

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

**ДЕСТРУКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЕННЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ С МЕСТ ЗАХОРОНЕНИЯ
ПЕСТИЦИДОВ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента(ки) __4__ курса __422__ группы
направления (специальности) подготовки бакалавр 06.03.01 Биология

биологического факультета

Филимоновой Екатерины Александровны

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

В настоящее время ведение сельского хозяйства предполагает использование химических средств борьбы с вредителями возделываемых растений – пестицидов. Интенсивное применение этих препаратов приводит к непрерывной закупке все новых пестицидов. Большую проблему представляют старые, пришедшие в негодность и запрещенные препараты, которые необходимо как-то утилизировать. Потенциальную опасность для окружающей среды и человека несут места их захоронения – специальные подземные бетонированные бункеры, колодцы и склады. В результате нарушения режимов хранения пестициды проникают в почву, распространяются с осадками и грунтовыми водами и накапливаются в почве [1-4]. В результате длительного контакта почвы с химикатами среди почвенных микроорганизмов происходит адаптация к высоким концентрациям пестицидов и происходит накопление штаммов деструкторов.

В связи с этим целью работы явилось выделение и изучение деструктивной активности микроорганизмов, выделенных с мест захоронения пестицидов.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ численности основных физиологических групп микроорганизмов в загрязненной почве и почве фоновой территории с места захоронения пестицидов в р-не с. Корнеевка Саратовской области.
2. Отобрать штаммы, способные использовать пестициды как источник углерода и изучить их деструктивную активность.
3. Идентифицировать штаммы микроорганизмов, способные к деструкции пестицидов.
4. Изучить выделенные штаммы на наличие патогенных свойств.

Материал исследований

1. Почва с места захоронения пестицидов и фоновой территории (почва территории, на расстоянии 1-3 км от места захоронения) в Краснопартизанском районе Саратовской области.
2. ГСО пестицидов прометрин, гексахлорциклогексана (ГХЦГ), трихлорметилди(N-хлорфенил)метана (ДДТ).
3. Культуры микроорганизмов, выделенные из почвы с места захоронения пестицидов

Структура работы

Диплом изложен на 42 страницах и содержит разделы: введение, основная часть, заключение, выводы и список использованных источников. В основной части содержатся главы: 1.1. Утилизация пестицидов; 1.2 Влияние пестицидов на микроорганизмы почв; 1.3 Деструкция пестицидов микроорганизмами. 2. Материалы и методы исследований. 3. Результаты исследований и их обсуждение. Работа иллюстрирована 13 рисунками 5 таблицами. Список использованных источников состоит из 47 источников, 6 из которых зарубежных авторов.

Научная новизна

Выделены штаммы микроорганизмов деструкторов родов *Brevibacterium* и *Bacillus*, деструктирующих 200 мкг/мл ДДТ в течение 6 дней, не обладающих патогенными свойствами и занимающие доминирующее положение в почве, загрязненной пестицидами. Данные штаммы можно рекомендовать для создания высокоэффективного экологически безопасного препарата, предназначенного для очистки почвы, загрязненной большим количеством пестицида ДДТ.

Положения, выносимые на защиту

- В почве, загрязненной пестицидами, преобладают аммонифицирующие бактерии и снижено количество плесневых грибов.

- Доминирующими популяциями среди органотрофных бактерий в загрязненной почве явились штаммы родов *Brevibacterium* и *Bacillus*.
- Бактерии рода *Brevibacterium* и *Bacillus* в качестве единственного источника углерода используют 4,4-ДДТ.
- Доказано разложение пестицида через образование промежуточного продукта в области 400 нм, который также подвергался полной деструкции на 6 день эксперимента.

Основное содержание

Микробиологический анализ почвы с мест захоронения пестицидов

Учет микроорганизмов проводили методом Коха – метод основан на механическом разведении микробных клеток. Проводили учет микроорганизмов различных физиологических групп: аммонифицирующие бактерии; азотфиксирующие бактерии; плесневые грибы; актиномицеты. Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Численность почвенных микроорганизмов на территории захоронения пестицидов (* $P \leq 0,05$)

Физиологическая группа бактерий	Численность микроорганизмов, КОЕ/г (M±m)	
	Загрязненная почва	Фоновая территория (на расстоянии 1000 м)
Аммонифицирующие бактерии	$(4,0 \pm 0,2) \cdot 10^8$	$(3,7 \pm 0,4) \cdot 10^6$
Азотфиксирующие бактерии	$(3,8 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^5$
Плесневые грибы	$(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^3$	$(12,7 \pm 1,1) \cdot 10^3$
Актиномицеты	$(2,7 \pm 0,2) \cdot 10^3$	$(2,5 \pm 0,4) \cdot 10^3$

Получение чистых культур микроорганизмов деструкторов

Важным условием для дальнейшей микробиологической работы являлось изолирование отдельных штаммов микроорганизмов и получение чистых культур для изучения индивидуальных деструктивных свойств.

