

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

**МИКРОБНЫЙ СОСТАВ ПОЧВ ИЗ МЕСТ ЗАХОРОНЕНИЯ
ПЕСТИЦИДОВ И ЕГО ДЕСТРУКЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента(ки) 2 курса 241 группы
направления (специальности) подготовки магистратуры 060401 Биология
биологического факультета
Савиной Ксении Викторовны

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 связи с широким применением пестицидов в сельском хозяйстве большое внимание уделяется проблеме их токсичного воздействия на микроорганизмы почвы, обеспечивающие почвообразовательные процессы. Влияя на микробное сообщество, пестициды изменяют направленность и скорость процессов, определяющих плодородие почвы. В связи с этим целесообразно изучать деятельность микроорганизмов в почвах, загрязненных пестицидами [1-8].

В связи с вышесказанным, целью работы явилось поиск эффективных микроорганизмов деструкторов прометрина, гексахлорциклогексана (ГХЦГ) и трихлорметилди (N-хлорфенил)метана (ДДТ).

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Изучить микробиологический состав почвы с места захоронения пестицидов и фоновой территории в Советском районе Саратовской области.
2. Определить доминирующие популяции микроорганизмов в почве.
3. Выделить чистые культуры микроорганизмов доминирующих популяций.
4. Отобрать штаммы микроорганизмов, использующие пестициды прометрин, гексахлорциклогексан (ГХЦГ) и трихлорметилди(N-хлорфенил)метан (ДДТ) в качестве единственного органического источника углерода.
5. Изучить морфологические, культуральные и биохимические свойства штаммов деструкторов с целью идентификации.
6. Определить деструктивный потенциал культур и отобрать наиболее перспективные штаммы для создания биопрепаратов, предназначенных для очистки почв от пестицидов прометрин, гексахлорциклогексан (ГХЦГ) и трихлорметилди(N-хлорфенил)метан (ДДТ).

Материалами исследования явились:

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

Диплом содержит такие структурные элементы: Содержание, Сокращения, Введение, Основная часть, Заключение, Выводы, Список использованных источников, Приложение. В свою очередь, Основная часть содержит такие главы:

- Общая характеристика пестицидов, в которой рассматривались классификации пестицидов, основные механизмы очищения почвы от пестицидов, методы и способы активации почвенных микроорганизмов.
- Материалы и методы исследований, в которой рассматривались материалы исследований, методы исследований.
- Результаты исследований, в которой рассматривается микробиологический анализ почвы с места захоронения пестицидов, получение чистых культур микроорганизмов деструкторов и изучение их биологических свойств, поиск микроорганизмов деструкторов среди доминирующих популяций микроорганизмов, изучение деструктивной активности *Jonesia denitrificans* по отношению к прометрину, 4,4-ДДТ и ГХЦГ.

Научная новизна: из почвы, с места захоронения пестицидов из аборигенной микрофлоры впервые выделен штамм *Jonesia denitrificans* обладающий деструктивной способностью к разложению сразу трех пестицидов прометрина, ГХЦГ, 4,4-ДДТ.

Положения, выносимые на защиту:

- В почве, загрязненной пестицидами, преобладают органотрофные бактерии и снижено количество плесневых грибов.
- Доминирующими популяциями среди органотрофных бактерий в загрязненной почве явились штаммы родов *Amphibacillus* и *Bacillus*.
- Бактерии рода *Amphibacillus xylanus* в качестве единственного источника углерода используют 4,4-ДДТ, а штамм *Jonesia denitrificans* явился деструктором прометрина, ГХЦГ и 4,4-ДДТ.

Основное содержание

Микробиологический анализ почвы с места захоронения пестицидов

Известно, что каждый тип почвы имеет характерное для него содержание гумуса, ряда нерастворимых и растворимых органических веществ (полисахариды, липиды, сахара органические кислоты и спирты, аминокислоты, витамины, ферменты и т.д.), ряда неорганических веществ, определённые значения рН и окислительно-восстановительные условия. В поддержании ряда отмеченных факторов большое, а часто и решающее значение имеет жизнедеятельность микроорганизмов. Работы ряда авторов, и особенно советских учёных во главе со Звягинцевым Д.Г. [9], показали, что для разных почв характерны разные ассоциации (комплексы почвенных доминирующих микроорганизмов). При возникновении сдвигов в системе, вызванных в результате загрязнения химикатами, включаются микроорганизмы, которые приводят почвенную систему в состояние равновесия. Следовательно, эти культуры оказываются адаптированными к условиям загрязнения и среди таких микроорганизмов могут встречаться штаммы деструкторы этих токсикантов. Поэтому в своей работе мы провели микробиологический анализ почвы с места захоронения пестицидов для определения доминирующих популяций. Полученные данные представлены в таблице 1.

