

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 рН 5, рН 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 +28⁰С и отсутствие роста при температуре +5⁰С. Следовательно, штамм *Pseudomonas putida* П2 не способен использовать прометрин в качестве единственного источника углерода при температуре +5⁰С. 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).

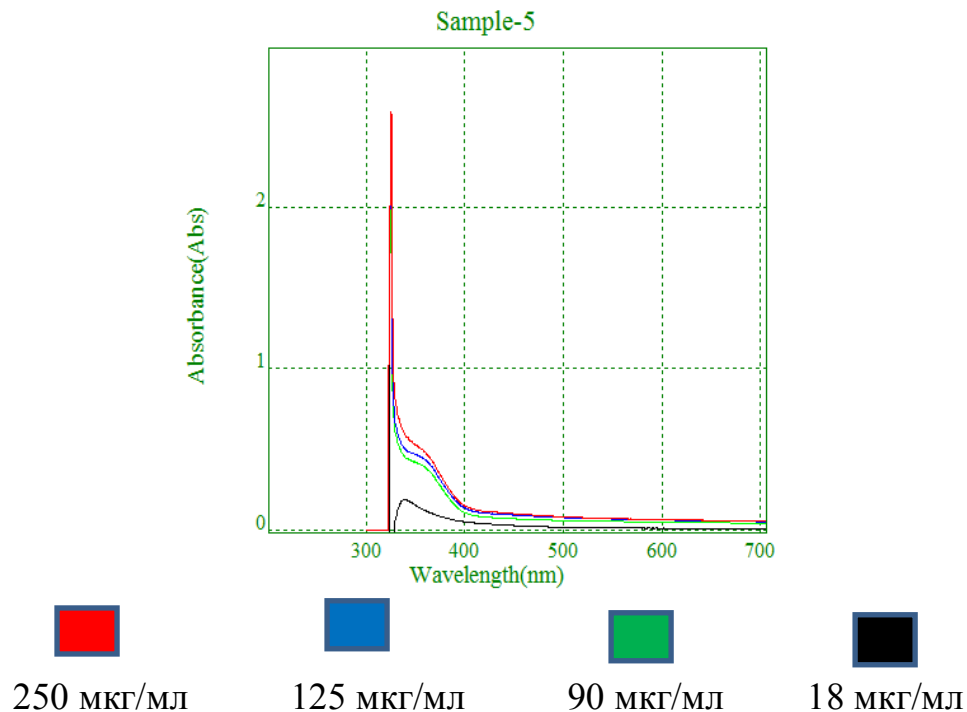


Рисунок 2 - Калибровочный график зависимости концентрации ГСО прометрина от оптической плотности

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).

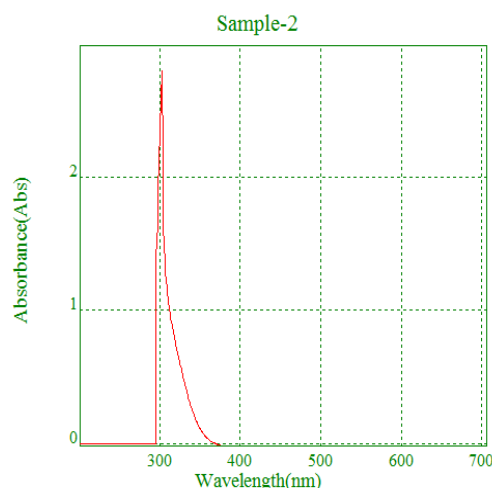
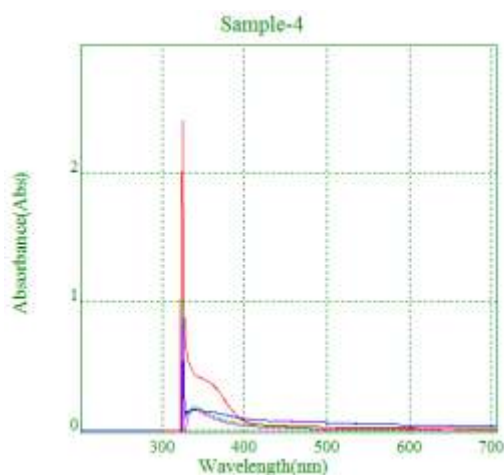


