УДК 631.46:579.26

ЧИСЛЕННОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПОЧВЕ С РАЗЛИЧНЫМИ КОНЦЕНТРАЦИЯМИ ПЕСТИЦИДОВ И ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ

О.Ю. Ксенофонтова

Саратовский государственный университет,
кафедра микробиологии и физиологии растений
E. mail: ksenofontova64@mail.ru

Изучено действие различных доз широко используемых (глин, каратэ, картоцид, хлортиазид) и новых (гербицид 3249, семихинон, нитролон, юглон) пестицидов на количественные показатели микроорганизмов почвы. Прослежена динамика изменения численности актиномицетов, плесневых грибов и гетеротрофов при внесении различных доз пестицидов. Доказана элиминация каратэ, картоцида, нитролона и хлоритиазида из почвы под влиянием различных штаммов бактерий. Экспериментально установлено, что виды родов *Bacillus* и *Pseudomonas* способны усваивать пестициды как единственный источник углерода, следовательно, разрушать их. В процессе опытов выделены микробы-деструкторы каратэ, картоцида, нитролона и хлортиазида.

Number of Microorganisms in Soil with Various Concentrations of Pesticides and Allocation of Microorganisms Destructors

O.U. Ksenofontova

Action of various dozes of widely used (glin, karate, chlorthyasid, karoticid) and new (gerbicid 3249, semichinon, nitronol, ugnol) pesticides on quantity indicators of soil microorganisms is studied. Dynamics of change of number actinomycetes, mycelial fungis and heterotrophs is tracked at entering various dozes of pesticides. It is proved elimination of karate, karoticid, nitronol from soil under influence various bacterial strains. It is experimentally established, that some *Bacillus* and *Pseudomonas* species are capable assimilate pesticides as single a source of carbon, hence to destroy them. During experiences we receive microbes destructors of karate, karoticid, nitronol, chlorthyasid.

Одной из негативных проблем современности является глобальное химическое загрязнение биосферы, что порождает обоснованное беспокойство о возможном нарушении экологического равновесия в отдельных экосистемах. Особую опасность представляют синтетические соединения, поступающие в природу в результате хозяйственной деятельности человека. Важное место среди них занимают химические средства защиты растений и животных – пестициды [1].

Использование пестицидов с целью повышения продуктивности в растениеводстве и животноводстве обусловливает рост ассортимента и объемов их применения [2]. Способность ксенобиотиков распространяться в окружающей среде создает проблемы, связанные с длительностью их сохранения в природных условиях [3]. Поэтому знание скорости разрушения веществ биологическими системами является необходимым и ценным.

Однако независимо от форм и способов применения пестициды продолжают попадать в почву, накапливаться в ней и влиять на микробные сообщества. Установлено, что реакция почвенных микроорганизмов на действие пестицидов чрезвычайно разнообразна и зависит от многих факторов: химической природы, персистентности препаратов, почвенно-климатических характеристик и пр. [4, 5]. Необходимость исследования взаимодействия пестицидов с почвенной микрофлорой обусловлена важнейшей ролью микроорганизмов в создании почвенного плодородия и оптимизации условий вегетации растений [6]. Поэтому важно значение разработок микробиологического способа очистки почвы от пестицидов. В связи с этим ведутся поиски штаммов микробов-деструкторов пестицидов и осуществляется интродукция их в природные экосистемы [7–9]. Представляется актуальным также вопрос замены токсичных пестицидов на препараты нового типа, менее загрязняющие среду и обладающие способностью разрушаться под воздействием микроорганизмов [10, 11].

В связи с этим нами была проведена оценка влияния производственных и экспериментальных доз новых пестицидов, синтезированных в НИИ ХСЗР (г. Москва), – картоцида, нитролона, семихинона, хлортиазида, юглона, гербицида 3249, а также препаратов, широко используемых на территории Саратовской области, глин и каратэ на почвенные микроорганизмы и выделены штаммы бактерий, способные использовать пестициды в процессе жизнедеятельности.

© О.Ю. Ксенофонтова, 2007

Материалом для экспериментов служила почва, взятая с участков землепользования экспериментального хозяйства НИИСХ «Юго-Восток», расположенного на правом берегу реки Волги, верхней денудационной поверхности Приволжской возвышенности. Почва представляет собой легкоглинистый южный чернозем, содержащий до 2,55% гумуса и имеющий pH от 6,8 до 7,2 [12]. Отбор проб почвы осуществляли по принципу «конверта» в стерильный пакет [13]. Средний образец почвы, массой 2,5 кг доставляли в лабораторию, где помещали в четыре пластмассовых сосуда и вносили экспериментальные дозы пестицида.