Анализ полученных данных (таблица 1) показал, что в загрязненной почве 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 пестицидов, ингибирующих их рост.

Таблица 1 – Численность почвенных микроорганизмов на территории захоронения пестицидов и фоновой территории

Физиологическая группа бактерий	Численность микроорганизмов, КОЕ/г (M±m)	
	Загрязненная почва	Фоновая территория (на расстоянии 1000 м)
Гетеротрофные бактерии	$6,4 \pm 0,6 * 10^6$	$2,7 \pm 0,4 * 10^6$
Азотфиксирующие бактерии	$2,6 \pm 0,2 * 10^5$	$1,5 \pm 0,2 * 10^5$
Плесневые грибы	$2,9 \pm 0,7 * 10^3$	$16,2 \pm 1,1 * 10^3$
Актиномицеты	$3,1 \pm 0,4 * 10^3$	$3,5 \pm 0,4 * 10^3$
Целлюлозоразлагающие микроорганизмы	0	$2,3 \pm 0,1 * 10^3$

Изучение численности микроорганизмов так же показало, что доминирующей группой в загрязненной почве явились гетеротрофные бактерии. В связи с этим поиск микроорганизмов деструкторов проводили в этой группе.

Получение чистых культур микроорганизмов деструкторов и изучение их биологических свойств

В ходе дальнейшей работы были выделены чистые культуры из доминирующих популяций гетеротрофных бактерий. В результате эксперимента выделено 9 штаммов бактерий, содержащиеся в почве в концентрации 10^6 КОЕ/мл. У данных культур были изучены

морфологические, культуральные и биохимические признаки с целью идентификации.

На основании изученных признаков штаммов, среди доминирующих популяций преобладали споровые бактерии родов *Amphibacillus* и *Bacillus*. Возможно, именно наличие споры позволяет им адаптироваться и выживать в условиях загрязнения химикатами.

Поиск микроорганизмов деструкторов среди доминирующих популяций микроорганизмов

В дальнейшей работе у выделенных штаммов изучена способность использовать углерод из пестицидов. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Анализ способности использовать пестициды в качестве единственного источника углерода в концентрации 200 мкг/мл в среде М9

Штаммы бактерий	Пестицид (название)		
	Прометрин	4,4-ДДТ	ГХЦГ
<i>Amphibacillus xylanus. 165</i>	-	+	-
<i>Amphibacillus xylanus. 181</i>	-	-	-
<i>Amphibacillus xylanus. 150.2</i>	-	+	-
<i>Amphibacillus xylanus.152</i>	-	+	-
<i>Bacillus sp. 154</i>	-	-	-
<i>Bacillus sp. 166</i>	-	-	-
<i>Bacillus sp. 179</i>	-	-	-
<i>Jonesia denitrificans 151</i>	+	+	+
<i>Staphylococcus sp. 180</i>	-	-	-

Анализ полученных данных показал, что бактерии родов *Bacillus* и *Staphylococcus* не способны деструктировать ни один из исследуемых пестицидов. Бактерии рода *Amphibacillus xylanus* в качестве единственного

источника углерода использовали только 4,4-ДДТ, а штамм *Jonesia denitrificans* оказался деструктором всех сразу трех пестицидов.

Изучение деструктивной активности Jonesia denitrificans по отношению к прометрину, 4,4-ДДТ и ГХЦГ

Так как штамм *Jonesia denitrificans* проявил дегидрогеназную активность на среде М9 с пестицидами в качестве единственного источника углерода, нами был проведен спектрофотометрический анализ для подтверждения деструкции. При анализе спектров ГСО пестицидов в течение 7 дней для каждого пестицида были установлены пики, которые не подвергались изменениям. При добавлении микроорганизмов в среду, наблюдение вели именно за этими пиками. Спектрограммы деструкции пестицидов представлены на рисунках 1, 2, 3.

