

Министерство образования и науки Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**ВЛИЯНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ДЕСТРУКЦИЮ  
ПЕСТИЦИДА ПРОМЕТРИНА ШТАММОМ  
*PSEUDOMONAS PUTIDA* П2**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента(ки) \_\_4\_\_ курса \_\_422\_\_ группы  
направления 06.03.01 Биология  
биологического факультета  
Тихоновой Дарьи Алексеевны

Научный руководитель  
к.б.н., доцент

\_\_\_\_\_  
дата, подпись

О.Ю. Ксенофонтова  
инициалы, фамилия

Заведующий кафедрой  
д.б.н., профессор

\_\_\_\_\_  
дата, подпись

С. А. Степанов  
инициалы, фамилия

Саратов\_2016год

## Введение

По масштабам производства и потребления одним из ведущих гербицидов является препарат сим-триазинового ряда прометрин [1]. В результате его многолетнего повсеместного применения и высокой персистентности реальна опасность стойкого загрязнения почвы, как прометрином, так и продуктами его трансформации [2,3,4]. Поскольку этот гербицид на сегодняшний день остается неотъемлемой частью сельскохозяйственных технологий, то очень остро стоит вопрос о выборе оптимальных стратегий трансформации и удаления его из окружающей среды. Однако на процессы трансформации в почве очень сильно влияют микробный состав и почвенно-климатические условия [5]. Вследствие этого, процессы деградации могут протекать с разной интенсивностью. В связи с этим, встает вопрос о необходимости изучения скорости разложения пестицидов в различных условиях [6].

В результате выше изложенного целью данной работы явилось: Изучение влияние абиотических факторов на деструкцию пестицида прометрина штаммом *Pseudomonas putida* П2.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Выявить влияние температуры на процесс деградации прометрина штаммом *Pseudomonas putida* П2.

2. Определить влияние рН на процесс деградации прометрина штаммом *Pseudomonas putida* П2.

3. Изучить процесс деградации прометрина штаммом *Pseudomonas putida* П2 при интенсивной и естественной аэрации среды.

4. Определить возможность использования штаммом *Pseudomonas putida* П2 использовать углерод пестицидов 4,4-ДДТ и ГХЦГ.

## **Материалы исследований**

1. Прометрин - высокоэффективный гербицид для борьбы с однолетними двудольными и злаковыми сорняками.

2. Штамм деструктор прометрина *Pseudomonas putida* П2 выделенный студентами кафедры микробиологии и физиологии СГУ.

### **Структура работы**

Диплом изложен на 52 страницах и содержит такие структурные элементы: Содержание, Сокращения, Введение, Основная часть, Заключение, Выводы и Список использованных источников. В свою очередь основная часть содержит такие главы:

1. Общая характеристика прометрина, в которой рассматривались процесс деградации прометрина, метаболические пути разложения прометрина (кометаболизм), разрушение прометрина микрофлорой торфяных почв, скорость разложения гербицида прометрина, эффективность биологически активного субстрата при биоремедиации почв.

2. Материалы и методы исследований, в которой рассматривались материалы исследований, методы исследований.

3. Результаты исследований, в которой рассматривается Определение способности штамма *Pseudomonas putida* П2 использовать прометрин после длительного пассирования на ГРМ-агаре, Способность штамма *Pseudomonas putida* П2 использовать прометрин после длительного хранения, изучение влияния абиотических условий на рост *Pseudomonas putida* П2 при использовании прометрина в качестве единственного источника углерода, определение деструктивной активности штамма *Pseudomonas putida* П2 при температуре 28 °С pH 5, pH 7 и аэробных и факультативно-анаэробных условиях, поиск микроорганизмов, использующих углерод пестицидов 4,4-ДДТ и ГХЦГ среди деструкторов прометрина.

## Научная новизна

Получен биопрепарат на основе штамма *Pseudomonas putida* деструктора сразу трех пестицидов прометрина, гексахлорциклогексана (ГХЦГ) и трихлорметилди(Н-хлорфенил)метана (ДДТ).

## Положения, выносимые на защиту

1. При температуре +5 °С, интенсивной аэрации и значениях рН=5 и рН=7 штаммом *Pseudomonas putida* П2 не способен использовать углерод из пестицида прометрина.

