

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



10<sup>6</sup>КОЕ/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 <sup>6</sup> 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 <sup>6</sup> 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 <sup>6</sup> 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.