

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

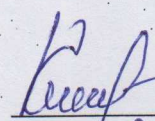
**ВЛИЯНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ДЕСТРУКЦИЮ
ПЕСТИЦИДА ПРОМЕТРИНА ШТАММОМ**

PSEUDOMONAS PUTIDA П2

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

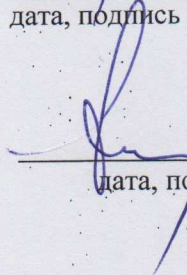
Студента(ки) 2 курса 241 группы
направления (специальности) подготовки магистратуры 06.04.01 Биология
биологического факультета
Артемкиной Дарьи Алексеевны

Научный руководитель
к.б.н., доцент


21.06.18
дата, подпись

О.Ю. Ксенофонтова
инициалы, фамилия

Заведующий кафедрой
д.б.н., профессор


21.06.18
дата, подпись

С. А. Степанов
инициалы, фамилия

Введение

Процессы деградации пестицидов микроорганизмами в природе имеют существенное значение в связи с их участием в превращении продуктов, загрязняющих окружающую среду [1]. По масштабам производства и потребления одним из ведущих пестицидов является препарат сим-триазинового ряда прометрин [2]. В результате его многолетнего повсеместного применения и высокой персистентности реальна опасность стойкого загрязнения почвы, как прометрином, так и продуктами его деградации [2,3,4]. Поскольку этот пестицид на сегодняшний день остается неотъемлемой частью сельскохозяйственных технологий, то очень остро стоит вопрос о выборе оптимальных стратегий трансформации и удаления его из окружающей среды. Из всех известных способов ремедиации, биодеструкция считается наиболее перспективным направлением в технологии рекультивации почвенных систем, загрязненных пестицидами. Однако на процессы трансформации в почве очень сильно влияют микробный состав и почвенно-климатические условия [3,4]. Вследствие этого, процессы деградации могут протекать с разной интенсивностью. В связи с этим, встает вопрос о необходимости изучения скорости разложения пестицидов в различных условиях [3,4].

В результате выше изложенного целью данной работы является изучение влияния абиотических факторов, влияющих на скорость деградации пестицида прометрина штаммом *Pseudomonasputida* П2.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Выявить влияние температуры на процесс деградации прометрина.
2. Определить влияние pH на скорость биодеструкции прометрина.
3. Изучить процесс деградации прометрина штаммом *Pseudomonasputida* П2 при интенсивной и естественной аэрации среды.

Материалы исследований

1.Прометрин - высокоэффективный гербицид для борьбы с однолетними двудольными и злаковыми сорняками.

2.Штамм деструктор прометрина *Pseudomonasputida* П2 выделенный студентами кафедры микробиологии и физиологии СГУ.

Структура работы

Диплом изложен на 52 страницах и содержит такие структурные элементы:Содержание,Сокращения, Введение, Основная часть, Заключение, Выводы и Список использованных источников. В свою очередь основная часть содержит такие главы:

1. Разложение пестицидов в почве, абиотические факторы среды, влияющие на скорость разложения, пестицидов, влияние температуры на эффективность гербицидов, влияние аэрации почвы на степень деструкции пестицидов, влияние pH почвы на деструкцию пестицидов, гидролиз пестицидов, адсорбция пестицидов в почве, влияние агротехнических приемов на скорость разложения пестицидов в почве, миграция пестицидов, разложение пестицидов почвенными микроорганизмами.

2.Материалы и методы исследований, в которой рассматривались материалы исследований, методы исследований.

3.Результаты исследований, в которой рассматривается: Определение способности штамма *Pseudomonasputida* П2 использовать прометрин после длительного пассирования на ГРМ-агаре, изучение способности роста штамма *Pseudomonasputida* П2 в различных условиях температуры, pH и аэрации, определение деструктивной активности штамма *Pseudomonasputida* П2 к прометрину при различной температуре, pH и разных условиях аэрации, исследование патогенных и токсичных свойств штамма *Pseudomonasputida* П2.