2. При температуре +28 °С процесс деградации идет с одинаковой интенсивностью при рН=5 и рН=7. В течение 7 дней отмечено снижение концентрации пестицида с 250 мкг/мл до 18 мкг/мл, т.е. деструкции подвергалось 93 % препарата.

3. Интенсивная аэрация слабо влияет на скорость деструкции прометрина штаммом *Pseudomonas putida* П2. В течение 7 дней деструкция препарата составила 90 %, что на 3% ниже, чем при естественной аэрации. Следовательно, при внесении препарата в почву, не требуется дополнительных рекультивационных мероприятий по рыхлению почвы.

4. Выявленная способность штамма *Pseudomonas putida* П2 позволяет использовать углерод пестицидов дихлордифенилтрихлорметилметана (ДДТ) и гексахлорциклогексана (ГХЦГ), позволяет использовать данный штамм для очистки почвы, загрязненной не только прометрином, но и этими хлорорганическими пестицидами.

## Основное содержание

*Способность штамма Pseudomonas putida П2 использовать прометрин после длительного хранения*

Штамм *Pseudomonas putida* П2 - типичный представитель почвенных микроорганизмов выделен из экспериментально загрязненной каштановой почвы, содержащей 100 ПДК «Прометрина» [8]. Однако после длительного хранения в нашем музее бактериальных культур на кафедре микробиологии и физиологии растений на ГРМ-агаре селекционный штамм мог утратить

способность к деструкции пестицида, вследствие прекращения синтеза ферментов деградации. В связи с этим нами была проверена способность к деструкции у штамма после хранения в музее в течение 1 года.

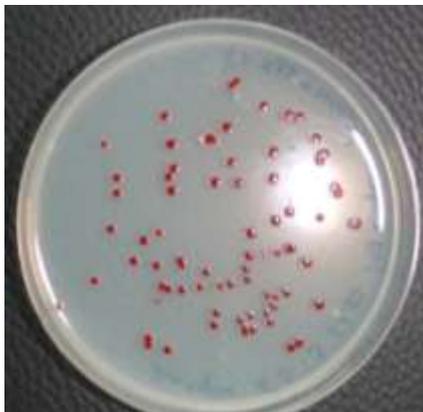


Рисунок 1– Колонии деструктора *Pseudomonas putida* П2 на среде М9 со 100 ПДК прометрина в качестве единственного источника углерода после длительного пассирования на ГРМ агаре

*Изучение влияния абиотических условий на деструкцию прометрина штаммом *Pseudomonas putida* П2.*

На основе этого штамма создан биопрепарат, который испытан в загрязненной почве в лабораторных и полевых условиях. Полученные данные открывают перспективы для использования разработанного биопрепарата для ремедиации почв, загрязненных препаратами, с действующими веществами прометрин. В связи с этим, для исследования возможностей биопрепарата на основе *Pseudomonas putida* П2, необходимо изучение влияние аэрации, рН и температуры на скорость деструкции [5].

В результате проведенных экспериментов был выявлен активный рост только при +28<sup>0</sup>С и отсутствие роста при температуре +5<sup>0</sup>С. Следовательно, штамм *Pseudomonas putida* П2 не способен использовать прометрин в качестве единственного источника углерода при температуре +5<sup>0</sup>С. Видимо, при низких температурах не происходит синтез нужных ферментов

деградации. Таким образом, вносить препарат в почву при низких температурах не следует [7].

*Определение деструктивной активности штамма Pseudomonas putida П2 при температуре 28 °С рН 5, рН 7 и аэробных и факультативно-анаэробных условиях*

В дальнейшем нами изучена интенсивность деструкции пестицида при температуре 28 с, но при разных значения рН и аэрации. Анализ деструкции проводили спектрофотометрически путем внесения чистой культуры бактерий в жидкую среду М9, содержащую пестицид в концентрации 100 ПДК. Экстракцию пестицида из среды проводили согласно ГОСТу 4.1.2170-07 путем выпаривания исследуемой среды и растворением сухого остатка ацетоном). Измерения проводили каждый день в течение 7 суток [1,2].

Концентрацию пестицида в среде культивирования деструктора определяли по построенному калибровочному графику, отражающему зависимость оптической плотности от концентрации прометрина (рисунок 2).

