**МУНИЦИПАЛЬНОЕ АВТОНОМНОЕ**

**ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ**

**СРЕДНЯЯ ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ШКОЛА № 24**

Научно - исследовательская работа

по теме: «Резистентность нефтеокисляющих бактерий рода RHODOCOCCUS

к пестицидам различных видов»

Выполнила: ученица 10 «А» класса

(химико – биологического профиля)

Ворончук Владислава Игоревна

Научный руководитель: Ткаленко Юлия Витальевна,

учитель химии и биологии МАОУ СОШ № 24

Армавир, 2023

Ворончук Владислава Игоревна

Краснодарский край, город Армавир

МАОУ СОШ №24, 10 класс

«Резистентность нефтеокисляющих бактерий рода RHODOCOCCUS к пестицидам различных видов»

Научный руководитель: Ткаленко Юлия Витальевна, учитель химии и биологии МАОУ СОШ №24, Краснодарский край, город Армавир

СОДЕРЖАНИЕ

Введение…………………………………………………………………………………………....3

1. Обзор литературы……………………………………………………………………………….4
   1. Биотрансформацияпестицидов…………………………………………………………...4
   2. Пути бактериальной трансформации пестицидов……………………………………....5
   3. Основные свойства наиболее распространенных пестицидов………………………...7
   4. Родококки как биодеграданты пестицидов…………………………………………….11
2. Материал и методы…………………………………………………………………………….13
   1. Объект исследования…………………..............................................................................13
   2. Питательные среды, использованные для культивирования микроорганизмов.........13
   3. Глубинное культивирование микроорганизмов...............................................................14
   4. Зависимость роста *Rhodococcus sp.* от концентрации пестицидов.................................14
   5. Влияние продуктов физико-химического разложения пестицидов на рост *Rhodococcus sp...........................................................................................................................................*18

Заключение......................................................................................................................................21

Список использованных источников............................................................................................22

ВВЕДЕНИЕ

Динамичное развитие современного мира предъявляет высокие требования ко многим аспектам человеческой жизни. Не исключением является народное хозяйство и сельское хозяйство, в частности. Увеличение населения планеты ведет к повышению количества и качества производимых продуктов питания. К сожалению, на данном уровне развития экотехнологии невозможно получение должных объемов экологически чистых продуктов питания. Соответственно, единственной альтернативой по-прежнему остается интенсивный тип земледелия со своими минусами и плюсами [1].

Одним из таких минусов является применение в огромных количествах химических средств защиты растений. Повсеместное применение ядохимикатов ведет к деградации окружающей среды и ставит под удар здоровье человека. И как было сказано выше, отказ от их применения ведет к серьезному уменьшению получаемого урожая и соответственно к высоким экономическим потерям. Соответственно, единственным оптимальным способом обезопасить получаемую продукцию является интеграция в интенсивную систему земледелия методов экологического контроля содержания и динамики пестицидов в почве **[**2].

На сегодняшний день наибольшую актуальность приобрел метод биологической очистки. Данная методика базируется на способности микроорганизмов к поглощению различных веществ и их метаболизму, т.е. биологической конвертации [3].

Целью исследований является определение способности микроорганизмов почвы к поглощению, аккумуляции и трансформации пестицидов с целью ремедиации территорий, загрязненныхпестицидами [4].

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

* проверить возможность использования нефтеокисляющими штаммами пестицидов в качестве единственного источника углерода и энергии в условиях глубинного культивирования при низких концентрациях действующего вещества;
* определить зависимость интенсивности роста нефтеокисляющих коллекционных штаммов от концентрации действующего вещества;
* исследовать влияние продуктов физико-химического разложения пестицидов на рост штамма *Rhodococcus sp.*
  + 1. Обзор литературы
       1. Биотрансформация пестицидов

По химическим свойствам и биологической доступности пестициды относятся к органическим ксенобиотикам, особенностью которых является наличие различных фрагментов в структуре молекулы, несвойственных для биологических соединений. Ведущая роль во включении пестицидов в природный круговорот веществ отводится гетеротрофным микроорганизмам. На начальном этапе деградации ксенобиотиков возможны различные ферментативные реакции, но преобладают реакции окисления [5].

Пестициды, первоначальной стадией разрушения которых является гидролиз, достаточно быстро разлагаются в естественных условиях. Более же устойчивы пестициды, деструкция которых начинается с деалкилирования и дегалогенирования. В молекуле большинства пестицидов содержатся атомы хлора, связанные с ароматическими или алифатическими атомами углерода, поэтому реакции, в результате которых удаляются атомы хлора из метаболизируемой молекулы, являются основной начальной стадией деструкции пестицидов [6].