Испытывали три дозы каждого пестицида: производственную концентрацию (ПК) и превышающие её в 10 и 100 раз. ПК рассчитывали по действующему веществу согласно рекомендациям производителей препаратов. Пестицид предварительно разводили в растворителе (в воде, ацетоне или в спирте), причем объем растворителя для всех доз был одинаковым. Полученные дозы препарата вносили в три сосуда с почвой и тщательно перемешивали, а в четвертый (контрольный) сосуд добавляли только растворитель в том объеме, в котором разводили исследуемые концентрации пестицида. Контрольные и опытные инкубационные сосуды на протяжении всего опыта находились в одинаковом режиме температуры (20–25°С) и увлажнения (60% ПВ).

Численность микроорганизмов в почве, содержащей различные концентрации пестицида, определяли методом последовательных разведений почвенной суспензии [13] сразу после внесения препарата, а также на 5-е и 30-е сутки. Исследования проб из инкубационных сосудов были направлены на изучение численности гетеротрофных бактерий, актиномицетов и плесневых грибов при внесении различных доз пестицида, а также на накопление культур, устойчивых к действию препарата. Высев почвенных проб производили трехкратно. Количество микробов, содержащихся в одном грамме контрольной почвы, было принято нами за 100%. Динамику численности микроорганизмов в почве с пестицидом отражали в процентах по отношению к контролю.

Проведенные нами эксперименты по изучению действия различных доз гербицидов (глин, 3249, семихинон, юглон), фунгицидов (картоцид, хлортиазид), инсектицидов (каратэ) и нового, неопределенного еще назначения, пестицида нитролона на численность актиномицетов, гетеротрофных бактерий и плесневых грибов позволили выявить некоторые особенности их взаимодействия (таблица). Так, гербицид 3249 и глин одинаково стимулировали размножение гетеротрофных бактерий и грибов, но последний усваивался и актиномицетами, способствуя увеличению их численности в почве. Картоцид и хлортиазид стимулировали рост гетеротрофных бактерий, но угнетали размножение актиномицетов и грибов.

Действие новых пестицидов – юглона, семихинона и нитролона – было неоднозначным. Характер действия юглона на микроорганизмы аналогичен действию гербицидов. Семихинон проявил сильное ингибирующее воздействие на актиномицеты и бактерии, но стимулировал нарастание плесневых грибов. Это дало нам основание говорить о бактерицидных свойствах семихинона. Нитролон же, наоборот, стимулировал рост актиномицетов, но подавлял бактерии и грибы в первые дни эксперимента. Это свидетельствует о его фунгицидной активности, но непродолжительной по времени. Гербициды глин и юглон не проявляли ингибирующего воздействия на актиномицеты, гетеротрофные бактерии и плесневые грибы. Хлортиазид в наших опытах подавлял актиномицеты и грибы, но стимулировал размножение гетеротрофных бактерий, семихинон же ингибировал актиномицеты и бактерии, но стимулировал рост грибов.

Экспериментально установлено об избирательном влиянии пестицидов на различные физиологические группы микроорганизмов. Более того, внесение в почву некоторых из них стимулировало размножение микробов, что позволяет нам предположить, что эти препараты являются наиболее деградабельными и могут использоваться микроорганизмами как источник питания и, следовательно, разрушать их.