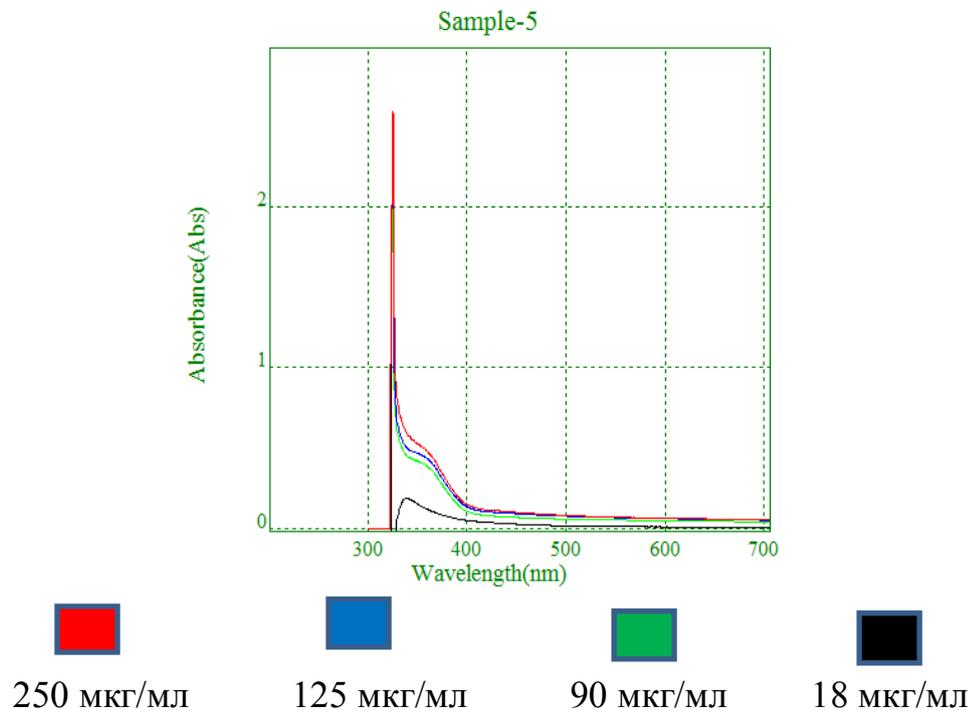


Рисунок 2 - Калибровочный график зависимости концентрации ГСО прометрина от оптической плотности

При анализе спектров ГСО пестицида в диапазоне длин волн от 0 до 700 нм для прометрина был установлен один пик в области 300 нм, который в течение 7 дней не подвергался изменениям, наблюдение вели именно за этим пиком (рисунок 3).

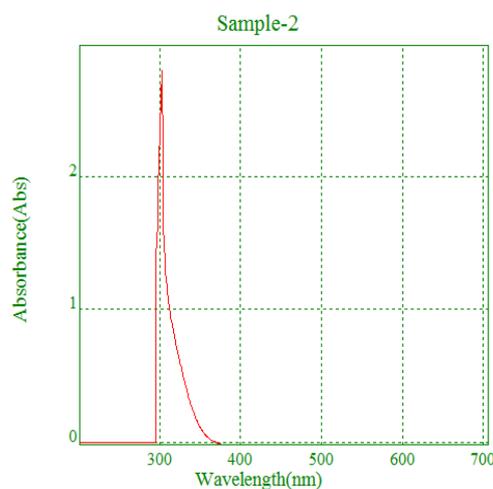
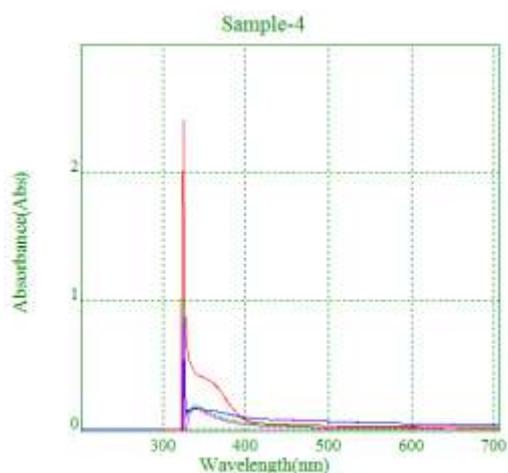


Рисунок 3 – Контроль прометрина в среде М9 при 28 °С, рН=7

Спектрограммы деструкции пестицида штаммом *Pseudomonas putida* П2 в среде М9 при температуре 28 °С рН=7, рН=5 и интенсивной аэрации представлены на рисунках 4,5,6.



