

УДК 631.46:632.95

ТРАНСФОРМАЦИЯ ПЕСТИЦИДОВ, ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИМИДИНА, ПОЧВЕННЫМИ АНАЭРОБНЫМИ БАКТЕРИЯМИ РОДА CLOSTRIDIUM

В. Т. ЕМЦЕВ, В. А. БАБАЙЦЕВА

(Кафедра микробиологии)

Пестициды представляют собой весьма разнообразные химические соединения, среди которых имеются и производные пиримидина. По нашим данным [2], анаэробные бактерии рода *Clostridium* могут интенсивно трансформировать пиримидиновое основание (урацил) и его производные. В этой связи представлялось интересным исследовать способность анаэробов, трансформирующих урацил, использовать пестициды — производные пиримидина, а также изучить условия, влияющие на степень потребления данных соединений.

Объекты и методы исследований

Бактерии рода *Clostridium* были выделены из различных почв на синтетической среде с урацилом (основная питательная среда + урацил, 0,01 %). Основная питательная среда (ОПС) состоит из следующих компонентов (в %): Na_2HPO_4 — 0,1; KH_2PO_4 — 0,05; MgSO_4 — 0,05; CaCO_3 — 0,5; FeCl_3 — следы; глюкоза — 0,5; дрожжевой автолизат — 0,002; тиогликолат натрия — 0,05; нейтральрот — 0,004; микроэлементы по Федорову — 1 мл/л; рН среды — 7,2—7,4.

Культура *Cl. pasteurianum* штамм 138 была выделена из дерново-подзолистой почвы (опытное поле Тимирязевской академии), *Cl. butyricum* штамм 100 — также из дерново-подзолистой почвы (с. Чашниково Московской области), *Cl. butyricum* штаммы 1546, 1534, 1543 — из мощного чернозема (Стрелецкая степь Курской

области), *Cl. butyricum* штамм 1446 — из лугово-каштановой почвы (Ростовская область), *Cl. acetobutylicum* штаммы 4115 и 2100 — из светло-каштановой почвы (Кировобадская область). Одна неидентифицированная культура *Clostridium* sp. штамм 2200 была получена из серозема (опытное поле Ташкентского СХИ).

Для определения способности анаэробных бактерий рода *Clostridium* разлагать пестициды использовалась минеральная питательная среда (МПС), включающая в свой состав все компоненты среды ОПС, кроме глюкозы, которая была заменена соответствующим пестицидом, рН 7,2—7,4. Интенсивность роста *Clostridium* на средах регистрировалась на фотоколориметре — нефелометре ФЭК-56 с зеленым светофильтром ($\lambda=540$ нм) в кюветках 3060.

В опытах использовали следующие гетероциклические пестициды: инсектицид диазинон (базудин), активное вещество: 0,0-диэтил-0- (2-изопропил-4-метилпиридинил-6)-тиосфат (Швейцария); инсектицид дурсбан, активное вещество: 0,0-диэтил-0-3, 5, 6-трихлор-2-пиримидилфосфор-тиоат (США); инсектоакарицид пиримифосметил — ПП-511 (актелик), активное вещество: 2-диэтиламино-6-метилпиридин-4-ил-диметилфосфат (Англия); инсектицид хостанион (триазофос), активное вещество: 1-фенил-3(0,0-диэтилтиофосфорил)-1,2,4-триазол (ФРГ); гербицид ленацил (гекселур), активное вещество: 3-циклогексил-5,6-триметиленаурацил (ГДР).

При расчете доз пестицидов исходили из средних токсичных количеств (LD_{50}) для теплокровных.

Среды стерилизовали дважды при 0,5 атм в течение 20 мин. Инокулят готовили по предложенной нами методике [1]. Среды, предварительно прогретые, а затем охлажденные, заражали 1 мл инокулята и инкубировали 4—6 сут при температуре 28°. Культивирование проводили в высоких пробирках в толстом слое питательной среды. Биомассу определяли нефелометрически на ФЭК-56 с зеленым светофильтром ($\lambda=540$ нм) в кюветках 3060.