Воздействие различных доз пестицидов на микроорганизмы почвы

Пестициды	Доза, ПК, мг/кг	Численность микроорганизмов в 1 г почвы					
		Актиномицеты, КОЕ · 10^3		Бактерии, КОЕ · 10^5		Грибы, КОЕ · 10^2	
		5 сут	30 сут	5 сут	30 сут	5 сут	30 сут
Гербицид 3249	ПК 1	78 ± 3	76 ± 3	79 ± 2	102 ± 2	46 ± 2	40 ± 3
	10 ПК	77 ± 2	72 ± 2	87 ± 1	105 ± 3	51 ± 3	52 ± 3
	100 ПК	71 ± 1	71 ± 2	112 ± 2 *	103 ± 5	60 ± 2 *	44 ± 1
	К	79 ± 5	80 ± 2	80 ± 3	75 ± 3	47 ± 2	50 ± 3
Глин	ПК 7	79 ± 3	80 ± 1	51 ± 2	102 ± 2	106 ± 5	98 ± 2
	10 ПК	80 ± 2	85 ± 2	67 ± 2	100 ± 2	128 ± 1	115 ± 3
	100 ПК	74 ± 2	79 ± 2	93 ± 3	105 ± 4	150 ± 4	97 ± 5
	К	81 ± 3	88 ± 3	65 ± 2	68 ± 3	117 ± 3	110 ± 3
Каратэ	ПК 1,5	84 ± 3	87 ± 5	76 ± 1 *	65 ± 1	56 ± 3 *	53 ± 2 *
	10 ПК	103 ± 3	75 ± 3	70 ± 1 *	52 ± 3 *	45 ± 2	31 ± 3
	100 ПК	122 ± 1	147 ± 1	77 ± 2 *	50 ± 1	13 ± 1	2 ± 1
	К	88 ± 2	75 ± 3	69 ± 3	50 ± 2	62 ± 2	75 ± 3
Картоцид	ПК 1	81 ± 2	78 ± 3	62 ± 2	48 ± 2	69 ± 2	101 ± 3
	10 ПК	75 ± 3	84 ± 4	89 ± 3	43 ± 1	52 ± 3	82 ± 2
	100 ПК	66 ± 1	76 ± 2	104 ± 2	51 ± 3	35 ± 2	31 ± 1
	К	78 ± 2	78 ± 2	42 ± 3	42 ± 4	115 ± 1	100 ± 3
Нитролон	ПК 1	71 ± 2	65 ± 3	72 ± 3	50 ± 2	38 ± 3	16 ± 2
	10 ПК	75 ± 3	54 ± 2	30 ± 1	49 ± 3	30 ± 2	15 ± 3
	100 ПК	81 ± 4	50 ± 2	40 ± 2	46 ± 2	25 ± 2	13 ± 4
	К	21, ± 2	37 ± 4	65 ± 2	21 ± 3	40 ± 3	10 ± 2
Семихинон	ПК 1	84 ± 2	21 ± 2 *	18 ± 1	16 ± 1	84 ± 1	186 ± 2 *
	10 ПК	120 ± 3	3 ± 1	23 ± 1 *	14 ± 1	82 ± 2	161 ± 1 *
	100 ПК	130 ± 4	2 ± 1	19 ± 1	15 ± 2	86 ± 2	138 ± 1
	К	25 ± 5	12 ± 2	25 ± 1	18 ± 3	77 ± 3	128 ± 3
Хлортиазид	ПК 1	120 ± 1 *	120 ± 2 *	39 ± 2	30 ± 1	45 ± 2 *	14 ± 1
	10 ПК	70 ± 5	120 ± 2	57 ± 3	43 ± 1	24 ± 1	7 ± 1
	100 ПК	60 ± 2	110 ± 1	79 ± 3 *	44 ± 2 *	6 ± 1	1 ± 1
	К	130 ± 3	130 ± 5	35 ± 3	18 ± 2	58 ± 3	60 ± 2
Юглон	ПК 1,2	76 ± 3	36 ± 1 *	129 ± 5	17 ± 1	31 ± 3	43 ± 6
	10 ПК	76 ± 1	55 ± 3	162 ± 2	23 ± 3	51 ± 4	38 ± 2
	100 ПК	93 ± 4	58 ± 3	180 ± 6	29 ± 2	7 ± 2	23 ± 5
	К	78 ± 3	21 ± 2	37 ± 4	6 ± 3	66 ± 2	20 ± 1

Примечание: ПК – производственная концентрация; К – контроль; * – наличие достоверности по отношению к контролю при уровне значимости $P \leq 0,05$.

Поиск микроорганизмов-деструкторов проводили в почве, имеющей высокие дозы пестицидов, путем выделения чистых культур микробов и изучения их на способность использовать углерод препаратов как единственный источник углерода. Для этого культуры засевали на плотную синтетическую среду М9 [14], содержащую пестицид. Для подтверждения расщепления субстрата использовали индикатор бромтимоловый синий. В качестве контроля использовали среду М9, содержащую глюкозу. После инкубации посевов в термостате отмечали наличие или отсутствие роста микробов и зон просветления вокруг колоний. Изменение окраски индикатора вокруг выросших колоний свидетельствовало о поглощении микроорганизмами углерода из субстрата. Использование различными штаммами микробов углерода, имеющегося в пестициде, показывало возможность его разложения. По этому признаку были отобраны штаммы деструкторы пестицидов – каратэ, картоцида, нитролона и хлортиазида.

Изучение деструктивного потенциала бактерий по отношению к каратэ проводили с помощью КФК-2. В среду М9, содержащую 300 мг/л каратэ, вносили взвесь суточных культур, использующих пестицид в качестве источника углерода и энергии, включающую

семь штаммов бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas*. Посевная доза бактерий соответствовала оптической плотности, равной 0,2 отн. ед. при 440 нм, что составляло приблизительно 10^7 м.к. в мл среды. Об изменении концентрации пестицида в среде судили по изменению поглощения в диапазоне 250–315 нм, соответствующем пику максимального поглощения препарата ($\lambda_{макс}$ = 280 нм), установленному спектрофотометрически. Контролем служила концентрация пестицида, измеренная в среде без микроорганизмов. Рост культуры отмечали в области 440 нм. Анализ полученных данных показал, что внесение взвеси бактерий изменяет количество пестицида в среде по сравнению с контролем (рис.1). На 6-е сут отмечено снижение концентрации препарата более чем в 20 раз (до 14 мг/л от исходной концентрации 300 мг/л) при непрерывном росте штаммов-деструкторов. Количественные изменения пестицида устанавливали по предварительно построенной калибровочной кривой, отражающей зависимость оптической плотности от концентрации пестицида.