1 день



3 день



5 день



7 день

Рисунок 4 - Спектрофотометрический анализ деструкции 250 мкг/мл (100 ПДК) прометрина штаммом *Pseudomonas putida* П2 в среде М9 при температуре 28 °С и рН=7

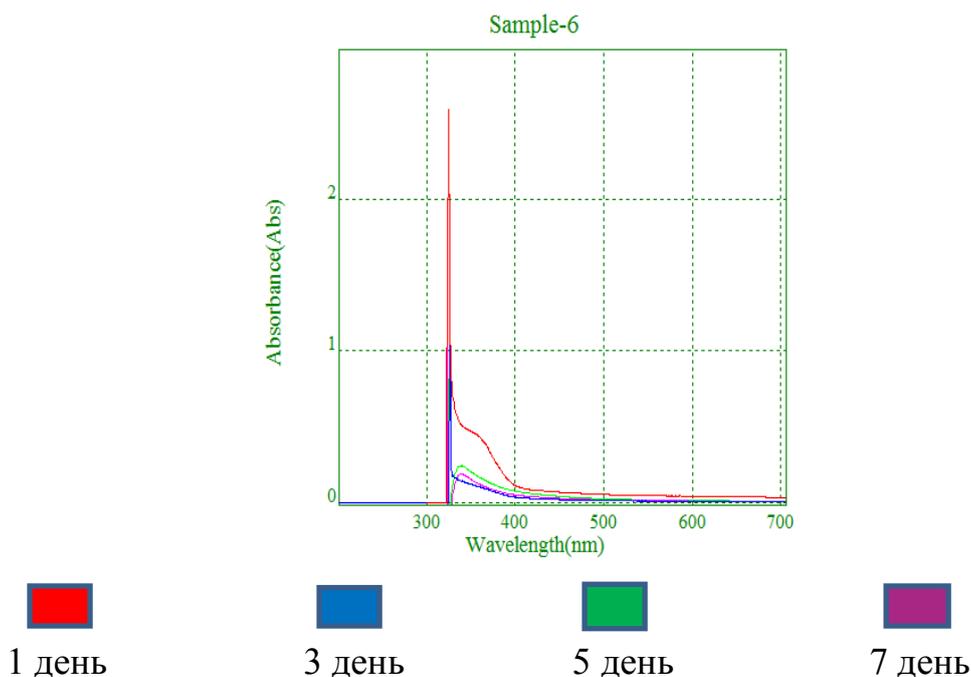


Рисунок 5 - Спектрофотометрический анализ деградации 250 мкг/мл (100 ПДК) прометрина штаммом *Pseudomonas putida* П2 в среде М9 при температуре 28 °С и рН=5

