


МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО «КубГУ»)

Кафедра генетики, микробиологии и биотехнологии

КУРСОВАЯ РАБОТА № 2

ДЕГРАДАЦИЯ РОДОКОККАМИ ПЕСТИЦИДОВ
ГРУППЫ ИМИДАЗОЛИНОВ

Работу выполнила _____

 14.12.18.

М. Н. Круглова

(подпись, дата)

Факультет биологический, курс 4

Направление 06.03.01 Биология

Научный руководитель

доцент, канд. биол. наук _____

 14.12.18


А. А. Самков

(подпись, дата)

Нормоконтролер

профессор, докт. биол. наук,

доцент _____

 14.12.18

С. Н. Щеглов

(подпись, дата)

Краснодар 2018

РЕФЕРАТ

Данная работа выполнена на 36 страницах машинописного текста. В работу включены две таблицы и семь рисунков. Список использованной литературы включает 48 источников.

ПЕСТИЦИДЫ, ИМИДАЗОЛИНОНЫ, ИМАЗАМОКС, ИМАЗАПИР, РОДОКОККИ, БИОДЕГРАДАЦИЯ.

Целью данной работы является оценка способности родококков к деградации имидазолинонов в лабораторных условиях, определяемой с помощью изучения генотипических и фенотипических признаков.

В результате проведенной работы было обнаружено, что штамм *Rhodococcus. sp.* F2 обладает тремя генами из числа исследованных в ходе данной работы, а также предположительно несет ген, кодирующий фермент первой ступени деградации атразина.

Было обнаружено, что имазамокс и имазапир значительно различаются по степени токсического действия на исследованных родококков: имазапир показал штаммоспецифичные зоны задержки роста, у имазамокса токсического действия не выявлено.

Внесение суспензии *Rhodococcus erythropolis* В2 приводит к снижению фитотоксического эффекта, вызванного обработкой как имазамоксом, так и имазапиром, в отношении тест-растения *Beta vulgaris*. Однако обработка минеральными удобрениями оказывает также значительное положительное влияние.

СОДЕРЖАНИЕ

Определения, обозначения и сокращения	4
Введение.....	5
1 Аналитический обзор.....	7
1.1 Свойства имидазолинонов и их биодegradация.....	7
1.1.1 Имазамокс.....	7
1.1.2 Имазапир.....	8
1.2 Гены, ответственные за биодegradацию пестицидов.....	10
1.3 Использование микроорганизмов для стимуляции разложения пестицидов.....	12
2 Материалы и методы исследования	14
2.1 Исследуемые штаммы	14
2.2 Питательные среды, используемые для культивирования микроорганизмов.....	15
2.3 Выделение тотальной ДНК.....	15
2.4 Проведение ПЦР	16
2.5 Электрофорез.....	16
2.6 Используемые праймеры.....	17
2.7 Определение токсического эффекта в отношении бактериальных штаммов.....	18
2.8 Моделирование биодegradации в почве в модельных условиях	19
2.9 Фитотестирование.....	19
3 Дegradация родококками пестицидов группы имидазолинонов.....	21
3.1 Оценка токсичности имидазолинонов в отношении родококков	21
3.2 Выявление наличия катаболических генов, ответственных за дegradацию пестицидов.....	22
3.3 Моделирование биодegradации имидазолинонов в черноземной почве с оценкой снижения фитотоксичности.....	26
Заключение	31
Список использованных источников	32

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Большов А. В. Новый отечественный гербицидимидазолинонового ряда для защиты зернобобовых и масличных культур: дис. ... канд. биол. наук. СПб, 2017. 166 с.
- 2 Горбатова О. Н., Жердев А. В., Королева О. В. Триазиновые пестициды: структура, действие на живые организмы, процессы деградации // Успехи биологической химии. 2006. Т. 46. С. 323-348.
- 3 Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации/ Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. М., 2015. 735 с.
- 4 Захаров С. А. Биологическая активность и экологические последствия применения имидазолиноновых гербицидов в посевах зернобобовых культур. Большие Вяземы, 2003. 136 с.
- 5 Кныр Л. Л. Проведение экотоксикологических исследований с гербицидами. Краснодар, 2010. 52 с.
- 6 Куликова Н. А., Лебедева Г. Ф. Гербициды и экологические аспекты их применения. М., 2010. 152 с.
- 7 Мартынов А.Н., Беляева Н.В., Григорьева О.И. Современные проблемы лесовыращивания. Химический и комплексный уход за лесом. СПб, 2008. 80 с.
- 8 Нефтеокисляющий штамм *Rhodococcus erythropolis* В2 как основа создания биопрепарата для ликвидации углеводородных загрязнений и рекультивации земель / Э. В. Карасева, Н. Н. Волченко, А. А. Худокормов, А. А. Самков, С. Г. Карасев, Е. В. Батина, С. М. Самкова // Научный журнал КубГАУ. 2012. Т. 9, № 83. С. [1-14].
- 9 Организация метаболических путей и молекулярно-генетические механизмы биodeградации ксенобиотиков у микроорганизмов (обзор) / В. Г. Хоменков, А. Б. Шевелев, В. Г. Жуков, Н. А. Загустина, А. М. Безбородов, В. О. Попов // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. Т. 44, № 2. С. 133-152.

