

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

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕРБИЦИДА ГЛИФОСАТА
РИЗОБАКТЕРИЯМИ *RHIZOBIUM MELLILOTI***

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

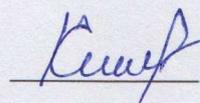
Биологического факультета

Агеевой Анастасии Алексеевны

Научный руководитель

Доцент кафедры микробиологии

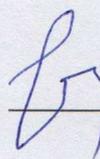
и физиологии растений, к.б.н., доцент



О.Ю. Ксенофонтова

Зав. кафедрой микробиологии

и физиологии растений, д.б.н., профессор



С.А. Степанов

Саратов 2018

Одним из самых негативных для растительной жизни веществ, являются гербициды. С одной стороны, всем нам известно- эти химические вещества активно используются в сельском хозяйстве для борьбы с некультурными растениями, известными нам сорняками. Но, мало кто задумывался, что помогая успешно выращивать культурные формы, гербициды: проникают в почву, образуют ядовитые пары, негативно сказываются на биологической среде, животных, человеку.

Цель нашей работы -изучить возможность использования бактериями рода *Rhizobium*, гербицида глифосата.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи.

1. Выявить способность использовать бактериями *RHIZOBIUM MELLILOTI P221, P1021* глифосат в качестве источника фосфора.
2. Провести сравнительную оценку скорости роста штаммов данных бактерий в присутствии глифосата на разных питательных средах.

Структура и объём работы Работа изложена на 37 страницах текста и включает введение, 3 главы с 9 рисунками, выводы. Список использованных источников содержит 38 наименований.

Краткое содержание работы

Во введении сформулирована актуальность работы, поставлены цели и определены задачи. В первой главе дана систематика и физиологическое строение бактерий рода *Rhizobium*. Во второй главе описана характеристика, свойства, механизм действия гербицида глифосата. В третьей главе описаны материалы и методы, использованные в исследовании. Так же подведены результаты и сделаны выводы.

1 Обзор литературы

1.1 Систематика *Rhizobium*

В жизнедеятельности бобовых растений в их корневую систему проникают специфические бактерии, образующие на ней выпуклые образования- клубеньки. Название этих микроорганизмов «клубеньковые бактерии». Бактериями и растением находятся в симбиотических отношениях. Бактерии питаются органическими соединениями, которые синтезируют растения, а растение получает из клубеньков связанные соединения азота.

Бобовые растения принадлежат к порядку Leguminosae, имеющему несколько семейств. Клубеньки образуются лишь у представителей семейства Papilionaceae.

К бобовым растениям относится около 10 000 видов, 200 из которых используют в сельском хозяйстве. Они играют большую роль в обогащении почвы азотом и в получении сельскохозяйственной продукции, богатой высококачественным белком.

В 1888 г. ученый М. Бейеринк выделил из клубеньков ряда бобовых растений бактерии, относящиеся к роду *Rhizobium*. Клубеньковые бактерии отдельных растений несколько отличаются друг от друга. Поэтому род *Rhizobium* следует рассматривать, как целую группу родственных микроорганизмов. С собой эти бактерии представляют граммотрицательные неспорообразующие аэробные палочки шириной от 0,5 до 0,9 мкм и длиной от 1,2 до 3 мкм. [1, 2].

1.2 Физиологическое строение

В качестве источника азота клубеньковые бактерии могут использовать различные соединения — соли аммония и азотной кислоты, многие аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, биурет и т. д. На обычных средах в чистых культурах клубеньковые бактерии не усваивают молекулярный азот. В последние годы установлено, что на специфических питательных средах при отсутствии кислорода чистые культуры *Rhizobium* усваивают некоторое количество молекулярного азота.

Клубеньковые бактерии могут ассимилировать разнообразные углеводы, в том числе и некоторые полисахариды (декстрин, гликоген). При усвоении углеводов некоторые культуры образуют кислоты. Им доступны также многие органические кислоты и многоатомные спирты.[3].

Необходимый фосфор клубеньковые бактерии усваивают из минеральных и органических соединений. Калий, кальций и другие элементы они получают из неорганических веществ. Клубеньковым бактериям нужны также железо, некоторые микроэлементы (молибден и др.).

