации НДМГ, определяли активность нитритредуктазы, предположительно одного из ферментов азотного обмена, помимо нитрогеназ, участвующий в процессе детоксикации НДМГ. Предварительно образцы почв смешивали с биогурусом, источником азотобактерий в соотношении 1:5 (биогурус : почва).

Для оценки влияния различных эколого-физиологические группы микроорганизмов, выявленные в биогурусе, на детоксикацию гептила проводили при внесении водной вытяжки из биогуруса в накопительные культуры, содержащие гептил. Концентрация гептила составляла 0,01 мг/мл. Вытяжку биогуруса готовили следующим образом: биогурус в количестве 10 г на 100 мл воды размешивали интенсивно в течение часа. Опыт проводили в трех повторностях без гептила и с гептилом. Накопление среды проводилось в течение 14 дней. Возможно, что на детоксикацию гептила существенное влияние оказывают группы нитрифицирующих микроорганизмов. Для оценки их влияние на деструкцию гептила проводили получая накопительные культуры этих бактерий.

Наблюдение вели в течение всего инкубационного периода. Установлено что в колбах при внесении вытяжки из биогуруса в накопительную культуры нитрифицирующих микроорганизмов наблюдали помутнение среды накопления, что свидетельствует о развитии этих микроорганизмов в присутствии гептила. Концентрация 0,01 мг/мл не являлась губительной для микроорганизмов многих видов. Помутнение наблюдалось в накопительных культурах нитрифицирующих микроорганизмов (рис.4)



Рисунок 4. Характеристика роста нитрифицирующих бактерий 1 – без гептила, 2 – с гептилом, 3 – контроль.

Активность фермента сверяли по калибровочной кривой, как описано в разделе Материалы и методы.

Таблица 2.

Активность нитредуктазы в образцах загрязненных почв после добавления биогумуса в мг восстановленного NO_2 .

Образцы почв	Концентрация НДМГ мг/кг	ОП 500нм	мг NO_2 /мл	мг NO_2 2г.почвы
Контроль	1,22	0,250	0,124	0,186
Биогумус	0,93	0,325	0,220	0,330
Биогумус	0,93	0,312	0,194	0,291

Как видно из данных таблицы максимальная активность нитритредуктазы обнаружена в образцах

почвы с добавлением биогумуса, где обнаружено большое содержание азотобактерий.

Вполне вероятно, что в этом случае биодegradация НДМГ происходила за счет микроорганизмов участвующих в утилизации азота. Однако, трудно объяснить на сегодняшний день за счет каких биохимических механизмов происходит снижение концентрации НДМГ в случаях, указанных в табл.2.

Литература:

1. Родина Г. Методы водной микробиологии, М., 1965. 64 с.
2. Газохроматографическое определение несим-метричного диметилгидразина в воде. Методические указания. МУК 4.1.1211-03

Рецензент: д.мед.н., профессор Солпиев А.