Пестициды способны вступать в реакции со всевозможными метаболитами, что подчас приводит к образованию крайне токсичных соединений. Связывание пестицидов или их промежуточных продуктов трансформации с функциональными группами природных полимеров сопровождается образованием труднодоступных для биологической деградации связанных остатков. При ферментативной же трансформации пестицидов возможна детоксикация или инактивация пестицида с полной потерей его токсических свойств [7].

В природных экосистемах некоторые пестициды довольно быстро разлагаются до конечных продуктов. В первую очередь это простые пестициды и структурно близкие природным веществам. Деградация подобных соединений монокультурой микроорганизмов приводит к накоплению продуктов их частичной трансформации, которые разлагаются очень медленно или совсем не подвергаются разложению [8].

В естественных природных условиях полная минерализация устойчивых пестицидов может происходить только в результате кометаболизма с более биологически доступными соединениями и воздействия на них смешанных популяций микроорганизмов. Достаточно часто в процессе биологической трансформации образуются продукты, даже более токсичные для микроорганизмов, чем исходные соединения, в связи с чем скорость каждой последующей стадии разложения снижается [7].

В основном в окружающую среду попадают пестициды, относящиеся к гербицидам, и некоторые инсектициды: феноксиалкилкарбоновые кислоты, хлорированные алифатические кислоты, метил- и фенилкарбаматы, тиокарбаматы, замещенные мочевины, симмтриазины, толуидины, дипиридилы, эфиры и тиоэфиры фосфорной и тиофосфорной кислот и многие другие.

Многие почвенные микроорганизмы способны достаточно легко метаболизировать хлорированные жирные кислоты (трихлоруксусную кислоту - ТХУ, 2,2-дихлорпропионовую кислоту или ее натриевую соль - далапон), которые применяются в качестве гербицидов. Вследствие гидролитических реакций и метаболизма данные соединения распадаются до анилиновых оснований, при этом вероятно образование более токсичных продуктов, чем исходные соединения. Хлоранилины очень устойчивы во внешней среде [Г9оловлева, 2007]. Под действием ферментов и абиотических факторов они вступают в реакции конденсации, часть из них способна связываться с гуминовыми кислотами, в результате чего они становятся недоступными для микроорганизмов.

Пестициды могут быть подвержены биологической трансформации и биологической деградации только в растворенном состоянии. Сорбция большинства пестицидов почвенными частицами и коллоидами сильно снижает их биологическую доступность в почве и донных осадках. Особенно прочно сорбируются почвой, донными осадками и некоторыми глинами катионные пестициды. Чем выше степень сорбции пестицидов, тем они менее биологически доступны [7]. Однако сорбция пестицидов в почве может приводить и к ускорению их разложения. Некоторые почвенные минералы способны катализировать абиотические превращения пестицидов с образованием менее стойких и более биологически доступных продуктов. Ускорение деструкции также наблюдается, когда почвенные органические вещества выступают в качестве субстрата, используемого биологическими деструкторами в процессе кометаболизма пестицидов.

В аэробных условиях большинство пестицидов разрушается быстрее, чем в анаэробных. Тем не менее, пестициды с большим числом электрон- акцепторных групп (линдан, метоксихлор, дихлордифенилтрихлорэтан, гептахлор, элдрин, тиофос) лучше разлагаются в анаэробной среде или при чередовании аэробных и анаэробных условий [10].

* + - 1. Пути бактериальной трансформации пестицидов

Считается, что для питания и энергии микроорганизмы используют самые различные химические соединения. В результате происходит трансформация (преобразование) пестицида с последующей утратой токсических свойств [11].

Различают два типа трансформации пестицида:

* микробы способны интенсивно расти, размножаться и накапливаться, используя пестицид в качестве источника питания.
* микробы не способны усваивать пестицид в процессах метаболизма, но в присутствии ростовых субстратов происходит индукция синтеза соответствующих ферментов, катализирующих способность трансформировать химическое соединение. Эта особенность получила название кометаболизма, то есть сопряженных ферментативных реакций обмена, при котором косубстраты (пестициды) влияют на рост и развитие микробов только в присутствии ростовых органических соединений [8]. Таким образом, реакции кометаболизма очень разнообразны и часто встречаются в мире микроорганизмов. Характерная черта этих процессов - взаимосвязь между превращениями трансформируемых субстратов и косубстратов. Косубстраты можно разделить на три основные группы:
* соединения, являющиеся легко используемыми субстратами для роста, но при росте на которых удельный выход продукта трансформации невысок - глюкоза, манит;
* соединения, на которых культура слабо растет или вообще не растет, но активно трансформирует - мальтоза, глицерин, ксилоза;
* соединения, являющиеся плохими субстратами как для роста, так и для трансформации - ацетат, этанол.

Особенность кометаболизма заключается в том, что субстрат не обязательно служит источником углерода. В некоторых случаях косубстрат претерпевает лишь частичные превращения, т.е. трансформируется также, как и основной трансформируемый субстрат.