Получение чистых культур осуществляли механическим разобщением на поверхности плотной питательной среды (метод штриха с обжигом петли) [7]

Изучение биологических свойств микроорганизмов деструкторов

Для характеристики и идентификации микроорганизмов деструкторов проводили изучение культуральных, морфологических и биохимических признаков исследуемых штаммов [4].

Культуральные свойства изучали путем описания характера роста бактерий на твердых и жидких средах в течение 14 дней.

Морфологические свойства изучали путем микроскопирования, измерения клеток, выявления подвижности и принадлежности к грамположительным или грамотрицательным бактериям.

Изучение биохимических свойств проводили следующими тестами: определение способности к анаэробному росту, изучение сахаролитической активности, оксидазы, образование промежуточного продукта – ацетоина на среде Кларка (тест Фогес-Проскауера), выявление способности к гидролизу крахмала осуществляли на крахмальной среде с последующей обработкой раствором Люголя, определяли способность к гидролизу мочевины, желатина и казеина, определяли образование побочных газообразных продуктов расщепления пептонов (аммиак, сероводород и индол).

Идентификацию выделенных деструкторов проводили по совокупности культуральных, морфологических, тинкториальных и биохимических признаков с использованием девятого и десятого изданий определителя бактерий Берджи [8-9].

Отбор штаммов деструкторов

Отбор штаммов деструкторов проводили на минеральной (синтетической) среде М9 (использовали в качестве базовой безуглеродной среды для культивирования микроорганизмов, селективных по углероду) с

добавлением ТТХ [5]. В качестве источника углерода использовали ГСО пестицидов: прометрин, ГХЦГ и ДДТ. Результаты представлены в таблице 2. Таблица 2 – Анализ способности использовать пестициды в качестве единственного источника углерода в концентрации 200 мкг/мл в среде М9

Штамм деструктор	Пестицид (название)		
	Прометрин	4,4-ДДТ	ГХЦГ
<i>Brevibacterium sp. 111</i>	–	+	–
<i>Bacillus sp. 114</i>	–	+	–
<i>Bacillus sp. 129</i>	–	+	–
<i>Bacillus sp. 102</i>	–	–	–
<i>Bacillus sp. 105</i>	–	–	–
<i>Bacillus sp. 106</i>	–	–	–
<i>Bacillus sp. 107</i>	–	–	–
<i>Bacillus sp. 109</i>	–	–	–
<i>Bacillus sp. 110</i>	–	–	–
<i>Bacillus sp. 111.1</i>	–	–	–
<i>Bacillus sp. 112</i>	–	–	–
<i>Bacillus sp. 123</i>	–	–	–
<i>Bacillus sp. 128</i>	–	–	–
<i>Bacillus sp. 140</i>	–	–	–
<i>Bacillus sp. 140.1</i>	–	–	–

Из 14 штаммов микроорганизмов, деструктивную активность проявили 3 штамма: *Brevibacterium sp. 111*, *Bacillus sp. 114*, и *Bacillus sp. 129*.

Изучение патогенных свойств штаммов деструкторов

При отборе штаммов, рекомендуемых для практического использования в объектах окружающей среды, необходимо проводить их полную биологическую характеристику. Важным условием, предъявляемым к производственным штаммам, является отсутствие у них свойств патогенности. В связи с этим, у отобранных штаммов были изучены такие факторы патогенности, как: мацерация клубней картофеля, моркови и

свёклы; способность к гемолизу эритроцитов; плазмокоагулазная и лецитиназная активность [4]. Результаты представлены в таблице 3.