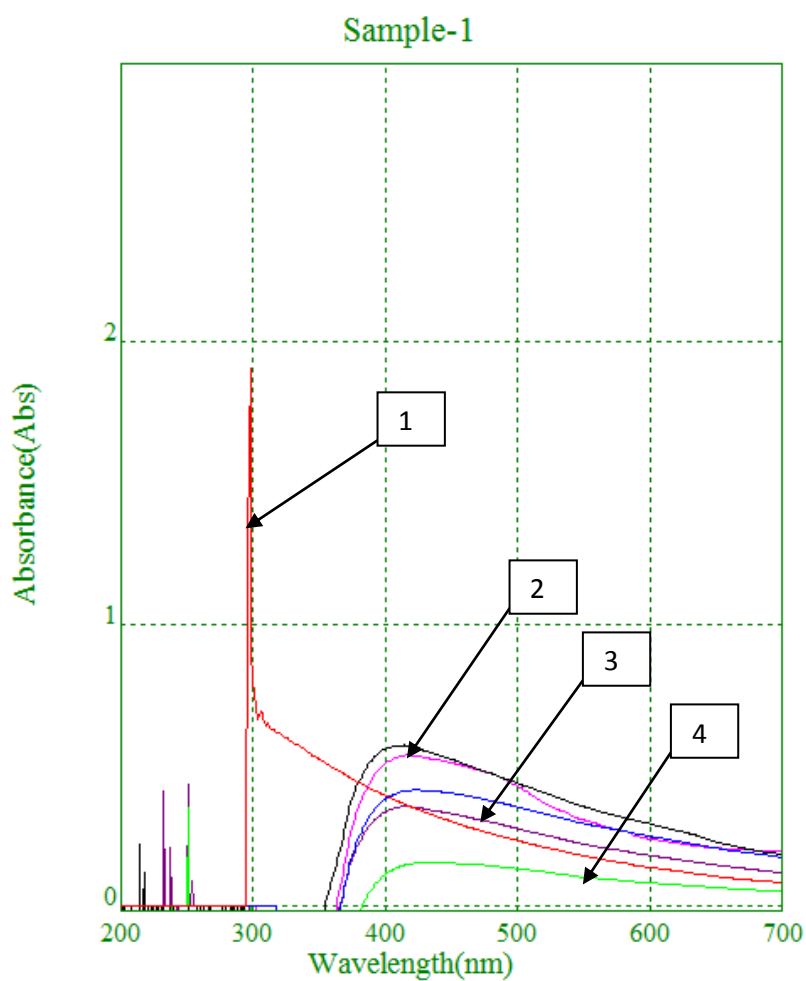


Рисунок 1 Спектрофотометрический анализ деструкции 250 мкг/мл (100 ПДК) 4,4-ДДТ штаммом *Jonesia denitrificans* 151 в среде М9 (1 – 1 день, 2 – 3 день, 3 – 5 день, 4 – 7 день)