Биохимическое превращение загрязняющих веществ обусловлено процессами обмена веществ бактерий, их типом питания и дыхания. Гетеротрофные микроорганизмы способны усваивать углерод из готовых органических соединений самой различной химической структуры [12]. Но различные группы микроорганизмов адаптировались к использованию углерода из определённого круга этих соединений. К тому же строение органических веществ имеет существенное значение при их использовании микроорганизмами в качестве источников углерода. Насыщенные соединения - биологически стойкие, они могут усваиваться только некоторыми видами микроорганизмов. Ненасыщенные органические соединения - хороший источник углерода для многих микроорганизмов [13].

* + - 1. Основные свойства наиболее распространенных пестицидов

В качестве исследуемых пестицидов были выбраны следующие препараты: гербицид - Секатор Турбо, гербицид – Лазурит, инсектицид – Биотлин, инсектицид – Муравьед, гербицид – Пульсар.

Выбранные препараты входят в перечень разрешенных к использованию на территории Российской Федерации и используются в сельскохозяйственном производстве.

Данные пестициды были выбраны в связи с широким распространением в сельскохозяйственном производстве, многообразием типов действующего вещества «таблица 1», и включенность в список пестицидов, разрешенных к применению на территории РФ [14].

Таблица 1 - Характеристика используемых пестицидов

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Действующее вещество | Коммерческое название препарата | Содержание действующе го вещества, г/л | Класс действующего вещества | Препаратная форма | Класс опасности для человека | Период полураспада, сутки |
| Амидосульфурон, Йодосульфуронметил-натрий, Мефенпирдиэтил | Секатор Турбо | 50 | Антидоты гербицидов и сульфонил-  мочевины | Масляная дисперсия | 3 | 30 |
| Метрибузин | Лазурит | 700 | Производные триазинов (1,2,4-  триазиноны и 1,3,5- триази-  ноны) | Смачи- вающийся порошок | 3 | 90 |
| Имидакло- прид | Биотлин | 200 | Неоникоти- ноиды | Водорас- творимый концентрат | 1 | 100 |
| Диазинон | Муравьед | 600 | Неоникоти- ноиды | Концентрат  эмульсии | 3 | 60 |
| Имазамокс | Пульсар | 40 | Имидазоли-  ноны | Водный  раствор | 3 | 70 |

Смесь амидосульфурона, йодосульфурон-метил-натрия и мефенпир- диэтила - высокоселективный гербицид для применения на посевах пшеницы, ячменя, кукурузы и льна-долгунца против однолетних и некоторых многолетних двудольных сорняков. Коммерческое название препарата – Секатор Турбо.

Структурная формула амидосульфурона приведена на рисунке 1.

Химическая формула амидосульфурона: C9H15N5O7S2 [3-(4,6- диметоксипиримидин-2-ил)-1-[(N-метил-N-метилсульфонил) аминосульфонил]- мочевина] – пестицид, избирательный гербицид класса сульфонилмочевин.

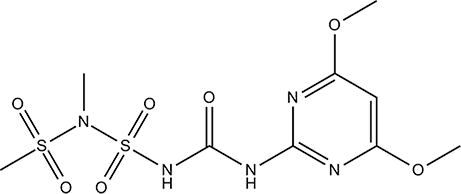


Рисунок 1 - Структурная формула амидосульфурона [13]

Структурная формула йодосульфурон-метил-натрия преведена на рисунке 2.

Химическая формула: C14H13IN5NaO6S [Метил 4-иодо-2- [3- (4-метокси-6-

метил-1,3,5-триазин-2-ил) уреидосульфонил] бензоат, натриевая соль] – пестицид, послевсходовый гербицид класса сульфонилмочевин. Системное действие препарата обуславливает высокую эффективность в борьбе с двудольными сорняками в посевах сельскохозяйственных культур.

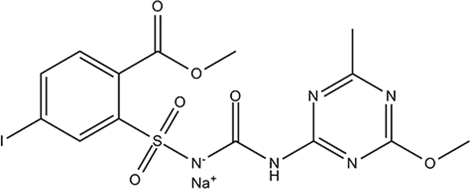


Рисунок 2 - Структурная формула йодосульфурон-метил-натрия [13]

Структурная формула мефенпир-диэтила преведена на рисунке 3.

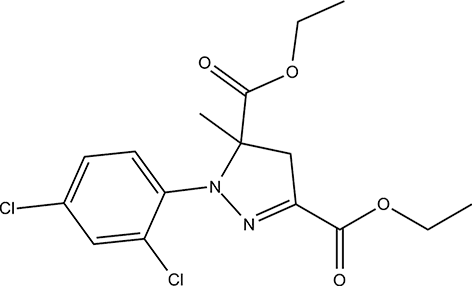
Химическая формула мефенпир-диэтила: C16H18Cl2N2O4 [Диэтиловый эфир (RS)-1-(2,4-дихлорфенил)-5-метил-2-пиразолин-3,5-дикарбоновой кислоты] – антидот, применяется для ослабления фитотоксического воздействия некоторых гербицидных препаратов (в том числе сульфонилмочевин), которые предназначены для борьбы с широким спектром двудольных сорняков в посевах зерновых и кукурузы.