Научная новизна

На основе штамма *Pseudomonasputida* П2 создан биопрепарат, который испытан в загрязненной почве в лабораторных и полевых условиях. Полученные данные открывают перспективы для использования разработанного биопрепарата при ремедиации почв, загрязненных препаратами, с действующими веществами прометрин.

Положения, выносимые на защиту

1. Установлено отрицательное влияние температуры + 5 и +43 °С на процесс деградации прометрина штаммом *Pseudomonasputida* П2.
2. Экспериментально доказано что процесс деградации прометрина штаммом *Pseudomonasputida* П2 тормозится при pH 5 и pH9.
3. Изучен процесс деградации прометрина штаммом *Pseudomonasputida* П2 при интенсивной и естественной аэрации среды.

Основное содержание

Способность штамма Pseudomonasputida П2 использовать прометрин после длительного хранения

Штамм *Pseudomonasputida* П2 - типичный представитель почвенных микроорганизмов выделен из экспериментально загрязненной каштановой почвы, содержащей 100 ПДК «Прометрина» [5]. В ходе многократных пересевов данный штамм адаптирован к высоким концентрациям (2000 ПДК= 1г/кг) препарата и депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов как перспективный деструктор «Прометрина» [6]. Однако после длительного хранения в нашем музее бактериальных культур на кафедре микробиологии и физиологии растений на ГРМ-агаре селекционный штамм мог утратить способность к деструкции пестицида, вследствие прекращения синтеза ферментов деградации. В связи с этим нами была проверена способность к деструкции у штамма после хранения в музее в течение 1 года[7].

Изучение способности роста штамма Pseudomonasputida П2 в различных условиях температуры, pH и аэрации

Перед изучением деструктивной активности штамма нами была изучена возможность роста бактерий без гербицида на МПА и среде М9 с глюкозой в качестве единственного источника углерода при температурах +5, +10, +18, +28 +37 и 43⁰С и рН 5, рН 7 и рН 9, а также при естественной и интенсивной аэрации (рисунок 1-3).

В результате культивирования бактерий при температуре +10, 18, 28 и 37⁰С, а также при рН 5, 7, 9 штамм *Pseudomonasputida* П2 активно размножается. При температуре +5⁰С и ниже, а также при +43⁰С и выше данный штамм не растет, ни при каких значениях рН. Следовательно, температуры +5 и +43⁰С являются критическими для микроорганизма и в данных условиях этот штамм не будет осуществлять биodeградацию «Прометрина». Аэрация слабо влияет на рост штамма деструктора, скорость и характер роста *Pseudomonasputida* П2 на МПА и М9 одиноков при естественной и интенсивной аэрации



Рисунок 1- Отсутствие роста штамма деструктора на МПА при температуре +43⁰С



Рисунок 2- Рост штамма деструктора при температуре +10⁰С и рН 5

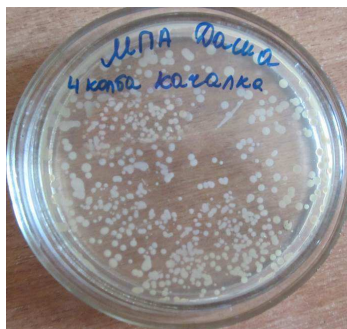


Рисунок 3- Роста штамма деструктора на МПА при интенсивной аэрации

*Определение деструктивной активности штамма *Pseudomonasputida* П2 к прометрину при различной температуре, рН и разных условиях аэрации*

Для подтверждения деструкции пестицида мы провели спектрофотометрический анализ. При анализе спектров ГСО прометрина в течение 7 дней был установлен пик поглощения в области 300 нм, который не подвергался изменениям. При изучении деструкции пестицида наблюдение вели именно за этим пиком. Графики деструкции пестицида представлены на рисунках(4-7).