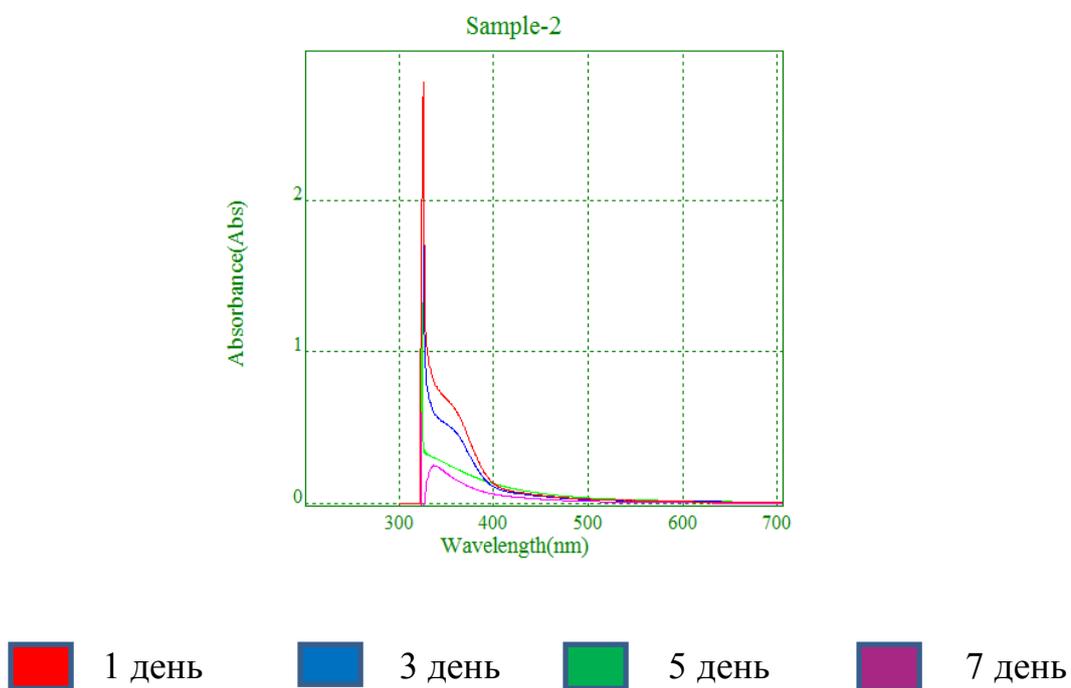


Рисунок 6 - Спектрофотометрический анализ деградации 250 мкг/мл (100 ПДК) прометрина штаммом *Pseudomonas putida* П2 в среде М9 при температуре 28 °С, рН=7 и интенсивной аэрации

Сравнительный анализ деструкции прометрина при интенсивной аэрации, но при разной рН не выявил существенных различий. Значит, кислотность среды не влияет на деструкцию прометрина.

*Поиск микроорганизмов, использующих углерод пестицидов ДДТ и ГХЦГ среди деструкторов прометрина*

В качестве пестицидов были выбраны препараты ДДТ и ГХЦГ, ПДК которых была превышена в месте их захоронения в Саратовской области.

Изучение способности штамма П2 разлагать данные пестициды показало, что препарат на основе штамма *Pseudomonas putida* П2 можно использовать и при загрязнении хлорорганическими пестицидами ДДТ и ГХЦГ, так как он способен использовать их в качестве единственного источника углерода [3].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По масштабам производства и потребления одним из ведущих гербицидов является препарат сим-триазинового ряда прометрин который в больших количествах вносится в почву и накапливается в ней. Поскольку этот гербицид на сегодняшний день остается неотъемлемой частью сельскохозяйственных технологий, то очень остро стоит вопрос о выборе оптимальных стратегий трансформации и удаления его из окружающей среды. Одним из основных факторов трансформации и детоксикации ксенобиотиков в окружающей среде являются почвенные микроорганизмы.

На основе штамма *Pseudomonas putida* П2 создан биопрепарат, который испытан в загрязненной почве в лабораторных и полевых условиях. Полученные данные открывают перспективы для использования разработанного биопрепарата для ремедиации почв, загрязненных препаратами, с действующими веществами прометрин. Однако на микробиологические процессы трансформации в почве очень сильно влияют почвенно-климатические условия. Вследствие этого, процессы деградации могут протекать с разной интенсивностью. В связи с чем, встает вопрос о

рекомендациях использования полученного препарата и выборе условий, при которой биоремедиация почвы будет наиболее эффективной [4].

В связи с этим, для исследования возможностей биопрепарата на основе *Pseudomonas putida* П2, нами было изучено влияние аэрации, рН и температуры на скорость деструкции. Результаты экспериментов показали, что при температуре +5<sup>0</sup>С штамм *Pseudomonas putida* П2 не способен расти при значениях рН=5, рН=7 и интенсивной аэрации. Следовательно, температура +5<sup>0</sup>С является критической и в данных условиях этот штамм не способен осуществлять биodeградацию прометрина. Видимо, при низких температурах не происходит синтеза нужных ферментов деградации [6].

В дальнейшем нами изучена интенсивность деструкции пестицида при температуре 28 с, но при разных значения рН и аэрации.

Анализ деструкции прометрина при температуре 28<sup>0</sup>С и рН=7 показал, что на 3 день исследования, согласно калибровочному графику концентрация пестицида снизилась до 90 мкг/мл, деструкция пестицида составила 64 %. На 7 день происходило снижение концентрации пестицида до 18 мкг/мл. Таким образом, при температуре 28<sup>0</sup>С и нейтральной среде за 7 дней разлагается до 93% пестицида. Изучение спектров деструкции прометрина при температуре 28<sup>0</sup>С, но рН=5 показало незначительное снижение деструкции пестицида на 3 день (деструкция составила 57 % препарата). Однако на 7 день концентрация препарата достигла 18 мкг/мл и соответствовала 93%. Таким образом, при температуре 28<sup>0</sup>С кислотность среды не влияет на деструкцию пестицида.