Рисунок 3 - Структурная формула мефенпир-диэтила [13]

Метрибузин - системный гербицид для защиты картофеля, кукурузы, томата и других культур от однолетних двудольных и злаковых сорняков. Коммерческое название препарата – Лазурит.

Структурная формула метрибузина приведена на рисунке 4.

Химическая формула метрибузина: C8H14N4OS [4-амино-6-трет-бутил-3- метилтио-1,2,4-триазин-5(4Н)-ОН] – пестицид, избирательный гербицид. Применяется для борьбы с однолетними двудольными и злаковыми сорняками в посадках томатов, картофеля, розы эфиромасличной. Белое кристаллическое вещество. Растворим в ряде органически растворителей.

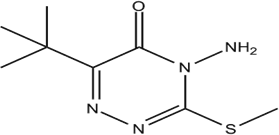


Рисунок 4 - Структурная формула метрибузина [13]

Имидаклоприд – системный пестицид для уничтожения различных видов тли на плодовых, ягодных, овощных и цветочных культурах. Коммерческое название препарата – Биотлин.

Структурная формула имидаклоприда приведена на рисунке 5.

Химическая формула имидаклоприда: С9Н10СlN5O2 [4,5-дигидро-N-нитро-1-[(6-хлор-3-пиридил)-метил]-имидазолидин-2-илен-амин] – химическое действующее вещество пестицидов (неоникотиноид), используется (в том числе в смесях с другими активными компонентами) в сельском хозяйстве и в практике медицинской, санитарной и бытовой дезинсекции для борьбы с вредными и синантропными насекомыми.

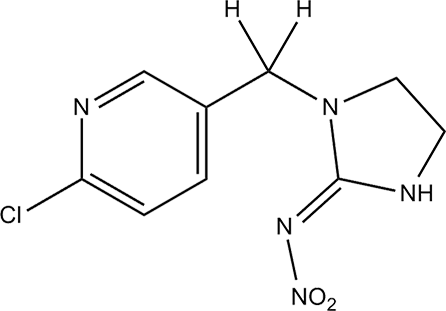


Рисунок 5 - Структурная формула имидаклоприда [15]

Диазинон – системный пестицид для борьбы с садовыми муравьями. Коммерческое название препарата – Муравьед.

Структурная формула диазинона приведена на рисунке 6.

Химическая формула диазинона: C12H21N2O3PS [O, О-диэтил-О-(2- изопропил 4-метилпиримидил-6) тиофосфат] – химическое действующее вещество пестицидов (фосфорорганический инсектицид), используется в сельском и личных приусадебных хозяйствах, а также в практике медицинской и бытовой дезинсекции для борьбы с различными, в том числе синантропными насекомыми.

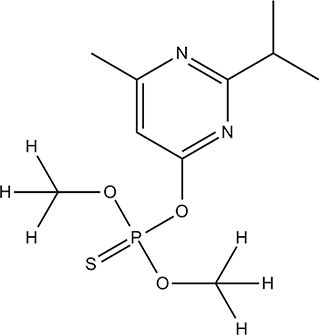


Рисунок 6 - Структурная химическая формула диазинона [13]

Имазамокс – системный пестицид, разработанный специально для применения в посевах бобовых культур с целью уничтожения вредной растительности. Коммерческое название препарата – Пульсар.

Структурная формула имазамокса приведена на рисунке 7.

Химическая формула имазамокса: C15H19N3O4 [(RS)-2-(4-изопропил-4- метил-5-оксо-2-имидазолин-2-ил)-5-метоксиметилнико-тиновая кислота] – пестицид, послевсходовый гербицид. Применяется в борьбе со злаковыми и широколистными сорняками в посевах бобовых, рапса, сои, кукурузы.

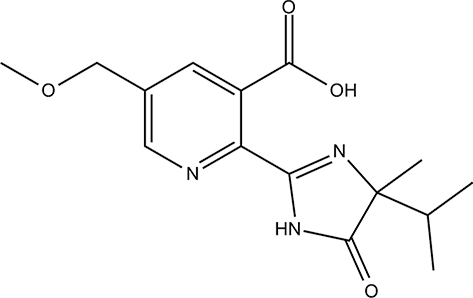


Рисунок 7 - Структурная формула имазамокса [13]

* + - 1. Родококки как биодеграданты пестицидов

Родококки – биохимически уникальные микроорганизмы. Синтезируемая ими ферментная система катализирует реакции биотрансформации практически всех классов органических соединений, они способны асиммилировать в качестве единственных источников углеродного питания даже газообразные углеводороды (пропан, н-бутан). Они – постоянные и доминирующие компоненты естественного биоценоза нефтяных загрязнений, в связи с чем определенные виды родококков используются в системе мониторинга углеводородного загрязнения биосферы и для очистки нефтезагрязненных территорий [15].