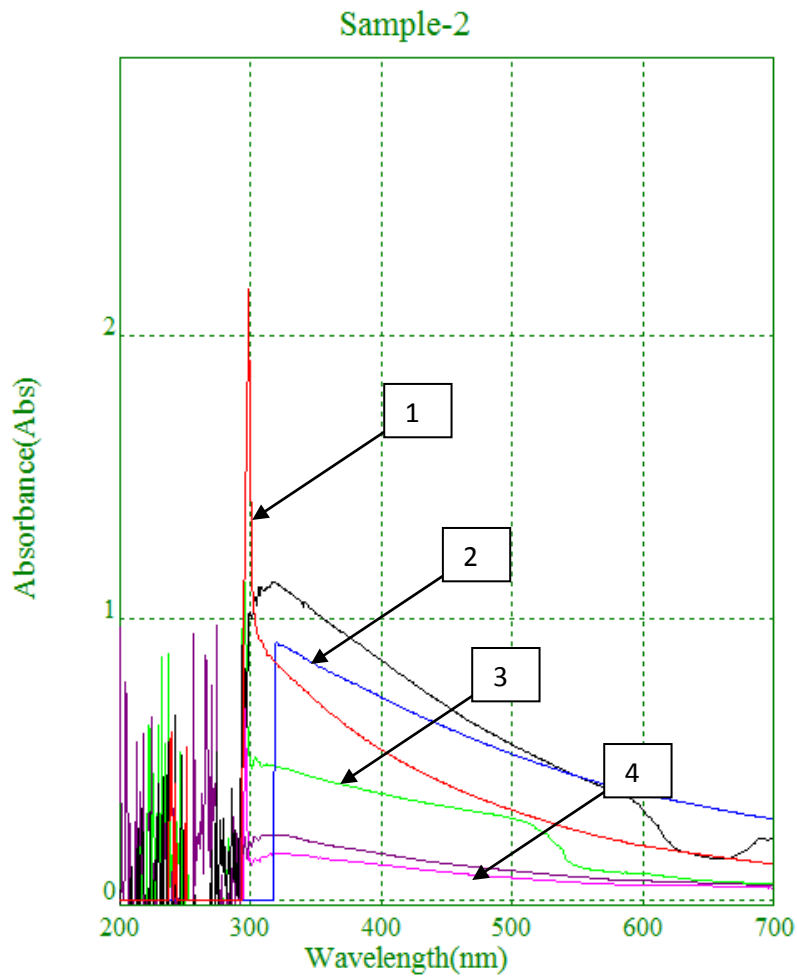


Рисунок 2 Спектрофотометрический анализ деструкции 250 мкг/мл (100 ПДК) ГХЦГ штаммом *Jonesia denitrificans* 151 в среде М9 (1 – 1 день, 2 – 3 день, 3 – 5 день, 4 – 7 день)

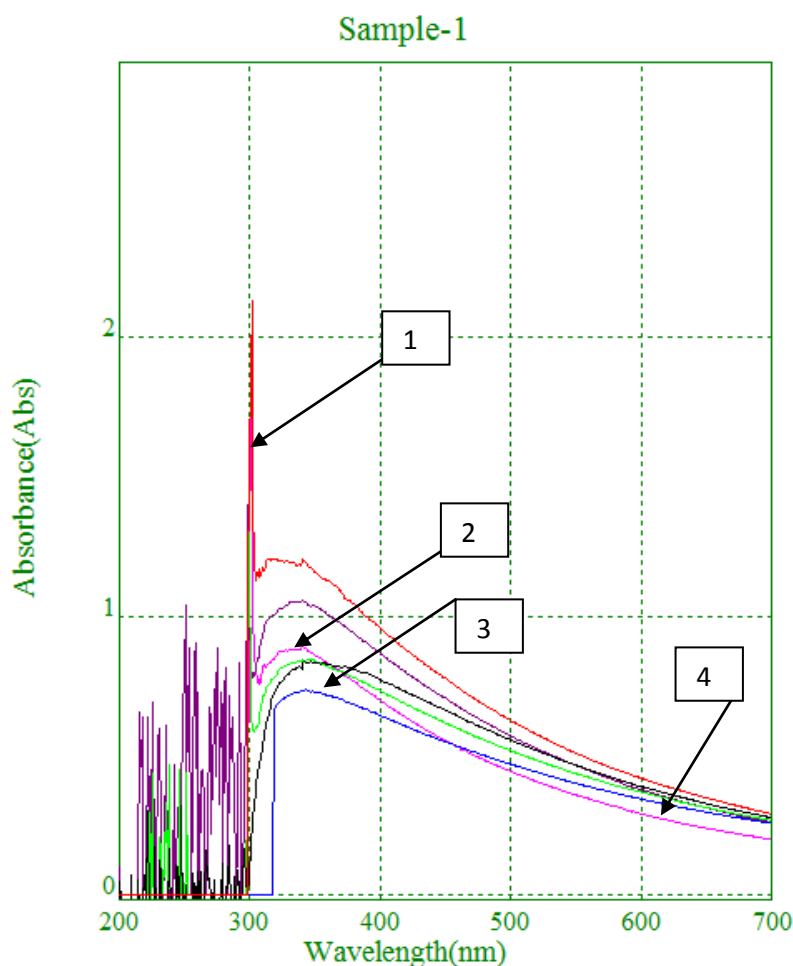


Рисунок 3 Спектрофотометрический анализ деструкции 250 мкг/мл (100 ПДК) прометрина штаммом *Jonesia denitrificans* 151 в среде М9 (1 – 1 день, 2 – 3 день, 3 – 5 день, 4 – 7 день)