Для исследования химических превращений пестицидов использовали культуральную жидкость после центрифугирования бактериальных клеток. Возможность появления в ней новых метаболитов выявлялась хроматографическим и спектрофотометрическим методами.

Хроматографический анализ заключался в разделении продуктов деградации пестицидов методом восходящей хроматографии на бумаге Filtrak [5] в следующих системах растворителей: 1) этилацетат: $CH_3COOH : H_2O = 3 : 1 : 1$; 2) изопропанол: $H_2O : NH_4OH$ 25% = 14 : 5 : 1; 3) п-бутанол: ледяная уксусная кислота: $H_2O = 2 : 1 : 1$; 4) п-бутанол: ацетон : $CH_3COOH : NH_4OH$ 5% : $H_2O = 7 : 5 : 3 : 3 : 2$; 5) изомасляная кислота: $H_2O : NH_4OH$ 25% = 33 : 66 : 1,5; 6) изопропиловый спирт : $H_2O = 7 : 3$; 7) этиловый спирт : $H_2O = 80 : 2$. Продолжительность хроматографического разделения (от 24 до 48 ч) зависела от использованной системы.

При качественном анализе надосадочную жидкость (после отцентрифугирования клеток) концентрировали выпариванием, небольшие количества (до 2—3 мл) на часовых стеклах, а более значительные — в вакууме при 40°.

Образцы небольшого объема наносили петлей в отдельную точку на стартовой линии, а в случае препаративного разделения концентрат наносили микропипеткой на старт сплошной узкой полосой. После хроматографического разделения зоны поглощения УФ лучей обнаруживали с помощью ультрахемискапа; пятна соответствующего соединения вырезали и соединение элюировали дистиллированной водой в течение 24 ч.

Идентификацию выделенных и очищенных соединений проводили путем сравнения R_f соединений в различных системах с R_f образцов заведомо известных структур и снятием спектров УФ поглощения соединений при pH 1 и 11 на спектрофотометре Specord UV-VIS (Иена, ГДР).

Все опыты по качественному определению продуктов деградации проводили в 3-кратной повторности.

Продукты деградации дурсбана и диазинона в культуральной жидкости бактерий *Cl. butyricum* штамм 1546 и *Cl. acetobutylicum* штамм 4115 изучали методом ионообменной хроматографии на Uvicord 11 8300 Lkb Broma с использованием в качестве наполнителя в колонках сефадекса GA-10 [6]. Культуры анализировали после 6 и 72 ч инкубации. Центрифугат в количестве 20 мл выпаривали на вакуумном испарителе, разбавляли 2 мл фосфатного буфера (pH 7,0) и затем 1 мл полученного раствора разделяли на сефадексе GA-10 (объем колонки 0,5×60 см) с использованием в качестве элюанта 0,05 н. фосфатного буфера. Относительную адсорбцию веществ определяли в области УФ поглощения. После адсорбции на сефадексе их собирали и подвергали хроматографическому и спектрофотометрическому анализу в целях идентификации.

Взаимодействие пестицидов с анаэробными бактериями в почвенных условиях изучали в модельном опыте с дерново-подзолистой почвой. В стеклянные сосуды вносили 20 г абсолютно сухой почвы. Предварительно ее известковали по 3/4 гидролитической кислотности и вносили микроэлементы — молибден, цинк, бор в общепринятых для вегетационных опытов дозах. Схема опыта предусматривала использование клеверной муки как дополнительного источника органического вещества для микроорганизмов из расчета 100 т/га (0,6 г на сосуд) и пестицида из расчета 5-кратно увеличенной «полевой» дозы: дурсбана — 25 кг/га (10%-ный смачивающийся порошок), или 0,3 мг на сосуд, диазинона — 200 кг/га (гранулированного препарата с 5%-ным содержанием активного вещества, или 1,5 г), ленацила — 20 кг/га (препарат с 80% активного вещества), или 0,2 мг на сосуд. В опытах также использовали инокулят *Cl. acetobutylicum* штамм 4115 (1 мл на сосуд).