Представленный род бактерий обладает высокой углеводородокисляющей активностью, способностью к синтезу нетоксичных биосурфактантов с выраженной нефтеотмывающей и эмульгирующей активностью, а также используется для восстановления почв, загрязненных тяжелыми металлами и углеводородами. Бактерии рода *Rhodococcus* синтезируют биосурфактанты в ответ на присутствие в среде n-алканов. Физиологическая роль биосурфактантов при росте родококков на углеводородах состоит в солюбилизации гидрофобных субстратов в клетках [16].

Перспективность использования данного рода непатогенных актинобактерий обусловлена их способностью расти на минимальных средах, высокой каталитической активностью, политрофностью и отсутствием выраженных патогенных свойств [17].

Метаболическое разнообразие рода делает их идеальными кандидатами для осуществления биоремедиации загрязненных участков, и, как биокатализаторов для широкого диапазона биотрансформаций. Это связано с наличием и мобилизацией крупных линейных плазмид и множеством гомологов ферментов в катаболических путях [11]. Штаммы *Rhodococcus* ассимилируют широкий спектр углеводов и белков, в том числе алифатические углеводороды, галогенированные алифатические углеводороды, полициклические ароматические углеводороды, нитроароматических соединения, а также некоторые стойкие тиокарбонаты и S-триазиновые гербициды и 2- меркаптобензотиазол, который используется в качестве ускорителя вулканизации в резиновой промышленности [12].

* + 1. Материал и методы исследования

Сбор материала для проведения работы проводился в г. Армавире, в сентябре-ноябре 2022 г. Для исследования использовалась почва, собранная в окрестностях Армавирского водохранилища. Далее, для выделения бактерий рода *Rhodococcus,* использовалась питательная среда (МПА – мясо – пептонный агар) и, в дальнейшем, проводилась окраска по Грамму.

* + - 1. Объекты исследования

Объектом исследования послужили микроорганизмы рода *Rhodococcus,* которыйвыбирался по таким параметрам как: эффективность деструкции углеводородов и сравнительно короткая продолжительность культивирования до наступления стационарной фазы роста культур.

* + - 1. Питательные среды, использованные для культивирования микроорганизмов

Чистые культуры бактерий выращивались на мясо-пептонном агаре производства ГНЦПМ, г. Оболенск (Россия).

Стерилизация питательной среды проводилась в стеклянной лабораторной посуде при t = 120℃ и давлении 1 атмосфера в течение 30 минут в стерилизаторе.

Питательная среда без источника углерода (минеральная среда) (г/л):

KNO3 – 4;

Na2HPO4\*12H2O – 1,4;

KH2PO4 – 0,6;

MgSO4\*7H2O – 0,8;

Микроэлементы (17) – 1мл/ л среды; Вода дистиллированная – 1 л

Стерилизация среды проводилась при t = 120℃ течение 30 минут в паровом стерилизаторе в двух плоскодонных стеклянных колбах во избежание выпадения осадка.

В одной колбе находился раствор: Na2HPO4\*12H2O + KH2PO4 + H2O (0,5 мл), в другой колбе: KNO3 + MgSO4\*7H2O + H2O (0,5 мл) + раствор микроэлементов. После стерилизации растворы смешивали и использовали в качестве питательной среды для культивирования штаммов.

В качестве источника углерода использовались пестициды, описанные ранее (см. таблица 1) в различных концентрациях. Для исследования роста микроорганизмов на продуктах физико-химического разложения пестицидов, разбавленные до рабочих концентраций ксенобиотики, инкубировали в питательной среде указанного состава (имитация почвенного раствора).

Условия, необходимые для культивирования: на свету при комнатной температуре в стерильных условиях в течение 45 суток.

* + - 1. Глубинное культивирование микроорганизмов

Культивирование исследуемых штаммов осуществлялось в наклонных пробирках объемом 100 мл. В качестве модели процесса культивирования был выбран периодический метод, в котором внешние параметры воздействия остаются неизменными, а количество и состав среды зависят только от самих исследуемых культур. При культивировании был выбран пассивный метод аэрации культур, который происходил за счет перемешивания жидкости, что позволяло распределить насыщенный кислородом верхний слой и рассредоточить клетки бактерий по всему объему заполненной пробирки. Перемешивание являлось необходимым параметром по причине оседания культуры на дно пробирок и недостаточным потреблением кислорода, который являлся необходимым условием роста, так как все исследуемые микроорганизмы используют аэробный тип метаболизма [17].