1.3 Экологическое значение

Взаимоотношения между бобовыми растениями и клубеньковыми бактериями, обеспечивающие хорошую и энергичную фиксацию азота, создаются при действии комплекса факторов (оптимальные влажность, аэрация, температура, рН; присутствие в доступной форме фосфора, калия, микроэлементов и т. д.). Обычно почвы содержат в достаточно большом количестве клубеньковые бактерии тех видов бобовых растений, которые имеются в составе дикой флоры данной местности или длительное время там культивируются. [11]. Если указанные растения не произрастают и не имеется родственных по инокуляционной способности видов, то свойственные им клубеньковые бактерии в данных почвах отсутствуют.

На количество клубеньковых бактерий в почве влияют ее свойства и состояние. Например, в нейтральных почвах (черноземах и др.) бактерии размножаются лучше, чем в кислых, и здесь чаще встречаются их активные формы. Окультуривание почв, особенно связанное с внесением органических удобрений, улучшает условия для размножения клубеньковых бактерий.

2.1 Характеристика

Глифосат — фосфометил-глицин — один из наиболее широко используемых в мире неселективных гербицидов системного действия.

Препаративные формы на основе глифосата эффективны для уничтожения глубоко укореняющихся многолетних сорняков, однолетних и двухлетних широколистных сорняков, водных сорных растений. Глифосат применяется на посевах широкого спектра сельскохозяйственных культур, в садах и парках, в водном и лесном хозяйстве [16].

Глифосат может применяться на различных стадиях роста: до всходов и после всходов сельскохозяйственных культур (в качестве гербицида) и перед сбором урожая (в качестве десиканта).

2.2 Механизм действия глифосата

Действие глифосата на растения заключается в ингибировании энзима 5-энолпирувил-шикимат-3-фосфат-синтазы (EPSPS), который необходим для образования ароматических аминокислот: тирозин, триптофан и фенилаланин [17], участвующих в синтезе протеина растений и в образовании многих вторичных растительных продуктов таких, как промоторы и ингибиторы роста, фенолы и лигнины [17,18].

EPSPS находится в хлоропластах большинства растений, но отсутствует у животных. С этим и связана избирательная токсичность глифосата. В связи с этим глифосат обладает относительно низкой токсичностью для млекопитающих, птиц и рыб [18,19].

Пути деградации глифосата в объектах окружающей среды и растениях включают фотохимическое и химическое разложение и разрушение под действием микроорганизмов.

3.Материал и методы

3.1Материал исследования

Объектом исследования являлись музейные штаммы бактерий *Sinorhizobium meliloti P221* и *Rhizobium meliloti P1021*. Штаммы бактерий были выделены из корневища растения, которое росло в загрязненной почве. Данный штамм является деструктором полициклических ароматических

соединений. Штаммы представляют практическую ценность. Образуют эффективный симбиоз с люцерной. Форма колоний на питательных средах - округлые колонии беловатого цвета. Являются подвижными, Грам-отрицательными палочками. Используемые нами бактерии строгие аэробы.

В качестве источника фосфора использовался гербицид Раундап («Монсанто», США) выпускаемый компанией Monsanto, действующим веществом которого является глифосат.

По физиологическому строению глифосат - ярко-зеленое, тягучее по консистенции средство с ярко-выраженным запахом. Имеющего химическое название (фосфометил) и имеющий химическую формулу $C_3H_8NO_5P$

Для увеличения биомассы музейных штаммов, производили засев на питательные среды MS и LB. Среды готовили по классическому рецепту.

3.2 Методы исследования

Микробиологические исследования начинали с предварительной подготовки питательных сред и стерилизации посуды. Важным условием при мытье лабораторной посуды была обработка калиевым раствором во избежание любого попадания молекул глифосата. Так как при наличии фосфора, мы не могли бы провести фосфорное голодание.

После приготовления питательных сред разливали в 6 чашек Петри. 3 чашки со средой MS. 3 чашки со средой LB. Для осуществления фосфорного голодания готовили среду MS без глутамата натрия и глифосата. Объем сред составлял 2л. В качестве буферного раствора добавляли Tris в количестве 6г/л.

Перед началом эксперимента музейные штаммы засеваем на чашки с минеральной средой LB.