В аналогичных опытах по изучению деструкции при интенсивной аэрации, но при различных показателях рН (нейтральной и кислой среде) выявлено слабое торможение процесса деградации, однако, процент разложения препарата оставался довольно высоким и составил около 90 %. В условиях интенсивной аэрации кислотность среды также не влияет на скорость деструкции прометрина.

Таким образом, при внесении препарата в почву, не требуется дополнительных рекультивационных мероприятий по рыхлению почвы. Деструкция прометрина будет протекать одинаково как в нейтральных, так и в почве с киллой реакцией.

Для расширения возможностей биопрепарата на основе штамма *Pseudomonas putida* П2, используемого при деградации прометрина, нами изучена возможность его применения при загрязнении другими пестицидами. В качестве пестицидов были выбраны препараты ДДТ и ГХЦГ, ПДК которых была превышена в почве территории их захоронения в Саратовской области.

Изучение способности штамма *Pseudomonas putida* П2 использовать углерод пестицидов ДДТ и ГХЦГ показало, что биопрепарат можно использовать и при загрязнении данными пестицидами.

## ВЫВОДЫ

1. При температуре  $+5^{\circ}\text{C}$ , интенсивной аэрации и значениях  $\text{pH}=5$  и  $\text{pH}=7$  штаммом *Pseudomonas putida* П2 не способен использовать углерод из пестицида прометрина.
2. При температуре  $+28^{\circ}\text{C}$  процесс деградации идет с одинаковой интенсивностью при  $\text{pH}=5$  и  $\text{pH}=7$ . В течение 7 дней отмечено снижение концентрации пестицида с 250 мкг/мл до 18 мкг/мл, т.е. деструкции подвергалось 93 % препарата.
3. Интенсивная аэрация слабо влияет на скорость деструкции прометрина штаммом *Pseudomonas putida* П2. В течение 7 дней деструкция препарата составила 90 %, что на 3% ниже, чем при естественной аэрации. Следовательно, при внесении препарата в почву, не требуется дополнительных рекультивационных мероприятий по рыхлению почвы.
4. Выявленная способность штамма *Pseudomonas putida* П2 позволяет использовать углерод пестицидов дихлордифенилтрихлорметилметана

(ДДТ) и гексахлорциклогексана (ГХЦГ), позволяет использовать данный штамм для очистки почвы, загрязненной не только прометрином, но и этими хлорорганическими пестицидами.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Игнатовец, О.С. Механизм разложения прометрина бактериями рода *Pseudomonas* / О.С. Игнатовец, В.Н. Леонтьев // Доклады НАН Беларуси. 2008. Т.52, № 3. С.81-85.
2. Круглов, Ю.В. Микрофлора почвы и пестициды / Ю.В. Круглов Москва: Агропромиздат, 1991. 128 с.
3. Сеги, Ж. Методы почвенной микробиологии / Ж. Сеги Москва: Колос, 1983. 285 с.
4. Круглов, Ю.В. Микробиологические методы оценки экологической опасности применения пестицидов / Ю.В. Круглов, Л.Н. Пароменская. Москва: ВАСХНИЛ, 1991. 46 с.
5. Pelletier, E. Crude oil bioremediation in sub-Antarctic intertidal sediments: chemistry and toxicity of oiled residues / E. Pelletier, D. Delille, B. Delille // Mar. Environ. Res. 2004. Vol. 57, № 4. P. 311-327.
6. Горбатова, О.Н. Триазиновые пестициды: структура, действие на живые организмы, процессы деградации / О.Н. Горбатова, А.В. Жердев, О.В. Королева // Успехи биологической химии. 2006. Т.46. С.323-348.
7. Ладони, В.Ф. Справочник по гербицидам / В.Ф. Ладони. Москва: Россельхозиздат, 1977. 192 с.
8. Медведь, Л.И. Справочник по пестицидам (гигиена применения и токсикология) / Л.И. Медведь. Москва: Урожай, 1974. 448 с.