Стерилизацию почвы проводили 3-кратным автоклавированием при 1 атм в течение 3 дней по 20 мин. Такая «мягкая» стерилизация не обеспечивала полной стерильности почвы, однако ее применяли, чтобы избежать возникновения токсичности.

Сосуды с почвой (влажность 60% от полной влагоемкости) инкубировали в темноте при температуре 37°.

Было заложено 7 вариантов опыта, повторность опыта 3-кратная: 1 — стерильная почва; 2 — то же + *Clostridium*; 3 — нестерильная почва; 4 — стерильная почва + клевер; 5 — нестерильная почва + *Clostridium*; 6 — то же + клевер;

7 — то же + *Clostridium*. В каждый вариант вносили один из трех изучаемых пестицидов.

Через 20 дней инкубации из каждого варианта отбирали стерильным инструментом в стерильную посуду образец почвы (из повторностей готовили средний образец). Количество клеток в нем определяли методом предельных разведений (предварительно почву растирали с пиродифосфатом натрия по Д. Г. Звягинцеву и др. [3]) на ОПС, в которую был добавлен соответствующий пестицид.

Возможную трансформацию пестицида определяли методом бумажной хромато-

графии после предварительного концентрирования фильтрата выпариванием под вакуумом при 40°.

При изучении способности анаэробов использовать пестициды в условиях так называемого кометаболизма [4] в качестве дополнительного источника углерода в МПС вносили глюкозу (0,5%), а дополнительного источника азота — $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0,1%).

При исследовании продуктов биодegradаций пестицидов применяли методику разделения на сефадексе с последующим хроматографированием и спектрофотометрированием.

Результаты опытов

Первоначально нами была определена способность трансформирующих урацил штаммов *Clostridium* использовать пестициды. Оказалось, что диазинон и дурсбан активно используют 50% штаммов *Cl. pasteurianum*, 86% штаммов *Cl. butyricum* и все штаммы *Cl. acetobutylicum* и *Clostridium* sp., ленацил, обладающий гербицидными свойствами, — соответственно 50; 71; 100 и 50% штаммов. Инсектицид хостатион в испытываемых дозах был токсичным для всех культур. Чистые культуры анаэробов не использовали пиримифосметил.

В последующих исследованиях определялась способность анаэробов использовать диазинон, дурсбан и ленацил при кометаболизме [4]. Одновременно проверяли способность *Clostridium* использовать пестициды, являющиеся единственными источниками углерода и азота в среде.

Из табл. 1 видно, что биомасса *Clostridium* на средах с диазином была в 3 с лишним раза больше, чем в контроле. Увеличение ее было особенно значительным в условиях кометаболизма. Наиболее активно росли микроорганизмы *Cl. acetobutylicum* штамм 1546 и *Cl. butyricum* штамм 100 (табл. 1).

Следует особо подчеркнуть, что диазинон для всех штаммов анаэробов может быть единственным источником углерода и азота в среде.

Что касается дурсбана, то многие штаммы маслянокислых бактерий не могли его усваивать, когда он служил единственным источником азота и углерода. Но при внесении в среду дополнительного источника этих элементов микроорганизмы энергично начинали усваивать данный пестицид. Например, те штаммы маслянокислых анаэробов, которые не использовали дурсбан в первом случае (например, *Cl. butyricum* штамм 1546), в соокислительных условиях активно усваивали его, накапливая значительную биомассу (табл. 2).

По отношению к ленацилу активность маслянокислых и ацетонобутиловых анаэробов была понижена (табл. 3). Так, ни одна культура не могла использовать ленацил как единственный источник азота и углерода в среде. Однако в соокислительных условиях все исследуемые культуры, кроме штамма 41, способны расти и накапливать биомассу, хотя и небольшую.