- 10 Перспективы применения гербицида имазамокс / Е. В. Болтухина, В. П. Чернышев, А. Е. Шешенев, С. Д. Каракотов // Вестник защиты растений. 2017. Т. 1, № 91. С. 38-42.
- 11 Скрябин Г. К., Головлева Л. А. Использование микроорганизмов в органическом синтезе. М., 1976. 238 с.
- 12 Утилизация пестицидов актинобактериями / И. С. Гончарова, Ю. В. Кирганова, Э.В. Карасева, А. А. Самков // Биология – наука XXI века. 2018. С. 72
- 13 Шутов И. В., Бельков, В. П. Применение гербицидов и арборицидов в лесовыращивании. М., 1989. 223 с.
- 14 Якимович Е. А., Сорока С. В., Ивашкевич А. А. Методические рекомендации по борьбе с борщевиком Сосновского. Минск, 2011. 76 с.
- 15 2-Hydroxypenta-2,4-dienoate Metabolic Pathway Genes in a Strong Polychlorinated Biphenyl Degradar, *Rhodococcus sp.* strain RHA1 / M. Sakai, K. Miyauchi, N. Kato, E. Masai, M. Fukuda // Applied and Environmental Microbiology. 2003. Vol. 69, № 1. P. 427-433.
- 16 Adsorption of Imazamox herbicide onto Filtrasorb 400 activated carbon / C. Morlay, E. Quivet, M. Pilshofer, R. Faure, J. P. Joly // J Porous Mater. 2012. № 19. P. 79-86.
- 17 AtzABC Catabolic Gene Probe from Novel Atrazine-Degrading *Rhodococcus* Strain Isolated from a Nigerian Agricultural Soil / A. F. Umar, F. Tahir, M. J. Larkin, O. M. Oyawoye, B. L. Musa¹, M. B. Yerima, E. B. Agbo // Advances in Microbiology. 2012. № 2. P. 593-597.
- 18 AtzC Is a New Member of the Amidohydrolase Protein Superfamily and Is Homologous to Other atrazine-Metabolizing Enzymes / M. J. Sadowsky, Z. Tong, M. de Souza, L. P. Wackett // Journal of Bacteriology. 1998. Vol. 180, № 1. P. 152-158.
- 19 Biodegradation of imazapyr in typical soils in Zhejiang Province, China / X. Wang, S. Zhou, H. Wang, D. Fan // Journal of Environmental Sciences. 2005. Vol. 17, № 4. P. 593-597.

20 Characterization of *Arthrobacter nicotinovorans* HIM, an atrazine-degrading bacterium, from agricultural soil New Zealand / J. Aislabie, A. K. Bej, J Ryburn, N. Lloyd, A. Wilkins // FEMS Microbiology Ecology. 2005. № 52. P. 279-286.

21 Characterization of Biphenyl Catabolic Genes of Gram-Positive Polychlorinated Biphenyl Degradator *Rhodococcus sp.* Strain RHA1 / E. Masai, A. Yamada, J. M. Healy, T. Hatta, K. Kimbara, M. Fukuda, K. Yano // Applied and Environmental Microbiology. 1995. Vol. 61, № 6. P. 2079-2085.

22 Degradation of the herbicide imazapyr by Fenton reactions / G. Kaichouh, N. Oturan, M. A. Oturan, K. E. Kacemi, A. E. Hourch // Environ Chem Lett. 2004. № 2. P. 31-33.

23 Donnelly P. K., Entry J. A., Crawford D. L. Degradation of Atrazine and 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid by Mycorrhizal Fungi at Three Nitrogen Concentrations in Vitro // Applied and Environmental Microbiology. 1993. Vol. 59. P. 2642-2647.

24 Gianelli V. R., Bedmar F., Costa J. L. Persistence and sorption of imazapyr in three Argentinean soils // Environmental Toxicology and Chemistry. 2014. Vol. 33, № 1. P. 29-34.

25 Heterologous expression of alkene monooxygenase from *Rhodococcus rhodochromus* B-276 / T. J. Smith, J. S. Lloyd, S. C. Gallagher, W. L. J. Fosdike, J.C. Murrell, H. Dalton // Eur. J. Biochem. 1999. № 260. P. 446-452.

26 Identification of a Novel Dioxygenase Involved in Metabolism of o-Xylene, Toluene, and Ethylbenzene by *Rhodococcus sp.* strain DK17 / D. Kim, J.C. Chae, G. J. Zylstra, Y. S. Kim, S. K. Kim, M. H. Nam, Y. M. Kim, E. Kim // Applied and Environmental Microbiology. 2004. Vol. 70, № 12. P. 7086-7092.

27 Imazamox microbial degradation by common clinical bacteria: *Acinetobacter baumannii* IB5 isolated from black soil in China shows high potency / C. Liu, X. Yang, Y. Lai, H. Lu, W. Zeng, G. Geng, F. Yang // Journal of Integrative Agriculture. 2016. Vol. 15, № 8. P. 1798-1807.