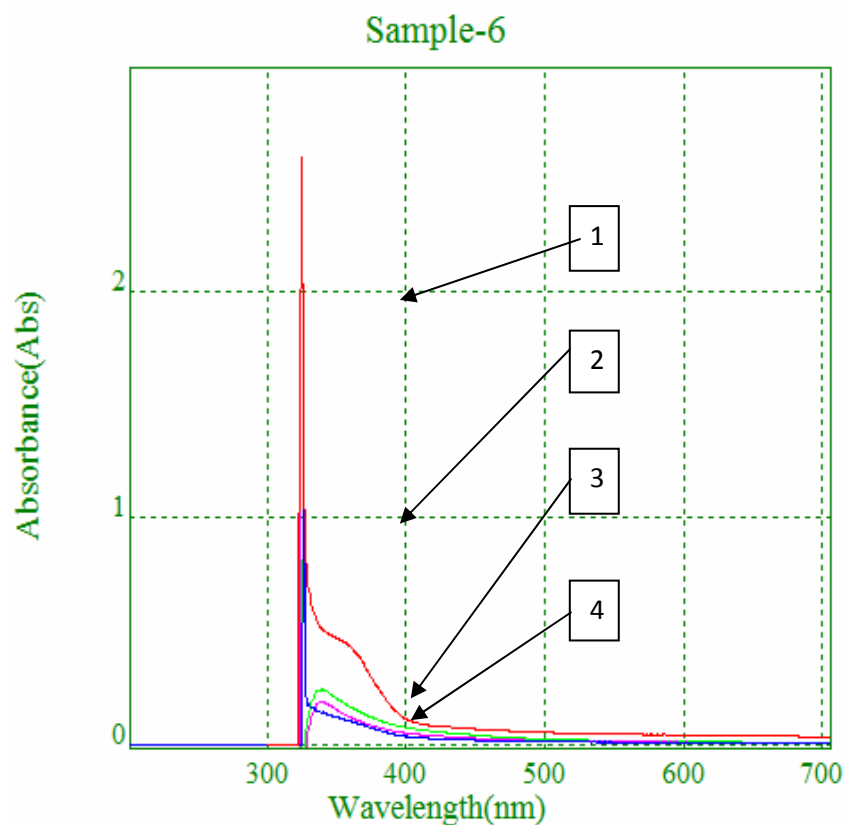


Рисунок 4-

Калибровочный график прометрина в среде М9 без микроорганизмов
1-250 мкг/мл, 2-125 мкг/мл, 3-41 мкг/мл, 4-25 мкг/мл

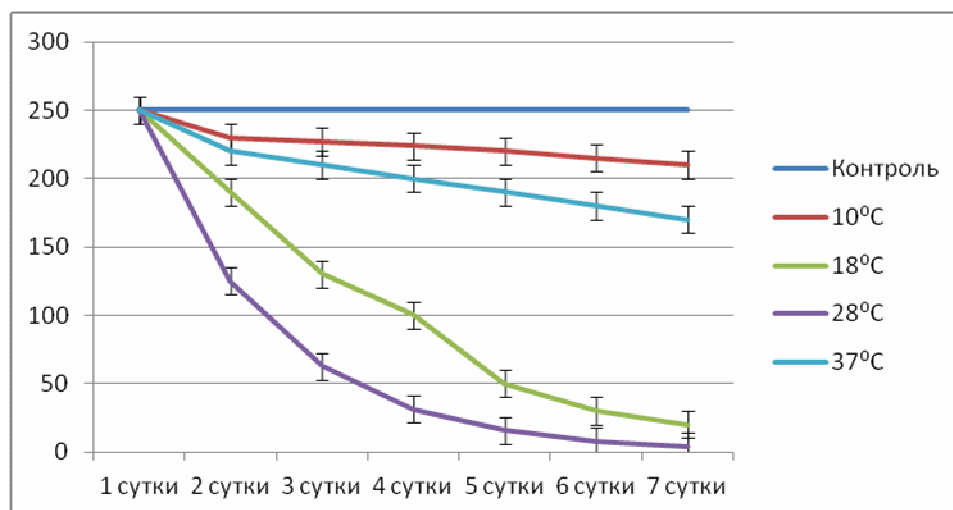


Рисунок 5 - Деструкция прометрина штаммом *Pseudomonasputida* П2 в среде М9 при различной температуре

Анализ деструкции прометрина при различной температуре показал, что за 7 суток концентрация пестицида снизилась при температуре +10⁰С на 30 мкг/мл; при температуре +18⁰ С - на 230 мкг/мл; при температуре +28⁰ С -

на 246,09 мкг/мл; при температуре +37⁰ С - концентрация составила 80 мкг/мл.