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, полученный штамм бактерий *Jonesia denitrificans* является перспективным штаммом для создания биопрепарата, предназначенного для деструкции прометрина, гексахлорциклогексана (ГХЦГ) и трихлорметилди(N-хлорфенил)метана (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 споровые бактерии родов *Amphibacillus* и *Bacillus*. Возможно, именно наличие споры позволяет им адаптироваться и выживать в условиях загрязнения химикатами. 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 *Staphylococcus* не способны деструктировать ни один из исследуемых пестицидов. Бактерии рода *Amphibacillus xylanus* в качестве единственного источника углерода использовали только 4,4-ДДТ, а штамм *Jonesia denitrificans* оказался деструктором всех сразу трех пестицидов, что подтверждено спектрофотометрическим анализом.

ВЫВОДЫ

В почве с места захоронения пестицидов численность гетеротрофных бактерий составила $6,4 \pm 0,6 \cdot 10^6$ КОЕ/г, что в 2 раза превышало таковую в почве фоновой территории (контроль). Количество плесневых грибов было снижено с $16,2 \pm 1,1 \cdot 10^3$ до $2,9 \pm 0,7 \cdot 10^3$ КОЕ/г, а аэробные целлюлозоразлагающие бактерии вообще не выделялись. Численность азотфиксирующих бактерий и актиномицетов в загрязненной почве существенно не отличалась от показателей фоновой территории.

Анализ микробиологического состава почвы места захоронения пестицидов показал, что доминирующими видами в загрязненной почве являются споровые бактерии родов *Amphibacillus* и *Bacillus*.

Методом определения дегидрогеназной активности определены штаммы, способные использовать углерод пестицидов. Так штаммы бактерий рода *Amphibacillus xylanus* использовали углерод только из 4,4-ДДТ, а штамм *Jonesia denitrificans* - из пестицидов прометрина, гексахлорциклогексана и 4,4-ДДТ.

Деструкционная способность штамма *Jonesia denitrificans* к прометрину, гексахлорциклогексану и 4,4-ДДТ изучена спектрофотометрически. Установлено снижение пиков поглощения пестицидов прометрина и гексахлорциклогексана в области 200 нм в течение 7 дней. В среде с 4,4-ДДТ на 3 день культивирования отмечено образование промежуточного продукта с пиком в области 300 нм.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Игнатовец, О.С. Деградация сим–триазиновых гербицидов бактериями рода *Pseudomonas* / О.С. Игнатовец, Т.И. Ахрамович, В.Н. Леонтьев, [и др.] // Микробиология. Труды БГ. 2008. Т 3. С. 61-64.
2. Лебедева, Г.Ф. Влияние некоторых факторов на длительность токсического действия триазинов в почве / Г.Ф. Лебедева // Почвоведение. 1970. № 10. С. 93-96.
3. Головкин, Г.В. Сорбция пестицидов компонентами почвы / Г.В. Головкин, Л.Л. Воловник // Химия в сельском хозяйстве. 1976. Т.23, № 9. С. 48- 57.
4. 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, № 2. С. 323 - 348.
5. Васильева, Г.К. Разработка микробиологического способа для очистки почвы от загрязнения пропанидом и 3,4-дихлоранилином / Г.К. Васильева, З.Г. Суровцева, В.В. Белоусов // Микробиология. 1994. Т.63, № 1. С. 129-144.
6. Заборина, О.Е. Разложение пентахлофенола в почве интродуцированным штаммом *Streptomyces Rochei* 303 и активированной почвенной микрофлорой / О.Е. Заборина, Л.М. Барышникова, Б.П. Баскунов и др. // Микробиология. 1997. Т.66, №5. С. 661-666.
7. Игнатовец, О.С. Механизм деградации симазина бактериями рода *Pseudomonas* / О.С. Игнатовец // Доклады НАН Беларуси. 2006. Т. 51, №. 2. С. 61-64.
8. Watanabe, K. Microorganisms relevant to bioremediation / K. Watanabe // Curr.Opin. Biotechnol. 2001. Vol.12. P. 237–241.
9. Звягинцев, Д.Г. Биология почв / Д.Г. Звягинцев, И.П. Бабьева, Г.М. Зенова // М.: Изд-во МГУ. 2005. 445 с.