От общего объёма отливали среду в конические колбы по мере расхода на опыт. На то, чтобы провести смыв с чашек отливали среду MS без глутамата натрия и глифосата в объёме 300мл. Для осуществления процесса фосфорного голодания использовали 6 колб на 100 мл с 30 мл.

После подготовки необходимой посуды и сред производили засев заранее выращенных культур культур на 6 чашек Петри (3MS 3LB). Инкубация проводилась в термостате при температуре 28градусов

После выращивания необходимой биомассы производили смыв с чашек. В каждую чашку добавляли по 3мл исходной среды. Смыв производился классическим методом. После доавления среды для смыва размещивали культуральную массу обожженным стеклянным шпателем. После этого переливали в заранее подготовленные стерильные колбы для центрифугирования. Производили центрифугирование в микробиологической центрифуге в течении 10 минут при 9000об/мин. Повторяли процедуру 3 раза для лучшего результата.

После этого производили засев в конические колбы на 100мл В них содержалось по 30мл чистой среды MS с добавлением глутамата натрия на голодание. Голодание проводилось на вращающейся микробиологической качалке при t 29, 160 оборотов/мин.

После завершения процесса голодания, переливали суспензию в пробирки для центрифугирования и производили центрифугирование. Осадок, образовавшийся на дне пробирки разводили чистой средой MS для смыва. И делали засев полного объёма в 4 колбы на 250мл с содержанием 100мл среды MS + глутамат Na + глифосат 0,3 мкл/100 мл среды. Для осуществления контроля в 2 колбы добавляли K_2HPO_4 .

Перед началом измерения оптической плотности биомассы, вычисляли изначальную оптическую плотность на спектрофотометре. Все колбы с контролем и с добавленным глифосатом инкубировались в микробиологической качалке с теми же условиями.

Со следующих суток после засева ежедневно проводили контроль оптической плотности на спектрофотометре. Двнную методику проводили одинаково для обоих штаммов бактерий рода *Rhizobium*.

3.3 Результаты исследования

Измеряя оптическую плотность, мы наблюдали увеличение биомассы обоих штаммов, растущих на использованных нами средах. Самый интенсивный рост был обнаружен в колбе- контроле с содержанием фосфора в прямом доступе. В обоих культурах рост активно возрастал на 3-5 сутки исследования. По истечении 10 дней, рост прекращался, следующее время два держался на исходном значении. Это означало, что весь глифосат был использован бактериями в качестве источника фосфора. Штамм P1021. активнее рос смытый с чашек со средой LB. Меньшая активнсть наблюдалась у штамма, смытого со среды MS. Это можно связать с тем, что LB более богатая, насыщенная среда, содержит в составе триптон и дрожжевой экстракт. Штамм P221 так же выращивался в данных условиях, но рост наблюдался менее интенсивный, чем у штамма P1021.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наиболее широко используемым в мире фосфонатом является гербицид системного действия глифосат, который служит основой более трех десятков препаратов, выпускаемых под разными фирменными названиями и потребляемых в больших количествах. Использование биологических методов утилизации токсичного глифосата, отходов его производства и продуктов разложения, рассматривается в качестве главной альтернативы физическим и химическим методам защиты окружающей среды от токсикантов этого типа.

По мимо попадания на растительные культуры, глифосат попадает в землю, попадает в почву, воздух, животных. Мы подтвердили на практике, что в био-ремедиации могут использоваться штаммы бактерий рода *Rhizobium*. При фосфорном голодании, активируется ген, который позволяет в качестве источника использовать молекулы глифосата.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Умаров М. М. Микробиологическая трансформация азота в почве. М.: ГЕОС, 2007. С 20-22.
2. Вельков В.В. Биоремедиация: принципы, проблемы, подходы. Биотехнология 3–4, 1995.С 20–27.
3. Зексер Б. Интегрированная защита растений: в ногу со временем / Б. Зексер, А.А. Кириенко // Агрехимия. 1992. №11. С. 8.
- 4 Данилишин, Б.М. Химизация земледелия: поиски новых альтернатив / Б.М. Данилишин // Вестник сельскохозяйственной науки. 1992.№5–6. С. 157–162
5. Зинченко В.А. Химическая защита растений: средства, технология и экологическая безопасность: учебное пособие для вузов / В.А. Зинченко. М.: КолосС, 2005. 232 с.