Из приведенных данных видно что наиболее эффективно скорость биодеструкции пестицида прометрина идет в диапазоне температур от +18 до +28⁰С, следовательно, в качестве рекомендации следует вносить препарат в почву в весенне-летний период, когда температура почвы прогреется до указанных значений.

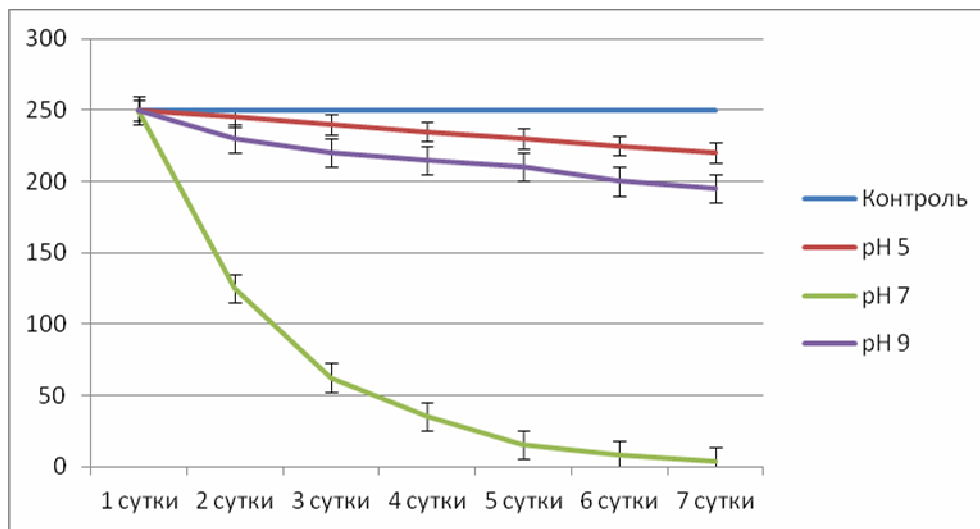


Рисунок 6 – Деструкция прометрина штаммом *Pseudomonasputida* П2 в среде М9 при различной рН среды

При анализе деструкции прометрина штаммом *Pseudomonasputida* П2 в среде М9 при различной кислотности среды установлено, что рН 5 и рН 9 сильно тормозят скорость деструктивной реакции, за 7 суток концентрация препарата снизилась при рН 5 на 30 мкг/мл, при рН 9 на 55 мкг/мл, в то время как при рН 7 деградация протекала интенсивно и составила на 246 мкг/мл, Таким образом в кислой и щелочной среде биодеструкция прометрина замедляется.