Изучение продуктов биодegradаций пестицидов (на 5-е сутки инкубации) показало, что культуры *Clostridium*, выращенные на средах с диазином, накапливали три новых метаболита (табл. 4). При использовании *Cl. butyricum* диазинона как единственного источника питания в среде появлялось вещество *a*, *Cl. acetobutylicum* — *a* и *b*, в соокислительных условиях *Cl. butyricum* штамм 100 накапливал вещества *a* и *b* (возможно, что последнее появлялось и у штамма 1446, но в очень незначительных количествах), при росте ацетонобутиловых бактерий в среде было дополнительно зафиксировано вещество *c*.

Рост бактерий рода *Clostridium* (в единицах оптической плотности) на среде с диазином (числитель) и в контрольной среде — без пестицидов (знаменатель)

Штамм	Сроки наблюдений, ч								
	24			72			120		
	МПС	ОПС + + глюкоза	ОПС + глю- коза + + NH ₄ H ₂ PO ₄	МПС	ОПС + + глюкоза	ОПС + глю- коза + + NH ₄ H ₂ PO ₄	МПС	ОПС + глю- коза	ОПС + глю- коза + + NH ₄ H ₂ PO ₄
<i>Cl. pasteurianum</i>									
130	$\frac{0,04}{0}$	$\frac{0,09}{0,03}$	$\frac{0,13}{0,1}$	$\frac{0,06}{0}$	$\frac{0,11}{0,06}$	$\frac{0,18}{0,16}$	$\frac{0,04}{0}$	$\frac{0,07}{0,05}$	$\frac{0,18}{0,11}$
<i>Cl. butyricum</i>									
1546	$\frac{0,07}{0}$	$\frac{0,01}{0,03}$	$\frac{0,23}{0,09}$	$\frac{0,09}{0}$	$\frac{0,14}{0,06}$	$\frac{0,27}{0,14}$	$\frac{0,04}{0}$	$\frac{0,10}{0,05}$	$\frac{0,18}{0,11}$
1534	$\frac{0,05}{0}$	$\frac{0,08}{0,02}$	$\frac{0,20}{0,06}$	$\frac{0,07}{0}$	$\frac{0,1}{0,04}$	$\frac{0,23}{0,12}$	$\frac{0,03}{0}$	$\frac{0,07}{0,04}$	$\frac{0,14}{0,09}$
1543	$\frac{0,06}{0}$	$\frac{0,09}{0,03}$	$\frac{0,21}{0,08}$	$\frac{0,07}{0}$	$\frac{0,13}{0,05}$	$\frac{0,24}{0,13}$	$\frac{0,03}{0}$	$\frac{0,08}{0,04}$	$\frac{0,16}{0,1}$
1446	$\frac{0,05}{0}$	$\frac{0,06}{0,04}$	$\frac{0,19}{0,07}$	$\frac{0,07}{0}$	$\frac{0,09}{0,05}$	$\frac{0,23}{0,12}$	$\frac{0,03}{0}$	$\frac{0,05}{0,04}$	$\frac{0,17}{0,09}$
41	$\frac{0,05}{0}$	$\frac{0,05}{0,04}$	$\frac{0,12}{0,08}$	$\frac{0,08}{0}$	$\frac{0,08}{0,06}$	$\frac{0,18}{0,13}$	$\frac{0,03}{0}$	$\frac{0,05}{0,05}$	$\frac{0,1}{0,09}$
100	$\frac{0,10}{0}$	$\frac{0,06}{0,04}$	$\frac{0,30}{0,09}$	$\frac{0,12}{0}$	$\frac{0,09}{0,06}$	$\frac{0,31}{0,18}$	$\frac{0,06}{0}$	$\frac{0,06}{0,05}$	$\frac{0,18}{0,1}$
<i>Cl. acetobutylicum</i>									
4115	$\frac{0,18}{0}$	$\frac{0,18}{0,03}$	$\frac{0,29}{0,1}$	$\frac{0,21}{0}$	$\frac{0,20}{0,05}$	$\frac{0,30}{0,19}$	$\frac{0,06}{0}$	$\frac{0,11}{0,04}$	$\frac{0,15}{0,1}$
2100	$\frac{0,06}{0}$	$\frac{0,14}{0,03}$	$\frac{0,30}{0,09}$	$\frac{0,09}{0}$	$\frac{0,18}{0,05}$	$\frac{0,30}{0,18}$	$\frac{0,07}{0}$	$\frac{0,09}{0,03}$	$\frac{0,16}{0,1}$
<i>Clostridium</i> sp.									
2200	$\frac{0,1}{0}$	$\frac{0,11}{0,03}$	$\frac{0,31}{0,03}$	$\frac{0,12}{0}$	$\frac{0,14}{0,05}$	$\frac{0,30}{0,18}$	$\frac{0,07}{0}$	$\frac{0,08}{0,03}$	$\frac{0,12}{0,09}$