Рисунок 3 – Контроль прометрина в среде М9 при 28 °С, рН=7

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

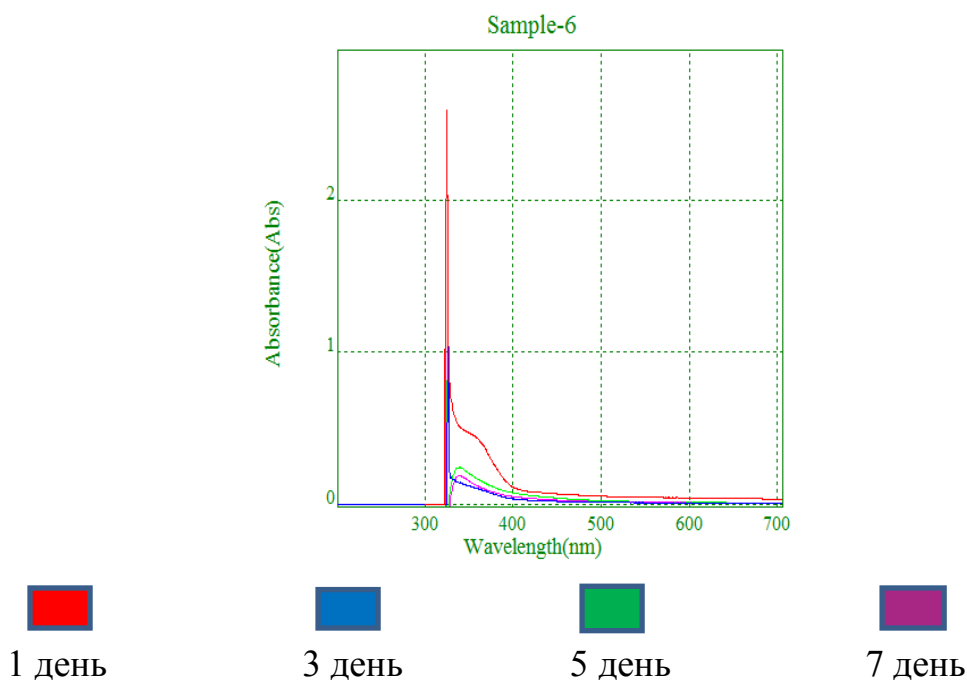


Рисунок 5 - Спектрофотометрический анализ деструкции 250 мкг/мл (100 ПДК) прометрина штаммом *Pseudomonas putida* П2 в среде М9 при температуре 28 °С и рН=5

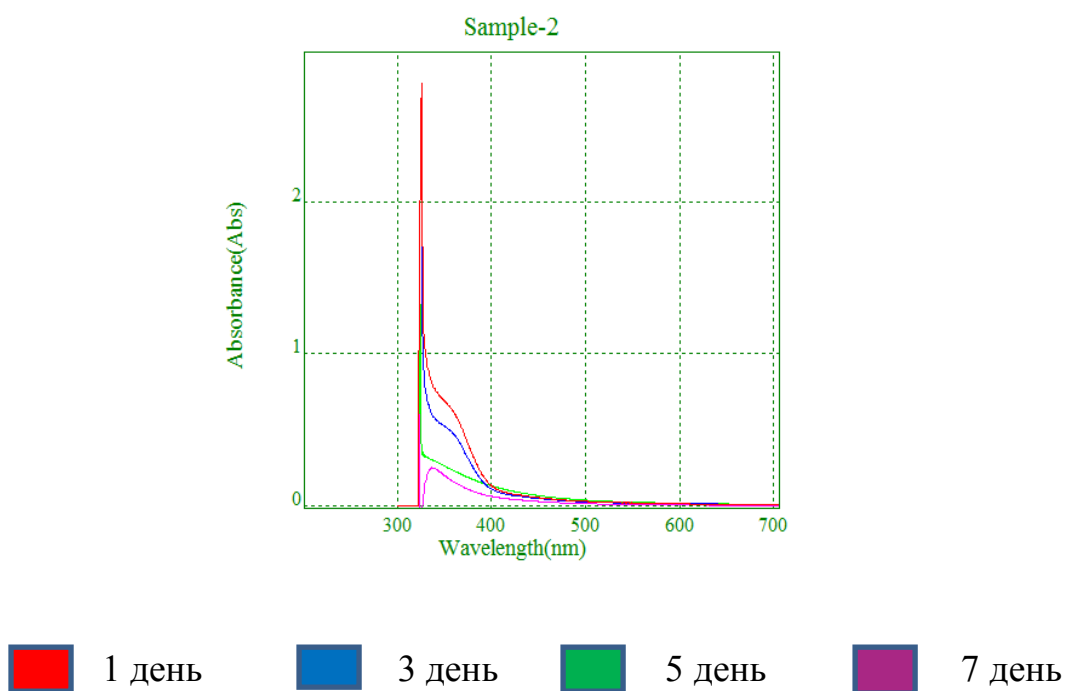


Рисунок 6 - Спектрофотометрический анализ деструкции 250 мкг/мл (100 ПДК) прометрина штаммом *Pseudomonas putida* П2 в среде М9 при температуре 28 °С, рН=7 и интенсивной аэрации

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 штамм *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, pH и температуры на скорость деструкции. Результаты экспериментов показали, что при температуре +5⁰С штамм *Pseudomonas putida* П2 не способен расти при значениях pH=5, pH=7 и интенсивной аэрации. Следовательно, температура +5⁰С 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 pH и аэрации.

Анализ деструкции прометрина при температуре 28⁰С и pH=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 28⁰С и нейтральной среде за 7 дней разлагается до 93% пестицида. Изучение спектров деструкции прометрина при температуре 28⁰С, но pH=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 28⁰С кислотность среды не влияет на деструкцию пестицида.

В аналогичных опытах по изучению деструкции при интенсивной аэрации, но при различных показателях pH (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.