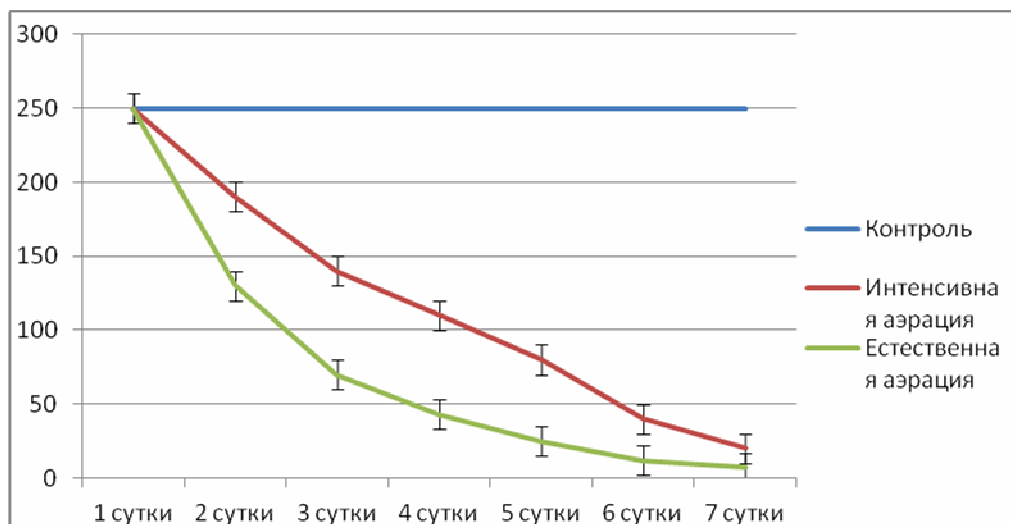


Рисунок 7 - Деструкция прометрина штаммом *Pseudomonasputida* П2 в среде М9 при естественной и интенсивной аэрации

Интенсивная аэрация не влияет на скорость деструкции прометрина штаммом *Pseudomonasputida* П2. В течение 7 дней деструкция препарата составила 230 мкг/мл что на 13 мкг/мл ниже, чем при естественной аэрации. Следовательно, при внесении препарата в почву, не требуется дополнительных рекультивационных мероприятий по рыхлению почвы.

*Исследование патогенных и токсичных свойств штамма *Pseudomonasputida* П2*

По результатам эксперимента штамм *Pseudomonasputida* П2 не обладал гемолитической, плазмокоагулязной, лецитиназной активностью и не осуществлял мацерацию клубней картофеля, моркови и свеклы.

На основании полученных данных можно рекомендовать штамм *Pseudomonasputida* П2 для создания на его основе высокоэффективного экологически безопасного препарата, предназначенного для очистки почвы, загрязненной препаратами с действующим веществом прометрин

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из основных факторов трансформации и детоксикации ксенобиотиков в окружающей среде являются почвенные микроорганизмы. На основе штамма *Pseudomonas putida* П2 создан биопрепарат, который испытан в загрязненной почве в лабораторных и полевых условиях. Полученные данные открывают перспективы для использования разработанного биопрепарата для ремедиации почв, загрязненных препаратами, с действующими веществами прометрин. Однако на микробиологические процессы трансформации в почве очень сильно влияют почвенно-климатические условия. Вследствие этого, процессы деградации могут протекать с разной интенсивностью. В связи с чем, встает вопрос о рекомендациях использования полученного препарата и выборе условий, при которой биоремедиация почвы будет наиболее эффективной.

В связи с этим, для исследования возможностей биопрепарата на основе *Pseudomonas putida* П2, нами было изучено влияние аэрации, pH и температуры на скорость деструкции. Результаты экспериментов показали, что при температуре +5 и +43⁰С, штамм *Pseudomonas putida* П2 не способен расти при значениях pH 5,7,9 и интенсивной аэрации. Следовательно, температура +5 и +43⁰С являются критическими для микроорганизма и в данных условиях этот штамм не способен осуществлять биodeградацию прометрина. Видимо, при низких и высоких температурах не происходит синтеза нужных ферментов деградации или скорость метаболических процессов, осуществляющих деструкцию препарата, замедляется.

В дальнейшем нами изучена интенсивность деструкции пестицида при температуре +10,+18,+28 и +37⁰С, pH 5, pH 7, pH 9, естественной и интенсивной аэрации.

Анализ деструкции прометрина при различной температуре показал, что за 7 суток исследования, согласно калибровочному графику, концентрация пестицида снизилась при температуре +10⁰С только на 12 %; при температуре +18⁰С на 92%; при температуре +28⁰С на 98 %; при

температуре $3 \pm 7^{\circ}\text{C}$ деструкция опять замедлялась, а концентрация пестицида снизилась на 32%.

Таким образом установлено, что наиболее эффективно скорость биодеструкции пестицида прометрина идет в диапазоне температур от $+18$ до $+28^{\circ}\text{C}$, следовательно вносить препарат в почву рекомендуется в весенне-летний период, когда температура почвы прогреется до указанных значений.