Таким образом, наблюдалась трансформация диазиона, причем более активная при росте ацетобутиловых бактерий. Обнаруженные новые соединения не идентифицированы, однако некоторые физико-химические характеристики их определены (табл. 5).

В результате использования маслянокислыми анаэробами дурсбана в среде появлялось одно новое соединение — X. Соединение удалось выделить из культуральной жидкости при росте *Cl. acetobutylicum* штамма 4115 (табл. 6). Единственный раз на хроматограммах было зафиксировано вещество X₁₀, однако в дальнейшем появление его не подтвердилось (табл. 6). В случае дополнительного источника азота и углерода культуры *Clostridium* полностью использовали дурсбан, что было установлено хроматографически (вещества, адсорбирующие УФ лучи, отсутствовали, а реакция с нингидрином была отрицательной, в контроле — положительной).

При использовании ленацила культурой *Cl. acetobutylicum* штаммом 4115 в культуральной жидкости был обнаружен один метаболит, имеющий R_f в системе 7—0,71 и максимум УФ поглощения при pH 1 —

Рост бактерий рода Clostridium (в единицах оптической плотности) на среде с дурсбаном*

Штамм	Сроки наблюдений, ч								
	24			72			120		
	МПС + дурсбан	ОПС + глюкоза + дурсбан	ОПС + глюкоза + $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + дурсбан	МПС + дурсбан	ОПС + глюкоза + дурсбан	ОПС + глюкоза + $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + дурсбан	МПС + дурсбан	ОПС + глюкоза + дурсбан	ОПС + глюкоза + $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + дурсбан
Cl. pasteurianum									
130	0	0,06	0,20	0	0,09	0,22	0	0,05	0,11
Cl. butyricum									
1546	0	0,10	0,33	0	0,14	0,34	0	0,10	0,12
1543	0	0,09	0,25	0	0,13	0,26	0	0,08	0,11
1534	0	0,07	0,26	0	0,09	0,28	0	0,04	0,10
1446	0,04	0,06	0,23	0,05	0,09	0,25	0,03	0,03	0,10
41	0,06	0,09	0,12	0,07	0,11	0,15	0,03	0,04	0,09
100	0,07	0,07	0,34	0,09	0,10	0,35	0,04	0,06	0,13
Cl. acetobutylicum									
4115	0,05	0,14	0,36	0,09	0,16	0,35	0,03	0,08	0,19
2100	0,04	0,15	0,37	0,07	0,17	0,36	0,03	0,07	0,18
Clostridium sp.									
2200	0,04	0,17	0,37	0,06	0,19	0,37	0,02	0,07	0,13

* Данные об изменении роста бактерий в контроле (без дурсбана) приведены в табл. 1 (знаменатель).

