

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

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИЙ
ДЕСТРУКТОРОВ ПЕСТИЦИДОВ**
АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы
направления подготовки магистратуры 06.04.01 – Биология
биологического факультета
Нестеровой Ирины Сергеевны

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 2017

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Применение пестицидов спасло миллионы человеческих жизней, но, тем не менее, их негативное влияние на здоровье прослежено, выявлено и доказано. Основная масса пестицидов – до 95% – попадает в организм человека с продуктами питания. При этом хлорароматики обладают канцерогенными и мутагенными свойствами, способными передаваться по наследству. Кроме того, пестициды пагубно влияют на состояние почв, разрушают естественные экосистемы, вызывают необратимые изменения в структуре биоценоза, вызывают различные заболевания человека (бесплодие, эндокринные нарушения, астма, аутизм, лейкемия, рак мозга, рак молочной железы и др.) [1-5].

Для ликвидации пестицидных загрязнений почв применяются методы: механические, физико-механические, термические, химические, агротехнические, комбинированные [2].

Приемлемым с экологической точки зрения предпочтение отдается биотехнологическим методам. На сегодняшний день имеется большой выбор биопрепаратов и технологий их использования при очистке нефтяных загрязнений [2]. Для очистки почв от пестицидных загрязнений препаратов очень мало.

В связи с этим учеными ведутся активные поиски перспективных штаммов деструкторов пестицидов. Однако для практического использования биопрепарата необходимо изучить биологические свойства всех, входящих в его состав микроорганизмов.

Цель нашего исследования – изучение биологических особенностей бактерий деструкторов пестицидов.

Задачи исследования:

1. Определить антагонистическую активность бактерий деструкторов в отношении других штаммов.

2. Изучить фитопатогенные свойства бактерий деструкторов: мацерирующую способность, целлюлолитическую активность способность вызывать некроз растительной ткани

3. Определить у штаммов деструкторов способность поражать сосудистую систему и вызывать увядание растений.

4. Изучить влияние микроорганизмов деструкторов на всхожесть семян.

5. Определить у бактерий деструкторов наличие ферментов, обуславливающих инвазивность бактерий в отношении животных и человека.

Материал исследований:

В работе использованы 18 штаммов деструкторов пестицидов родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Amphibacillus* и *Jenesia* выделенные студентами кафедры микробиологии и физиологии СГУ.

Научная новизна

Впервые получены штаммы деструкторов пестицидов Прометрин, ГХЦГ и ДДТ, не обладающие фитопатогенными свойствами, стимулирующие рост редиса и не обладающие инвазивностью в отношении человека и животных.

Практическая значимость

Штаммы деструкторы пестицидов прометрин, ГХЦГ и ДДТ *Peudomonas putida* П2, *P.putida* П6 и *Bacillus sp.* не образуют ферментов, обуславливающих инвазивность в отношении животных и человека, а следовательно могут быть использованы в составе биопрепарата по ремедиации земель, загрязненных пестицидами Прометрин, ГХЦГ и ДДТ.

Апробация работы

Материалы по данной работе были доложены на 8-й Международной научно-практической конференции «Экологические проблемы промышленных городов» в СГТУ, г. Саратов, апрель 2017 г.

Имеются 2 публикации:

1) Д.А. Тихонова, Е.А. Филомонова, С.А. Тяпкин, И.С. Нестерова, О.Ю. Ксенофонтова Влияние аэрации и кислотности среды на деструкцию пестицида прометрина штамма *Pseudomonas putida* П2. Экологические проблемы промышленных городов: сборник научных трудов по материалам 8-й Международной научно-практической конференции. Саратов. Изд-во СГТУ, 2017 г. С. 295-298.

2) Е.А. Филомонова, Д.А. Тихонова, С.А. Тяпкин, И.С. Нестерова, О.Ю. Ксенофонтова. Деструктивная активность почвенных микроорганизмов, выделенных с мест захоронения пестицидов. Экологические проблемы промышленных городов: сборник научных трудов по материалам 8-й Международной научно-практической конференции. Саратов. Изд-во СГТУ, 2017 г. С. 299-302.