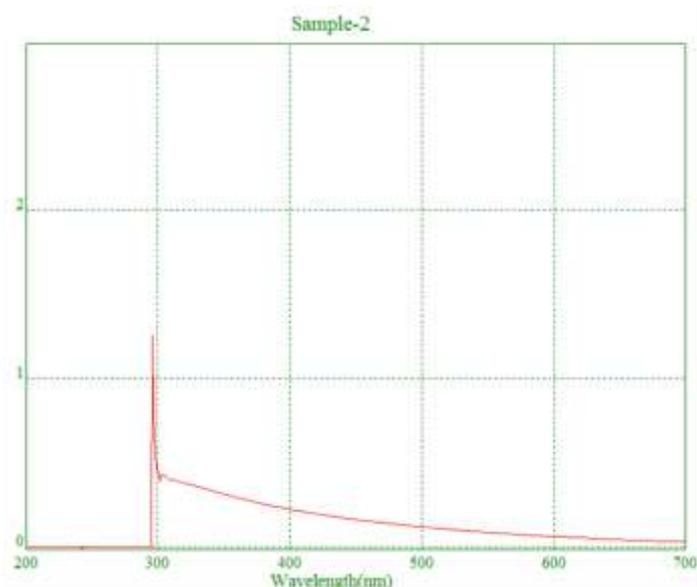
Таблица 3 – Анализ патогенных свойств штаммов деструкторов

Штамм деструктор	Патогенные свойства			
	Гемолитическая активность	Плазмокоагулазная активность	Лецитиназная активность	Мацерация
<i>Brevibacterium sp. 111</i>	–	–	–	–
<i>Bacillus sp.114</i>	–	–	–	–
<i>Bacillus sp.129</i>	–	–	–	–

По результатам эксперимента ни один из штаммов не обладает патогенными свойствами.

Спектрофотометрический анализ деструкции пестицидов штаммами бактерий

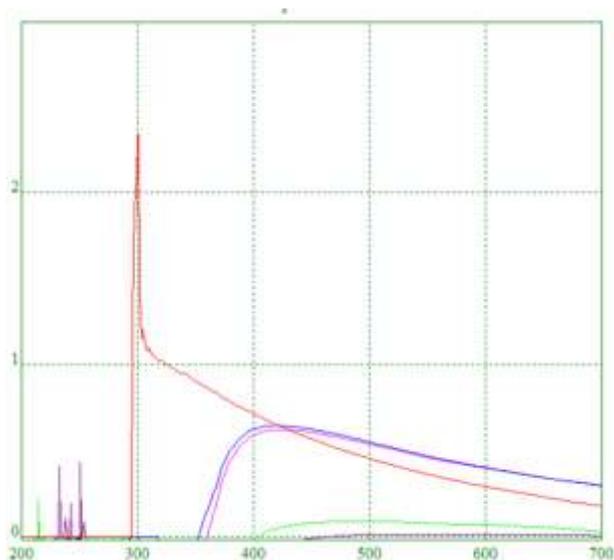
Так как штамм *Brevibacterium sp. 111*, *Bacillus sp.114* и *Bacillus sp.129* проявили дегидрогеназную активность на среде М9 с пестицидам ДДТ в качестве единственного источника углерода, нами был проведен спектрофотометрический анализ для подтверждения деструкции. При анализе спектров ГСО пестицида в течение 7 дней пестицида ДДТ были установлены пики, которые не подвергались изменениям. При добавлении микроорганизмов в среду, наблюдение вели именно за этими пиками. Спектрограммы деструкции пестицидов представлены на рисунках 2, 3, 4.



1-6 день ■

Рисунок 10 – Спектрофотометрический анализ 200 мкг/мл (100 ПДК) 4,4-ДДТ в среде М9

Из рисунка видно, что на 7 день концентрация пестицида остается без изменений. Следовательно, пестицид не подвергается изменениям в среде М9 в течении 7 дней. В дальнейшем, нами были изучены спектры концентрации пестицида в среде с микроорганизмами. Таким образом, при добавлении микроорганизмов в среду любые изменения в спектре можно принимать за деструкцию пестицида.