Таблица 3

Рост бактерий Clostridium (в единицах оптической плотности) на среде с ленацилом*

Штамм	Сроки наблюдений, ч								
	24			72			120		
	МПС + ленацил	ОПС + глюкоза + ленацил	ОПС + глюкоза + $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + ленацил	МПС + ленацил	ОПС + глюкоза + ленацил	ОПС + глюкоза + $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + ленацил	МПС + ленацил	ОПС + глюкоза + ленацил	ОПС + глюкоза + $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + ленацил
Cl. pasteurianum									
130	0	0,04	0,06	0	0,06	0,08	0	0,03	0,06
Cl. butyricum									
1546	0	0,05	0,09	0	0,09	0,09	0	0,03	0,10
1543	0	0,06	0,07	0	0,08	0,08	0	0,02	0,09
i534	0	0,06	0,07	0	0,08	0,08	0	0,03	0,09
1446	0	0,06	0,07	0	0,07	0,08	0	0,02	0,09
41	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0,08	0,09	0	0,08	0,09	0	0,03	0,09
Cl. acetobutylicum									
4115	0	0,10	0,11	0	0,12	0,13	0	0,06	0,08
2100	0	0,09	0,10	0	0,10	0,11	0	0,06	0,08
Clostridium sp.									
2200	0	0,08	0,10	0	0,10	0,11	0	0,05	0,08

* Данные об изменении роста бактерий в контроле (без ленацила) приведены в табл. 1 (знаменатель).

Метаболиты, обнаруженные в средах с инсектицидами
при развитии культур Clostridium

Штамм	Среды с диазиномом			Среды с дурсбаном		
	МПС	ОПС+глю-коза	ОПС+глю-коза+ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	МПС	ОПС+глю-коза	ОПС+глюкоза+ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
Cl. butyricum						
100	—	K ₁ , а, K ₂ , б	K ₁ , K ₂ , б	ИС ₂ X	ИС ₁ , X, ИС ₂	ИС ₂ , X
1546	K ₁ , а, K ₂	K ₁ , а, K ₂	K ₁ , а, K ₂	—	ИС ₁ , X, ИС ₂	Исходное соединение
1446	K ₁ , а, K ₂	K ₁ , а, K ₂	K ₁ , а	ИС ₁ , X, ИС ₂	ИС ₁ , X, ИС ₂	Использовано полностью
Cl. acetobutylicum						
4115	K ₁ , б, а	K ₁ , а, б	K ₁ , б, с	ИС ₁ , X, ИС ₂ , Y	ИС ₁ , X, ИС ₁ , Y	Использовано полностью
2100	K ₁ , б	K ₁	K ₁ , а, K ₂ , с	ИС ₁ , X, ИС ₂	ИС ₁ , X, ИС ₂	Использовано полностью
Контроль (без культуры)						
—	K ₁	K ₁	K ₁	ИС ₁	ИС ₁	ИС ₁
—	K ₂	K ₂	K ₂	ИС ₂	ИС ₂	ИС ₂

Примечание. K₁, K₂ — исходные соединения в средах с диазиномом; ИС₁, ИС₂ — в средах с дурсбаном; а, б, с, X, Y — обнаруженные метаболиты.

Таблица 5

Хроматографические и спектрофотометрические характеристики продуктов
биodeградации диазинома