Положения, выносимые на защиту

1. Штаммы деструкторы *P.putida* П2, *P.putida* П6 и *Bacillus sp.* 154 не образуют ферментов, обуславливающих инвазивность бактерий в отношении животных и человека, не способны к мацерации растительных тканей, не обладают целлюлолитической активностью, не вызывают некроз растительной ткани, пятнистость листьев растений и активно стимулируют рост редиса.

2. Штаммы деструкторы пестицидов прометрина, ГХЦГ и ДДТ *Pseudomonas .putida* П2, *P.putida* П6 и *Bacillus sp.*154 не образуют плазмокоагулазу фибринолизин и аргининдегидролазу.

Структура работы

Диплом изложен на 39 страницах и содержит разделы: введение, основная часть, заключение, выводы и список использованных источников. В основной части содержатся главы: 1.1 Бактерии – деструкторы ксенобиотиков; 1.2 Критерии, которым должны соответствовать микроорганизмы деструкторы, предназначенные для создания биопрепаратов.

Основное содержание:

Определение антагонистических свойств и биологической совместимости выделенных штаммов деструкторов осуществляли на ГРМ агаре, используя каждый штамм в качестве тест микроорганизма.

В результате проведенных экспериментов выявлены антагонистические взаимоотношения между некоторыми штаммами деструкторами.

Установлено, что штаммы *Brevibacterium sp. 111*, *Jenesia denitrificans 151*, *Bacillus sp. 129*, *Pseudomonas solonacearum П5*, *Pseudomonas alcaligenes 8.3.2*, *Bacillus sp. 114*, *Bacillus drentensis П3*, *Pseudomonas fluorescens 8.2* и *P. putida П4* проявили чувствительность к бактериям деструкторам. Следовательно, они не могут входить в состав биопрепарат из-за снижения численности в результате совместного культивирования. В результате проведенного эксперимента в дальнейших экспериментах будут принимать участие только 8 штаммов, не проявившие чувствительность при совместном культивировании (таблица 1).

Таблица 1 – Штаммы деструкторы пестицидов, не проявившие чувствительность методом перпендикулярных штрихов на МПА

| Штамм | Деструктор прометрина | Деструктор ГХЦГ | Деструктор ДДТ |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------------|----------------|
| 1. <i>Pseudomonas putida П2</i> | + | + | + |
| 2. <i>P. putida 8.3.1</i> | + | - | - |
| 3. <i>P. putida П6</i> | + | + | + |
| 4. <i>P. putida П7</i> | + | - | - |
| 5. <i>Amphibacillus xylanus 165</i> | + | - | + |
| 6. <i>A. xylanus 150</i> | + | - | + |
| 7. <i>Bacillus sp. 154</i> | + | + | + |
| 8. <i>A. xylanus 152</i> | - | - | + |

Определение способности мацерировать растительную ткань

При применении биопрепарата для ремедиации загрязненных земель, необходимо изучить фитопатогенные свойства штаммов, входящих в состав препарата. Так как предполагается внесение препаратов в почву, на которой могут возделываться различные растения, необходимо, чтобы культуры бактерий не вызывали инфекций у растительных организмов. В связи с этим

нами было проведено изучение фитопатогенных свойств бактерий деструкторов. Результаты исследования приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Определение способности мацерировать растительную ткань

| Штаммы | | Тест-объекты | | |
|--------|--|------------------------|-----------------------|------------------------|
| | | Картофель (клубень) | Свекла (корнеплод) | Морковь (корнеплод) |
| 1. | <i>P.putida П2</i> | - | - | - |
| 2. | <i>P. putida 8.3.1</i> | + | + | - |
| 3. | Штамм П6 | - | - | - |
| 4. | <i>P. putida П7</i> | - | + | + |
| 5. | <i>Amphibacillus xylanus 165</i> | + | - | - |
| 6. | <i>A. xylanus 150</i> | - | + | + |
| 7. | <i>Bacillus sp. 154</i> | - | - | - |
| 8. | <i>A. xylanus 152</i> | + | + | - |
| 9. | <i>B.simplex 422</i> (положительный контроль) | + | + | + |
| 10. | Отрицательный контроль (без микроорганизма) | - | - | - |