Культуры выращивались в минеральной среде (состав описан в разделе 2.2) с исследуемым пестицидом в качестве источника углерода в концентрации 0,1 г/л (по действующему веществу).

Для увеличения производительности, культивирование вели в пробирках объемом 100 мл, заполненных средой на 1/5 объема и закрепленных в наклонном положении для увеличения границы соприкосновения жидкость – воздух.

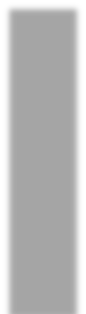
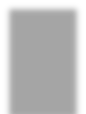
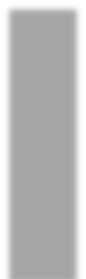
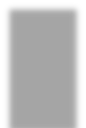
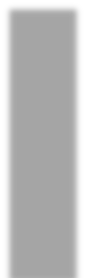
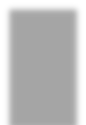
* + - 1. Зависимость роста *Rhodococcus sp.* от концентрации пестицидов

Для исследований был выбран штамм *Rhodococcus sp*., обладающий способностью к стабильному росту на всех пяти исследуемых пестицидах. Так же в ходе анализа полученных данных были отобраны четыре пестицида (имидаклоприд, метрибузин, имазамокс и диазинон), обладающие наибольшей устойчивостью, а также большим периодом полураспада в почве [19].

Культивирование штамма осуществлялось в условиях, аналогичных с предыдущим опытом. Способность штамма к росту проверяли на концентрациях пестицидов, повышенных с 0,1 г/л до 0,2 г/л и 0,8 г/л. Опыт проводился в трех параллелях. Для оценки динамики роста штамма *Rhodococcus sp*., с учетом штаммоспецифичных особенностей скорости прироста биомассы последнего, измерения оптической плотности проб производились на 4, 8 и 10 сутки культивирования.

Динамика оптической плотности роста штамма *Rhodococcus sp*. растущего на имидаклоприде, приведена на рисунке 1.

0,12



Оптическая плотность, усл. ед.

0,1

0,08

0,06

0,04

0,02

4 сутки

8 сутки

10 сутки

0

0,1 0,8

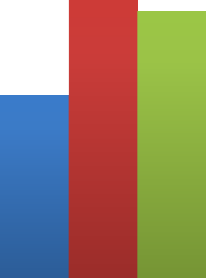
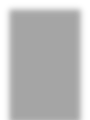
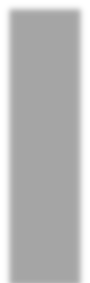
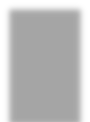
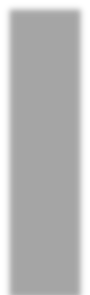
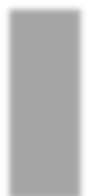
С, г/л

Рисунок 1 - Значения оптической плотности роста штамма *Rhodococcus sp*., культивируемого на среде с имидаклопридом

При культивировании штамма *Rhodococcus sp*. на имидаклоприде (рисунок 1) наблюдается повышение оптической плотности при увеличении концентрации препарата, что указывает на высокую деструкционную способность культуры, а также способность расти на повышенной (вплоть до 0,1 г/л) концентрации данного пестицида. Фазы роста не выражены.

Динамика оптической плотности роста штамма *Rhodococcus sp*., растущего на метрибузине, приведена на рисунке 2.

0,06



Оптическая плотность, усл. ед.

0,05

0,04

0,03

0,02

0,01

4 сутки

8 сутки

10 сутки

0

0,2 0,8

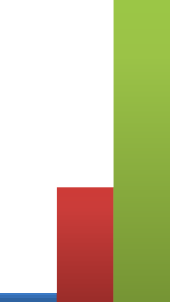
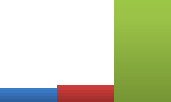
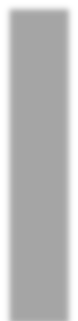
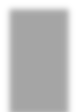
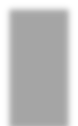
С, г/л

Рисунок 2 - Средние значения оптической плотности роста штамма, культивируемого на среде с метрибузином

При концентрации метрибузина равной 0,8 г/л (рисунок 2) наблюдается относительно резкое снижение оптической плотности по сравнению с более низкими концентрациями данного пестицида, так и по сравнению с культивированием штамма *Rhodococcus sp.* на имидаклоприде. Вследствие этого, можно говорить о наличии высокого токсического эффекта метрибузина при концентрации 0,03 г/л по отношению к исследуемому штамму *Rhodococcus sp.*.

Динамика оптической плотности роста штамма *Rhodococcus sp*. *J8*, растущего на диазиноне, приведена на рисунке 3.

0,3



Оптическая плотность, усл. ед.