Штаммы, развивающиеся на среде с диазиномом	Обнаруженные метаболиты	R _f в системах		Уф поглощение, нм		Идентифицирующиеся соединения
		6	7	pH 1	pH 11	
Контрольная среда						
—	X ₁	0,56	0,48	220	220	K ₁
—	X ₂	0,80	0,82	260	280	K ₂
Cl. butyricum						
1546	X ₃	0,58	0,46	220	220	K ₁
	X ₄	0,63	0,65	245	236	а
	X ₅	0,79	0,82	260	278	K ₂
100	X ₆	0,272	—	246	—	В
	X ₇	0,48	0,47	210	220	K ₁
	X ₈	0,8	0,83	245	236	а
	X ₉	0,83	0,82	260	278	K ₂
1446	X ₁₀	0,48	—	220	220	K ₁
	X ₁₁	0,63	0,65	245	236	а
	X ₁₂	0,80	0,82	260	278	K ₂
	X ₁₃	0,272	—	—	—	В
Cl. acetobutylicum						
4115	X ₁₄	0,27	0,19	220	220	В
	X ₁₅	0,49	0,47	220	—	K ₁
	X ₁₆	—	0,65	245	236	а
	X ₁₇	—	0,73	248	242	С
2100	X ₁₈	0,27	—	—	220	В
	X ₁₉	0,49	0,47	220	220	K ₁
	X ₂₀	—	0,65	245	236	а
	X ₂₁	—	0,73	248	242	С
	X ₂₂	—	0,82	—	—	K ₂

Хроматографические и спектрофотометрические характеристики продуктов биodeградации дурсбана

Штаммы, развивающиеся на среде с дурсбаном	Обнаруженные метаболиты	R _f в системах		УФ поглощение, нм		Идентифицирующие со-единения
		6	7	pH 1	pH 11	
Контрольная среда						
—	X ₁	0,22	0,19	233	220	ИС ₁
—	X ₂	0,39	0,38	220	234	ИС ₂
Cl. butyricum						
1546	X ₃	0,25	0,2	233	220	ИС ₁
	X ₄	0,39	0,38	220	232	ИС ₂
	X ₅	0,65	0,72	274	258	X
1446	X ₆	0,23	0,2	233	220	ИС ₁
	X ₇	0,39	0,37	220	234	ИС ₂
	X ₈	0,69	0,71	274	258	X
Cl. acetobutylicum						
4115	X ₉	0,23	0,2	233	220	ИС ₁
	X ₁₀	0,38	—	—	220	—
	X ₁₁	0,40	0,38	220	234	ИС ₂
	X ₁₂	0,67	0,71	274	258	X
	X ₁₃	0,72	—	220	220	X ₁
Clostridium sp.						
2200	X ₁₄	0,23	0,2	233	220	ИС ₁
	X ₁₅	0,38	0,37	220	234	ИС ₂
	X ₁₆	0,68	0,71	274	258	X
100	X ₁₇	0,39	0,37	233	234	ИС ₂
	X ₁₈	0,69	0,71	274	258	X
	X ₁₉	0,24	0,2	234	220	ИС ₁

238 нм, а при pH 11 — 282 нм. При росте других анаэробов на средах с ленацилом накопления продуктов трансформации выявить не удалось.

Таким образом, установлена способность маслянокислых и ацетонобутиловых анаэробов, выделенных из почв на среде с урацилом, использовать некоторые пестициды, производные пиримидина. Показано, что в результате деградации пестицидов образуются новые неидентифицированные метаболиты. Отмечена наибольшая активность в отношении использования и деградации пестицидов у ацетонобутиловых анаэробов в условиях кометаболизма.

Таблица 7

Количество анаэробов, использующих пестициды в дерново-подзолистой почве (тыс. на 1 г) при внесении в нее Clostridium и органического вещества

Вариант опыта	Серии опытов		
	I (диазином)	II (дурсбан)	III (ленацил)
«Стерильная» почва*	0,52	0,24	0,13
То же + Clostridium	24	10	—
«Стерильная» почва + клевер	0,88	1	2
Нестерильная почва	52	10	200
То же + Clostridium	440	100	240
Нестерильная почва + клевер	80	52	2800
То же + Clostridium	2800	1000	4400

* Количество клеток анаэробов, обнаруженных в «стерильной» почве, принималось за контроль.

Для изучения возможности использования пестицидов в почвенных условиях были поставлены 3 серии опытов с дерново-подзолистой почвой, которую инокулировали чистой культурой *Cl. acetobutylicum* штаммом 4115 (1 мл инокулята содержит 6 тыс. клеток). Через 20 дней от начала опыта в каждой серии определяли численность анаэробов, использующих тот или иной пестицид, а также продукты возможной трансформации внесенного пестицида (табл. 7).