Примечания:

«+» - штамм способен мацерировать исследуемую растительную ткань

«-» - штамм не способен мацерировать исследуемую растительную ткань

На основании полученных результатов исследования, можно констатировать, что штаммы *P.putida П2*, *P. putida П6*, *Bacillus sp. 154* и не способны к мацерации используемых в эксперименте растительных тканей.

Определение целлюлолитической активности микроорганизмов

Под целлюлолитической активностью понимается способность бактерий разлагать целлюлозу. Результаты исследования приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Определение целлюлолитической активности микроорганизмов

| Штаммы | | целлюлолитическая активность |
|--------|--|---------------------------------|
| 1. | <i>P.putida П2</i> | - |
| 2. | Штамм П6 | - |
| 3. | <i>Bacillus sp. 154</i> | |
| 4. | <i>B.simplex 422</i> (положительный контроль) | + |
| 5. | Отрицательный контроль (без микроорганизма) | - |

Примечания:

«+» - наличие целлюлолитической активности

«-» - отсутствие целлюлолитической активности

Анализ полученных результатов показал, что исследуемые штаммы *P.putida П2*, *P.putida П6*, *Bacillus sp. 154* не обладают целлюлолитической активностью, что свидетельствует об отсутствии у данных штаммов целлюлолитических ферментов.

Определение способности микроорганизмов вызывать некроз растительной ткани (реакция гиперчувствительности)

Если растение заразить фитопатогенными бактериями, не являющимися патогенными для данного вида растений, то в месте введения бактерий запускаются быстрые механизмы защитного ответа. Растительные клетки в месте попадания патогена гибнут, что сопровождается локальным почернением и усыханием (некроз растительной ткани). В результате предотвращается распространение патогена по растению.

Результаты исследований по определению способности микроорганизмов вызывать некроз растительной ткани представлены в таблице 4.

В положительном контроле было отмечено почернение листовой пластинки тест-растения на вторые сутки эксперимента в месте введения бактериальной суспензии *B.simplex 422*, которое в дальнейшем (4-5 сутки после инокуляции) стало ярко выраженным.

Таблица 4 – Определение способности микроорганизмов вызывать некроз растительной ткани (реакция гиперчувствительности)

| № | Штаммы | Почернение участка листовой пластинки в месте введения бактериальной суспензии в течение | | | | |
|---|--|--|---------|---------|---------|---------|
| | | 1 суток | 2 суток | 3 суток | 4 суток | 5 суток |
| 1 | <i>P.putida П2</i> | - | - | - | - | - |
| 2 | <i>P.putida П6</i> | - | - | - | - | - |
| 3 | <i>Bacillus sp. 154</i> | - | - | - | - | - |
| 4 | <i>B.simplex 422</i> (фитопатогенный микроорганизм) | - | + | + | ++ | ++ |
| 5 | Отрицательный контроль (без микроорганизма) | - | - | - | - | - |

Примечания:

«+» - почернение участка листовой пластинки в месте введения бактериальной суспензии
«++» - ярко выраженное почернение участка листовой пластинки в месте введения бактериальной суспензии

«-» - отсутствие видимых изменений участка листовой пластинки в месте введения бактериальной суспензии

В отрицательном контроле (стерильная водопроводная вода без микроорганизма) не выявлено почернений листовой пластинки в месте укола. В опытах с *P.putida П2*, *P.putida П6* и *Bacillus sp. 154* не было выявлено почернений участков листовой пластинки тест-растения в месте введения бактериальной суспензии каждого из штаммов в течение всего эксперимента (на протяжении 5 суток). Данные штаммы не обладают способностью вызывать некроз растительной ткани.