0,25

0,2

0,15

0,1

0,05

4 сутки

8 сутки

10 сутки

0

0,2 0,8

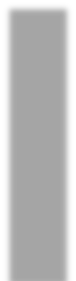
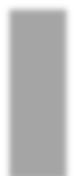
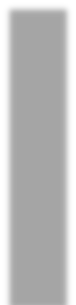
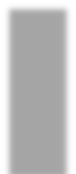
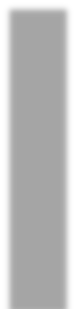
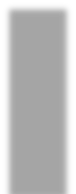
С, г/л

Рисунок 3 - Средние значения оптической плотности роста штамма, культивируемого на среде с диазиноном

Наблюдается значительное повышение оптической плотности культу- ральной жидкости при концентрации препарата диазинона равной 0,8 г/л (рисунок 3). На 10 сутки рост практически прямо пропорционален концентрации субстрата. Это указывает на высокую деструкционную способность исследуемого штамма *Rhodococcus sp*.в отношении данного пестицида, а также говорит о высокой биологической доступности препарата, либо продуктов его физико-химического распада.

Динамика оптической плотности роста штамма *Rhodococcus sp*., растущего на имазамоксе, приведена на рисунке 4.

0,25



Оптическая плотность, усл. ед.

0,2

0,15

0,1

0,05

4 сутки

8 сутки

10 сутки

0

0,2 0,8

С, г/л

Рисунок 4 - Средние значения оптической плотности роста штамма, культивируемого на среде с имазамоксом

При концентрации имазамокса 0,8 г/л (рисунок 4) оптическая плотность культуральной жидкости незначительно выше таковой при 0,2 г/л. Но вне зависимости от концентрации, также наблюдается некоторое снижение оптической плотности в ходе десяти суток культивирования.

Таким образом, для исследованного штамма выявлены препараспецифичные различия в зависимости роста от концентрации пестицидов. Самым устойчивым пестициидом оказался метрибузин. Кроме того, снижение оптической плотности от 0,1 до 0,02 при повышении концентрации от 0,1 г/л до 0,8 г/л свидетельствует о наличии токсического эффекта.

С наибольшей эффективностью штамм *Rhodococcus sp.* утилизировал препарат диазинон. При повышении концентрации субстрата наблюдалось прямо пропорциональное повышение оптической плотности культуры – до 0,26 при 0,8 г/л. Имазамокс и имидаклоприд заняли промежуточное положение.

Динамика оптической плотности исследуемого штамма *Rhodococcus sp.* на протяжении периода культивирования носила препаратспецифичный характер – в случае имидаклоприда, метрибузина и имазамокса она мало выражена, что говорит о быстром (уже на 4 сутки) нарастании биомассы, с использованием биологически доступного субстрата (действующее вещество, продукты распада действующего вещества, неустановленные вспомогательные вещества). В случае диазинона динамика имела сильно выраженный положительный характер, существенное нарастание оптической плотности имело место после недели культивирования и продолжалось вплоть до окончания эксперимента. Это позволяет предположить использование штаммом *Rhodococcus sp.* на поздних сроках культивирования продуктов физико-химического разложения, либо глубокой биологической трансформации препарата.

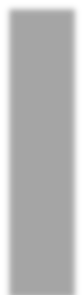
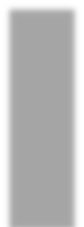
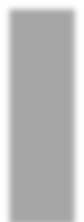
* + - 1. Влияние продуктов физико-химического разложения пестицидов на

рост *Rhodococcus sp.*

Использованные в эксперименте ксенобиотики имеют известный период полураспада (см. таблица 1), установленный производителем. Он варьирует от 30 до 100 дней. Продукты абиотического распада ксенобиотиков могут иметь иную биологическую доступность, токсичность, чем исходные вещества. Для моделирования поведения продуктов физико-химического распада пестицидов в системе, содержащей чистую культуру родококка, была проведена серия лабораторных экспериментов. Исследована оптическая плотность жидкой культуры *Rhodococcus sp.*, использующей в качестве единственного источника углерода и энергии пестициды и искусственно полученные продукты их физико-химического разложения.

Динамика оптической плотности роста штамма *Rhodococcus sp*., культивируемого на среде с метрибузином и продуктами его физико-химического распада, произошедшего в ходе стерильной инкубации в питательной среде в течение 45 суток, приведена на рисунке 5. Использованы две различные исходные концентрации препарата.

0,025



Оптическая плотность, усл. ед.

0,02

0,015

0,01

0,005

4 сутки

8 сутки

10 сутки

0

0,2 0,8

C, г/л

Рисунок 5 - Значения оптической плотности роста штамма *Rhodococcus sp*., культивируемого на среде с метрибузином и продуктами его физико-химического разложения

Из полученных данных можно сделать вывод о том, что прединкубация метрибузина для накопления продуктов разложения вызвала подавление роста культуры *Rhodococcus sp*. по сравнению с использованием в качестве источника углерода и энергии интактного препарата (рисунок 5)*.* Отсутствие роста оптической плотности культуральной жидкости при концентрации препарата метрибузина, равной 0,8 г/л, указывает на то, что продукты физико- химического разложения препарата при данной концентрации полностью останавливают рост исследуемого штамма *Rhodococcus sp*.. В то же время продукты разложения препарата с исходной концентрацией 0,2 г/л полного ингибирования не обеспечивают (снижение оптической плотности по сравнению с интактным препаратом приблизительно в 2 раза).