После 20 дней опыта никаких следов присутствия диазинона и дурсбана в почве не обнаружено.

При внесении 1 мл инокулята *Cl. acetobutylicum* в дерново-подзолистую почву общее число анаэробов, использующих диазинон, возросло в 8 раз, а в почве с клевером — в 35 раз. Последнее можно объяснить стимулирующим действием органического вещества на эти микроорганизмы и более благоприятными для них соокислительными условиями.

В опыте с дурсбаном количество анаэробов, использующих это вещество, в почве существенно увеличилось, особенно при внесении в нее клевера. Следует подчеркнуть, что число анаэробов, использующих дурсбан в дерново-подзолистой почве, намного меньше (в 5 раз), чем использующих диазинон.

В другом опыте в дерново-подзолистой почве хорошо развивалась анаэробная микрофлора, способная утилизировать ленацил, причем ее количество существенно увеличивалось при внесении в почву дополнительного источника органического вещества. Внесение культуры ацетонобутиловых бактерий практически не влияло на общую численность анаэробов, а клевер стимулировал их развитие.

Следовательно, в дерново-подзолистой почве обнаруживается значительное количество представителей анаэробной микрофлоры, способной использовать повышенные дозы диазинона и ленацила, но заметно меньше анаэробов, использующих дурсбан. При внесении в почву клевера повышается численность как почвенной анаэробной микрофлоры, так и вносимой культуры *Clostridium*.

Заключение

Обобщая представленные в статье результаты исследований, можно отметить, что пестициды, производные гетероциклических соединений, могут использоваться и трансформироваться маслянокислыми и ацетонобутиловыми анаэробами рода *Clostridium*. В опытах определены некоторые физико-химические характеристики обнаруженных метаболитов.

Способность анаэробов использовать тот или иной пестицид различна и возрастает в ряду ленацил, дурсбан, диазинон. Последние два инсектицида могут быть использованы некоторыми штаммами маслянокислых и ацетонобутиловых бактерий как единственный источник углерода и азота в среде, причем особенно активно в соокислительных условиях, а гербицид ленацил — только в соокислительных условиях. Наибольшая активность в отношении исследуемых пестицидов обнаружена у ацетонобутиловых бактерий.

Инокуляция почвы активными штаммами ацетонобутиловых бактерий приводит к значительному увеличению численности анаэробных бактерий, использующих инсектициды, а внесение дополнительного органического вещества (клевера) в еще большей степени стимулирует их развитие. По-видимому, внесением органического вещества можно существенно активизировать анаэробную микрофлору, использующую пестициды, и тем самым способствовать ускорению процесса их деградации в почве.

ЛИТЕРАТУРА

1. Емцев В. Т., Захарова С. Н. Влияние условий культивирования и состава питательных сред на фиксацию молекулярного азота. — Докл. ТСХА, 1970, вып. 160, с. 174. — 2. Емцев В. Т., Бабайцева В. А., Витол М. Я. Трансформация пуриновых и пиримидиновых соединений почвенными анаэробами рода *Clostridium*. — Изв. ТСХА, 1977, вып. 2, с. 107. — 3. Звягинцев Д. Г., Дмитриев Е. Н., Галкина Т. М. Влияние способа подготовки почвы к микробиологическому анализу на количественный учет бактерий. 1966, Микробиология, вып. 35, с. 328. — 4. Скрябин Г. К., Головлева Л. А. Микробиологическая трансформация и деградация гербицида. — Изв. АН СССР. Сер. биол., 1975, № 6, с. 805. — 5. Хайс И. М., Мацек К. Хроматография на бумаге. М.: ИЛ, 1962. — 6. Sweetman G., Nyham W. L. — J. Chromotography, 1968, vol. 32, p. 662.

Статья поступила 22 мая 1979 г.