Исследование фитопатогенности микроорганизма путем заражения опрыскиванием (томат)

Результаты исследования: в опытах с *P.putida П2*, *P.putida П6* и *Bacillus sp. 154* не было выявлено изменений опытных тест-растений по сравнению с контролем в течение всего эксперимента (на протяжении 3 суток). Данные штаммы не обладают способностью вызывать пятнистости листьев растений.

Влияние микроорганизма деструктора на всхожесть семян

Рост стимулирующие свойства штаммов микроорганизмов деструкторов, перспектива для создания биопрепарата комплексного действия (очищение почвы и стимулятор роста).

В керамические сосуды, содержащие по 1 кг сухой каштановой почвы, вносили суспензию микроорганизмов *P.putida П2*, *P.putida П6* и *Bacillus sp. 154* отдельно. После перемешивания и увлажнения почвы производили посев семян редиса 50 шт. на повторность. В контроле суспензию микроорганизмов не вносили. Опыт проводили в условиях естественной температуры и равномерного увлажнения. Результаты проведенных опытов представлены в таблице 5.

Полученные данные свидетельствуют, что растения в опытных вариантах по всем основным показателям роста и развития заметно опережали контроль. Особенно активно стимулировали рост редиса микроорганизмы *P.putida П2*, *P.putida П6*. Взвеси культур в концентрации

10⁶КОЕ/мл стимулировали всхожесть семян и увеличивали вес стеблей и корней.

Таблица 5 – Влияние суспензии микроорганизмов на рост и развитие семян редиса

| № п/п | Варианты | Кол-во проросших семян, (M±m) шт. | Длина стеблей мм (M±m) | Длина корней мм (M±m) | Вес стеблей г (M±m) | Вес корней г (M±m) |
|-------|---|-----------------------------------|------------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|
| 1. | Контроль без микроорганизмов | 34,5±1,2 | 89,1±1,3 | 35,8±1,4 | 0,2±0,02 | 0,2±0,2 |
| 2. | <i>P.putida</i> П2 (по 10 ⁶ КОЕ/мл) | 61,3±0,9 | 105,0±1,9 | 31,6±1,6 | 0,4±0,02 | 0,3±0,5 |
| 3. | <i>P.putida</i> П6 (по 10 ⁶ КОЕ/мл) | 60,3±1,7 | 95,0±1,7 | 35,0±1,2 | 0,3±0,01 | 0,4±0,4 |
| 4. | <i>Bacillus sp.</i> 154 (по 10 ⁶ КОЕ/мл) | 60,6±1,4 | 100,0 ±1,9 | 30,0±1,1 | 0,2±0,02 | 0,5±0,2 |

Определение ферментов, обуславливающих инвазивность бактерий в отношении животных и человека

Анализ полученных результатов, что у исследуемые штаммы *P.putida* П2, *P.putida* П6 и *Bacillus sp.* не образуют ферментов, обуславливающих инвазивность бактерий в отношении животных и человека, а следовательно могут быть использованы в составе биопрепарата по ремедиации земель, загрязненных пестицидами Прометрин, ГХЦГ и ДДТ.

Таблица 6 – Определение ферментов, обуславливающих инвазивность бактерий в отношении животных и человека

| Штаммы | Плазмо-коагулаза | Фибриноли-зин | Аргинин-дегидролаза |
|--|------------------|---------------|---------------------|
| 1. <i>P.putida</i> П2 | - | - | - |
| 2. Штамм П6 | - | - | - |
| 3. <i>Bacillus sp.</i> 154 | - | - | - |
| 4. <i>B.simplex</i> 422 (положительный контроль) | + | + | - |
| 5. Отрицательный контроль (без микроорганизма) | - | - | - |

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комплекс мероприятий, завершающихся получением разрешения на использование биопрепарата, обычно включает в себя работы по таксономической идентификации штаммов биодеструкторов (для микроорганизмов, выделенных из природных сред), составление паспорта на биопрепарат, удостоверяющего его медицинскую и эколого-гигиеническую безвредность. Для микроорганизмов, используемых при производстве биопрепаратов, установлены определенные правила:

- они должны быть фено- и генотипически классифицируемыми;
- они не должны обладать патогенностью;
- они должны быть изолированы из тех сред обитания, в которые они будут вноситься;
- они должны обладать полезным воздействием на растения, подтвержденным лабораторными исследованиями и клиническими наблюдениями;
- при длительном использовании они не должны вызывать побочные эффекты у человека и растений;

Только доказавшие свою клиническую эффективность в контролируемых исследованиях штаммы могут быть использованы для производства биопрепаратов.