1 день



4 день



2 день



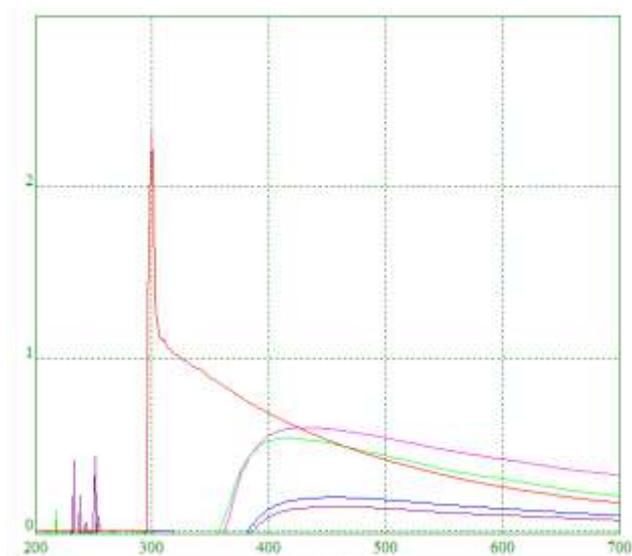
5 день



3 день  6 день 

Рисунок 2 – Спектрофотометрический анализ деструкции 200 мкг/мл (100 ПДК) ДДТ штаммом *Brevibacterium sp. 111* в среде М9

Анализ деструкции 200 мкг/мл (100 ПДК) ДДТ штаммом *Brevibacterium sp. 111* в среде М9 показал, что на 3 день культивирования образуется новый продукт трансформации пестицида с пиком поглощения в области 400 нм. На 7 день отмечено снижение концентрации данного продукта.



1 день  4 день 
2 день  5 день 
3 день  6 день 

Рисунок 3 – Спектрофотометрический анализ деструкции 200 мкг/мл (100 ПДК) ДДТ штаммом *Bacillus sp. 114* в среде М9

Анализ деструкции 200 мкг/мл (100 ПДК) ДДТ штаммом *Bacillus sp. 114* в среде М9 показал, что на 3 день культивирования образуется новый продукт трансформации пестицида с пиком поглощения в области 400 нм. На 7 день отмечено снижение концентрации данного продукта.

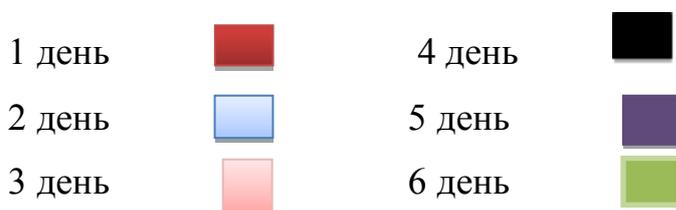
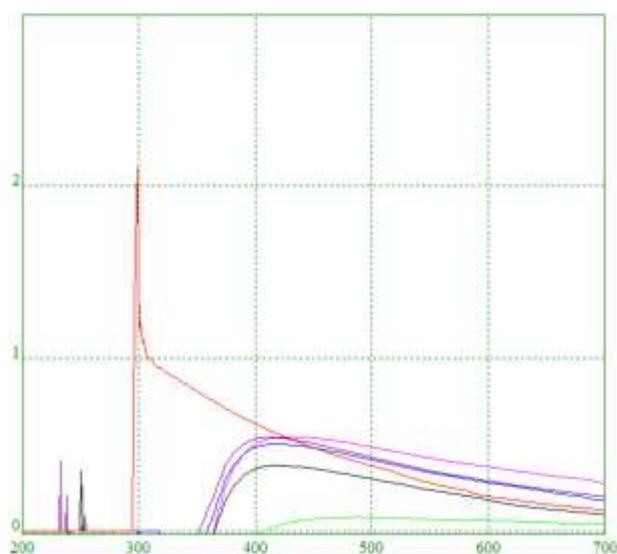


Рисунок 4 – Спектрофотометрический анализ деструкции 200 мкг/мл (100 ПДК) ДДТ штаммом *Bacillus sp. 129* в среде М9

Анализ деструкции 200 мкг/мл (100 ПДК) ДДТ штаммом *Bacillus sp. 129* в среде М9 показал, что на 3 день культивирования образуется новый продукт трансформации пестицида с пиком поглощения в области 400 нм. На 7 день отмечено снижение концентрации данного продукта.