28 Imidazolinone degradation in soil in response to application history / A. C. Bundt, L. A. Avila, A. Pivetta, D. Agostinetto, D. P. Dick, P. Burauel // Planta Daninha. 2015. Vol. 33, № 2. P. 341-349.

- 29 Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies / A. Chowdhury, S. Pradhan, M. Saha, N. Sanyal // Indian J. Microbiol. 2008. №48. P. 114-127.
- 30 Insight in the PCB-degrading functional community in long-term contaminated soil under bioremediation / I. Petric, D. Hrsak, S. Fingler, N. Udikovic-Kolic, D. Bru, F. Martin-Laurent // Journal of soils and sediments. 2011. Vol. 11, № 2. P. 290-300.
- 31 Kinetics and reactional pathway of Imazapyr photocatalytic degradation Influence of pH and metallic ions / M. Carrier, N. Perol, J. M. Herrmann, C. Bordes, S. Horikoshi, J. O. Paise, R. Baudot, C. Guillard // Applied Catalysis B: Environmental. 2006. № 65. P. 11-20.
- 32 Kitagawa W., Kimura N., Kamagata Y. A Novel p-Nitrophenol Degradation Gene Cluster from a Gram-Positive Bacterium, *Rhodococcus opacus* SAO101 // Journal of Bacteriology. 2004. Vol. 186, № 15. P. 4894-4902.
- 33 Lovley D. R. Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation // Nature Reviews Microbiology. 2003. № 1. P. 35-44.
- 34 McGenity T. J., Timmis K. N., Nogales B. Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols. Colchester., 2017. 241 p.
- 35 Mechanism of 4-Nitrophenol Oxidation in *Rhodococcus sp.* strain PN1: Characterization of the Two-Component 4-Nitrophenol Hydroxylase and Regulation of Its Expression / M. Takeo, M. Murakami, S. Niihara, K. Yamamoto, M. Nishimura, D. Kato, S. Negoro // Journal of Bacteriology. 2008. Vol. 190, № 22. P. 7367-7374.
- 36 Microbial Bioremediation: A Metagenomic Approach / M. Pushpanathana, S. Jayashreea, P. Gunasekaranb, J. Rajendhran // Microbial Biodegradation and Bioremediation. 2014. № 17. P. 407-419.
- 37 Miuran A., Dalton H. Purification and Characterization of the Alkene Monooxygenase from *Nocardia corallina* B-276 // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 1994. Vol. 59, № 5. P. 853-859.
- 38 Monocyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by *Rhodococcus sp.* strain DK17 / D. Kim, Y. Kim, S. Kim, S. W. Kim, G. J. Zylstra, Y. M. Kim, E. Kim // Applied and Environmental Microbiology. 2002. Vol. 68, № 7. P. 3270-3278.

39 Mulbry W., Kearney P. C. Degradation of pesticides by micro-organisms and the potential for genetic manipulation // Crop Protection. 1991. Vol. 10, № 5. P. 334-346.

40 Mutations in corn (*Zea mays* L.) conferring resistance to imidazolinone herbicides / K. Newhouse, B. Singh, D. Shaner, M. Stidham // Theor Appl Genet. 1991. № 83. P. 65-70.

41 Safarpour H., Asiaie R., Katz S. Quantitative analysis of imazamox herbicide in environmental watersamples by capillary electrophoresis electrosprayionization mass spectrometry // Journal of Chromatography A. 2004. № 1036. P.217-222.

42 Singh D. K. Biodegradation and bioremediation of pesticide in soil: concept, method and recent developments // Indian J. Microbiol. 2008. № 48. P. 35-40.

43 The Atrazine Catabolism Genes atzABC Are Widespread and Highly Conserved / M. L. De Souza, J. Seffernick, B. Martinez, M. J. Sadowsky, L. P. Wackett // Journal of Bacteriology. 1998. Vol. 180, №7. P. 1951-1954.

44 The atzB Gene of *Pseudomonas sp.* strain ADP Encodes the Second Enzyme of a Novel Atrazine Degradation Pathway / K. L. Boundy-Mills, M. L. De Souza, R. T. Mandelbaum, L. P. Wackett, M. J. Sadowsky // Applied and Environmental Microbiology.1997. Vol. 63, № 3. P. 916-923.

45 Topp E. A comparison of three atrazine-degrading bacteria for soil bioremediation // Biol Fertil Soils. 2001. № 33. P. 529-534.

46 Vischetti C., Casucci C., Perucci P. Relationship between changes of soil microbial biomass contentand imazamox and benfluralin degradation // Biol Fertil Soils. 2002. №35. P. 13-17.

47 Wang X., Wang H., Fan D. Degradation and metabolism of imazapyr in soils under aerobic and anaerobic conditions // International Journal of Environmental Analytical Chemistry. 2006. Vol. 86, № 8. P. 541-551.

48 Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence / P. G. Rieger, H. M. Meier, M. Gerle, U. Vogt, T. Groth, H. J. Knackmuss // Journal of Biotechnology. 2002. № 94. P. 101-123.