В связи с этим, целью данного исследования явилось изучение биологических свойств штаммов деструкторов пестицидов для создания на их основе биопрепарата по ремедиации земель, загрязненных пестицидами прометрин, ГХЦГ и ДДТ.

В ходе проведенных экспериментов установлена антагонистическая активность некоторых штаммов, в результате которой подавлялись штаммы *Brevibacterium sp. 111*, *Jenesia denitrificans 151*, *Bacillus sp. 129*, *Pseudomonas solonacearum П5*, *Pseudomonas alcaligenes 8.3.2*, *Bacillus sp. 114*, *Bacillus drentensis П3*, *Pseudomonas fluorescens 8.2*. и *P. putida П4*. Следовательно,

данные культуры не могут быть использованы для совместного культивирования с другими штаммами и далее не использовались в опытах.

В дальнейшей работе приняли участие штаммы *P.putida П2*, *P. putida 8.3.1*, *P. putida П6*, *P. putida П7*, *Bacillus sp. 154*, *Amphibacillus xylanus 165*, *A. xylanus 150* и *A. xylanus 152*.

Согласно правилам, используемых при производстве биопрепаратов, известно, что стартовые штаммы не должны обладать патогенностью для человека и растений. А также должны обладать полезным воздействием на растения. В связи с данными требования, нами проведены лабораторные исследования по изучению фитопатогенных свойств деструкторов путем заражения опрыскиванием и способности м поражать сосудистую систему и вызывать увядание растений. Также нами проведены исследования по определению мацерирующей способности, целлюлолитической активности и способности вызывать некроз растительной ткани (реакция гиперчувствительности). Для определения способности микроорганизмов стимулировать или угнетать рост растений нами проведено исследование по влиянию микроорганизмов деструкторов на всхожесть семян. Для определения патогенности в отношении человека нами проведено определение ферментов, обуславливающих инвазивность бактерий в отношении животных и человека (определение плазмокоагулазы, фибринолизина и аргининдегидролазы).

Анализ полученных результатов, что у исследуемые штаммы *P.putida П2*, *P.putida П6* и *Bacillus sp.* не образуют ферментов, обуславливающих инвазивность бактерий в отношении животных и человека, а следовательно могут быть использованы в составе биопрепарата по ремедиации земель, загрязненных пестицидами Прометрин, ГХЦГ и ДДТ.

ВЫВОДЫ

1. Штаммы *Brevibacterium sp. 111*, *Jenesia denitrificans 151*, *Bacillus sp. 129*, *Pseudomonas solonacearum П5*, *Pseudomonas alcaligenes 8.3.2*, *Bacillus sp. 114*, *Bacillus drentensis П3*, *Pseudomonas fluorescens 8.2.* и *P. putida П4* проявляют чувствительны к бактериям деструкторам.

2. Штаммы деструкторы *P.putida П2*, *P.putida П6* и *Bacillus sp. 154* не образуют ферментов, обуславливающих инвазивность бактерий в отношении животных и человека, не способны к мацерации растительных тканей, не обладают целлюлолитической активностью, не вызывают некроз растительной ткани, пятнистость листьев растений и активно стимулируют рост редиса.

3. Штаммы деструкторы пестицидов прометрина, ГХЦГ и ДДТ *Pseudomonas .putida П2*, *P.putida П6* и *Bacillus sp.154* не образуют ферментов, обуславливающих инвазивность бактерий в отношении животных и человека.