В аналогичных опытах по изучению деструкции прометрина штаммом *Pseudomonasputida* П 2 при различных показателях pH (кислой и щелочной) выявлено сильное торможение процесса деградации, и процент разложения препарата достаточно низкий при pH 5 деструкция составила 12%, при pH 9- 26%. Таким образом в кислой среде деструкция замедляется в 8 раз, а в щелочной среде в 4 раза.

Интенсивная аэрация не влияет на скорость деструкции прометрина штаммом *Pseudomonasputida* П2. В течение 7 дней деструкция препарата составила 90% что на 4 % ниже, чем при естественной аэрации.

Таким образом, при внесении препарата в почву, не требуется дополнительных рекультивационных мероприятий по рыхлению почвы.

В результате проведенных экспериментов получены данные, которые открывают перспективы для использования разработанного биопрепарата на основе штамма *Pseudomonasputida* П2 при ремедиации почв, загрязненных препаратами, с действующими веществами прометрин.

ВЫВОДЫ

1. Установлено отрицательное влияние температур $+5^{\circ}\text{C}$ и $+43^{\circ}\text{C}$ на процесс деградации прометрина штаммом *Pseudomonasputida* П2. Наиболее эффективно биодеструкция протекает в диапазоне от $+18^{\circ}\text{C}$ до $+28^{\circ}\text{C}$ и составляет от 92 до 98 %.
2. Доказано влияние кислотности среды на скорость деградации прометрина штаммом *Pseudomonasputida* П2. Наибольшая степень деструкции протекает в нейтральной среде она составила 98% , при pH 5 деструкции подвергается только 12 % препарата, а при pH 9 -26% .
3. Интенсивная аэрация не влияет на скорость деструкции прометрина штаммом *Pseudomonasputida* П2. В течение 7 дней деструкция препарата составила 90 %, что на 4% ниже, чем при естественной аэрации. Следовательно, при внесении препарата в почву, не требуется дополнительных рекультивационных мероприятий по рыхлению почвы.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Головлёва, Л. А. Биоремедиация почв, загрязнённых симазином / Л. А. Головлева, З. И. Финкельштейн // *Агрохимия*. 1993. № 12. С. 57-61.
2. Игнатовец, О. С. Механизм разложения прометрина бактериями рода *Pseudomonas* / О. С. Игнатовец, В. Н. Леонтьев // *Доклады НАН Беларуси*. 2008. Т. 52, № 3. С. 81-85.
3. Игнатовец, О. С. Механизм разложения симазина бактериями рода *Pseudomonas* / О. С. Игнатовец, В. Н. Леонтьев // *Доклады НАН Беларуси*. 2008. Т. 52, № 3. С. 63-66.
4. Мельников, Н. Н. Пестициды и окружающая среда / Н. Н. Мельников, А. И. Волкова, О. А. Короткова. М. : Химия, 1977. 223 с.
5. Тихонова, Д. А. Изучение влияния температуры и аэрации на деструкцию гербицида прометрина штаммом *Pseudomonasputida* П 2 / Д. А. Тихонова, Е. В. Иванова, О. Ю. Ксенофонтова // *Изучение, сохранение и восстановление естественных ландшафтов : сборник статей V Международной научно-практической конференции*, г. Волгоград, 12-16 октября 2015 г. М. : Планета, 2015. С. 290-291.
6. Олискевич, В. В. Оптимизация технологий биоремедиации сельскохозяйственных земель, загрязнённых гербицидом «Гезагард» / В. В. Олискевич, О. Ю. Ксенофонтова, В. А. Гребенщикова // *Известия Саратовского университета*. 2013. Серия Химия. Биология. Экология, вып. 2. Т. 13. С. 101-107.
7. Ксенофонтова, О. Ю. Динамика численности микроорганизмов почвы, загрязнённой гербицидом «Прометрином» и экспериментальный поиск микроорганизмов деструкторов / О. Ю. Ксенофонтова, Е. Ю. Иванова // *Экология и рациональное природопользование как фактор устойчивого развития: сб. докладов Международной научно-практической конференции*, Белгород, 8-9 октября 2014 г. Белгород: Изд-во БГТУ. 2014. С. 373 – 376.