При культивировании штамма *Rhodococcus sp*.на имидаклоприде (рисунок 6) наблюдается снижение оптической плотности при увеличении концентрации препарата.

Таким образом, обнаружено, что рост *Rhodococcus sp*. на минеральных средах с использованием в качестве единственного источника углерода и энергии пестицидов препаратспецифично зависит от присутствия продуктов физико-химического распада последнего. В ряде случаев наблюдается полное (метрибузин 0,8 г/л) или частичное (большинство исследованных пестицидов по меньшей мере в одной из концентраций) подавление роста на среде, содержащей продукты распада по сравнению со средой с интактными препаратами. В других случаях прединкубация пестицида обеспечивала более интенсивный рост родококка (имидаклоприд 0,2 г/л).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые для актинобактерий выявлена способность расти на пестицидах в качестве единственного источника углерода и энергии. По результатам работы были сделаны следующие выводы:

1. Исследованные пестициды: гербициды - амидосульфурон, йодосульфуронметилнатрий, мефенпирдиэтил, метрибузин, имазамокс; инсектициды - имидаклоприд, диазинон, способны с разной эффективностью катаболизироваться актинобактериями;
2. Обнаружена препаратспецифическая зависимость интенсивности роста штамма *Rhodococcus sp.* от концентрации пестицидов в жидкой питательной среде – при использовании диазинона, имидаклоприда, имазамокса зависимость положительная, при использовании метрибузина – отрицательная;
3. Стерильная прединкубация питательных сред с пестицидами, ведущая к накоплению продуктов физико-химического распада, в большинстве случаев отрицательно влияла на рост *Rhodococcus sp.,* за исключением имазамокса 0,8 г/л (положительный эффект) и метрибузина 0,8 г/л (полное подавление).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биологическая безопасность биотехнологических производств / Н. Б. Градова [и др.]. М., 2006..
2. Биотрансформирующая активность родококков в отношении насыщенных стеринов / Г. А. Бажутин [и др.] // Вестник ПГУ. Пермь, 2015. Вып. 3.
3. Бурков В. В. Агроэкологическая оценка способности микробиологических сообществ почвы к ремедиации территорий, загрязненных пестицидами: автореф. дис. док. биол. наук. Орел, 2014.
4. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М., 2002.
5. Головлева Л. А. Физико-биохимические основы бактериальной деградации ксенобиотиков // Международная научная конференция «Микроорганиз- мы и биосфера». М., 2007.
6. Груздев Г. С. Химическая защита растений. М., 1987.
7. Ившина И. Б. Бактерии рода *Rhodococcus* (иммунодиагностика, детекция, биоразнообразие): автореф. дис. док. биол. наук. Пермь, 1997.
8. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти / Т. П. Пирог [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Т. 41.
9. Коршунова И. О. Влияние органических растворителей на морфофункциональные и наномеханические свойства родококков): автореф. дис. док. биол. наук. Пермь, 2016.
10. Кузнецов А. Е. Прикладная экобиотехнология. М., 2012. Т. 1.
11. Кузнецов А. Е., Градова Н. Б. Научные основы экобиотехнологии / Учебное пособие для студентов. М., 2006.504 с.
12. Куюкина М. С. Биосурфактанты актинобактерий рода *Rhodococcus*: индуцированный биосинтез, свойства, применение: автореф. дис. док. биол. наук. Пермь, 2006.
13. Лабораторный практикум по общей микробиологии / Н. Б. Градова [и др.]. М., 2001.
14. Лисовский В. А., Евсеев С. П., Голофеевский В. Ю. Круговорот ксенобиотиков во внешней среде. М., 2004.
15. Мельников Н. Н., Новожилов К. В., Пылова Т. Н. Химические средства защиты растений (пестициды). М., 1980.
16. Микробиология. Большой практикум / А. М. Петерсон [и др.]. Саратов, 2015. 8 с.
17. Нефтеокисляющий штамм *Rhodococcus erythropolis* как основа создания биопрепарата для ликвидации углеводородных загрязнений и рекультивации земель / Э. В. Карасева [и др.] / Научный журнал КубГАУ. Краснодар, 2012. Вып. 83.
18. Плигина А. С., Белов Д. А. Разрушение пестицидов в окружающей среде // Современные наукоемкие технологии. 2013. Вып. 8.
19. Промышленная микробиология / под ред. Н.С.Егорова. М., 1989.