По результатам экспериментов, полученный штамм бактерий *Brevibacterium sp.* и *Bacillus sp.* являются перспективными штаммами для создания биопрепарата, предназначенного для деструкции ДДТ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В почве на территории захоронения пестицидов, по сравнению с фоновой территорией увеличена численность гетеротрофных бактерий и снижено количество плесневых грибов. Количественные показатели азотфиксирующих бактерий и актиномицетов в загрязненной почве существенно не отличались от показателей фоновой территории. А целлюлозоразлагающие микроорганизмы вообще отсутствовали в почве с

места захоронения пестицидов. Таким образом, наличие в почве пестицидов как органического вещества стимулировало размножение органотрофных бактерий. А снижение плесневых грибов и целлюлозоразлагающих бактерий может быть вызвано наличием в загрязненной почве хлорорганических пестицидов, ингибирующих их рост.

Изучение численности микроорганизмов так же показало, что доминирующей группой в загрязненной почве явились гетеротрофные бактерии. На основании изученных морфологических, культуральных и биохимических признаков штаммов, среди доминирующих популяций преобладали бактерии рода *Bacillus*. В связи с этим поиск микроорганизмов деструкторов проводили в этой группе. Для этого у выделенных штаммов изучена способность использовать углерод из пестицидов. В результате экспериментов установлено, что бактерии родов *Bacillus* и *Brevibacterium* в качестве единственного источника углерода использовали только 4,4-ДДТ.

Таким образом, исследования показали, что в местах захоронения химикатов в почве содержатся микроорганизмы деструкторы, не только адаптированные к высоким концентрациям загрязняющих веществ, но и обладающие способностью к разложению различных по химической природе соединений. По результатам экспериментов, полученные штаммы бактерий родов *Bacillus* и *Brevibacterium* могут быть задепонированы как деструкторы инсектицида. 4,4-ДДТ.

ВЫВОДЫ

1. В почве с места захоронения пестицидов численность аммонифицирующих бактерий составила $4,0 \pm 0,2 \cdot 10^8$ КОЕ/г, что в 2 раза превышало таковую в почве фоновой территории (контроль). Количество плесневых грибов было снижено с $12,7 \pm 1,1 \cdot 10^3$ до $1,6 \pm 0,2 \cdot 10^3$ КОЕ/г. Численность азотфиксирующих бактерий и актиномицетов в загрязненной почве существенно не отличалась от показателей фоновой территории.

2. Среди бактерий, выделенных с места захоронения пестицидов преобладали штаммы рода *Bacillus*.
3. Штаммы бактерий рода *Bacillus* и *Brevibacterium* не способны использовать углерод пестицидов прометрин и ГХЦГ, но используют его из пестицида 4,4-ДДТ. Спектрофотометрически доказано разложение пестицида через образование промежуточного продукта в области 400 нм, который также подвергался полной деструкции на 6 день эксперимента.
4. Штаммы деструкторы 4,4 - ДДТ *Bacillus* sp. 114, *Bacillus* sp. 129 и *Brevibacterium* sp. 111 не обладают гемолитической, плазмокоагуляционной, лецитиназной активностью и не осуществляют мацерацию клубней картофеля, корнеплодов моркови и свёклы.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сметник, А.А. Прогнозирование миграции пестицидов в почве: диссертация ... доктора биологических наук: 06.01.11; 03.00.27. М: 1999. 389 с.
2. Путилина, В.С. Миграция загрязняющих органических соединений в подземные воды / В.С. Путилина, Геоэкология, инженерная геология, гидрогеология, геокриология. 2003. №4. С. 309-317.
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Н.С. Егоров М.: МГУ, 1995. 222 с.
4. Петерсон, А.М. Практические рекомендации для идентификации сапрофитных и условно-патогенных бактерий по фенотипическим признакам: для студ. биол. фак-та / А.М. Петерсон, П.А. Чиров Саратов: Изд-во ун-та, 2005. 20 с.
5. Способ выявления микроорганизмов – деструкторов ксенобиотиков / Т.А. Гранатская [и др.] // Патент Российской Федерации № 2051961, кл С12N1/20. 1996.

6. Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов [и др.] М.: Издательский центр «Академия». 2005. 608 с.
7. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта [и др.] // М.: Мир. 1997. Т. 2. 1232 с. (1)
8. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria / G. M. Garrity, D.J. Brenner, N.R. Krieg et al. // New York: Springer. 2005. Vol. 2. 1388 p.
9. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes / P. De Vos, G. Garrity, D. Jones et al. // New York: Springer. 2009. Vol. 3.