При изучении деструктивной активности микробов к хлортиазиду штаммы засевали на жидкую синтетическую среду М9, содержащую 200 мг/л хлортиазида. Исходная концентрация клеток в среде соответствовала 0,1 отн. ед. оптической плотности, измеренной при длине волны 600 нм. Определение концентрации пестицида в среде и прирост биомассы проводили через 24 ч в течение 4-х суток. Оценку деструктивной активности бактерий проводили путем измерения оптической плотности среды при длине волны 328 нм, соответствующей максимуму поглощения препарата. Выявлена закономерная зависимость изменения концентрации пестицида от роста культуры. После периода лагфазы бактерии интенсивно размножались, но через 72 ч их рост прекращался. В то же время отмечалось снижение концентрации хлортиазида в среде (рис.2).

Изучение деструкции картоцида проводили спектрофотометрически в жидкой среде М9, содержащей 300 мг/л препарата. Для записи спектров использовали спектрофотометр hp 8452 A DIODE ARRAY (США).

Спектральная характеристика пестицида позволила выявить пик максимального поглощения ультрафиолетовых лучей при длине волны 225 нм, который сохранялся в течение 48 ч, что свидетельствовало о стойкости препарата в среде. Наблюдение за состоянием картоцида в среде с микроорганизмами вели в области 225 нм. Спектральный анализ проводили через каждые 24 ч в течение 3-х суток. На основании полученных данных можно предположить, что под воздействием микроорганизмов происходит трансформация картоцида, о чем свидетельствуют изменения и смещения пиков поглощения УФ-излучения (рис.3).

Биодеструкцию пестицида нитролона наблюдали в среде М9, содержащей 300 мг/л пестицида в качестве единственного источника углерода. Изучение спектральной характеристики препарата в стерильной среде М9 в течение нескольких дней выявило три пика максимального поглощения светового излучения ($\lambda_{макс}$ = 225, 310 и 480 нм). Изучив спектр пестицида в среде, было замечено изменение поглощения в течение 3-х дней в области 480 нм. Остальные пики не подвергались изменениям и отличались стабильностью. Анализ полученных данных показал, что внесение штаммов-деструкторов (*Pseudomonas fluorescens* и *Bacillus subtilis*), выделенных из почвы, длительное время содержащей нитролон, в среду с пестицидом вызывает изменение спектра в области 225 нм, что позволяет предположить о деградации препарата (рис.4).

Таким образом, установлено, что препараты хлортиазид, картоцид и нитролон разрушались бактериями родов *Bacillus (B. mycoides, B. megaterium, B. cereus, B. subtilis)* и *Pseudomonas fluorescens*, которые могут быть использованы в качестве деструкторов указанных пестицидов. Представители этих родов в основном и участвуют в детоксикации почвы от различных ксенобиотиков. Внесение оптимальных доз бактерий-деструкторов, установленных экспериментальным путем, может оказать существенное влияние на уровень концентрации пестицидов в столь важной природной среде, как почва.

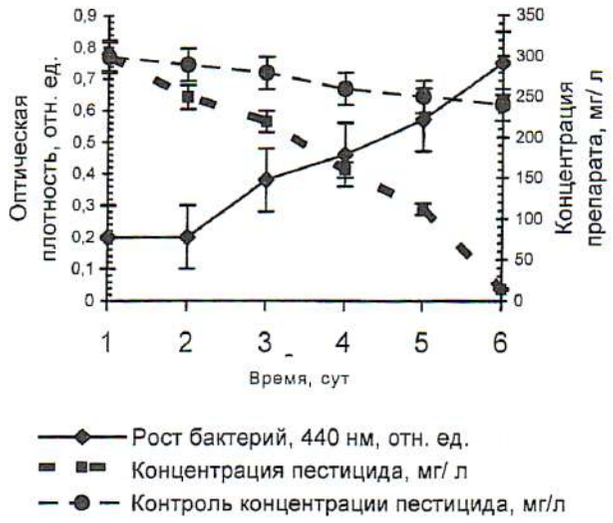

Рис.1. Деструкция каратэ смесью бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas*

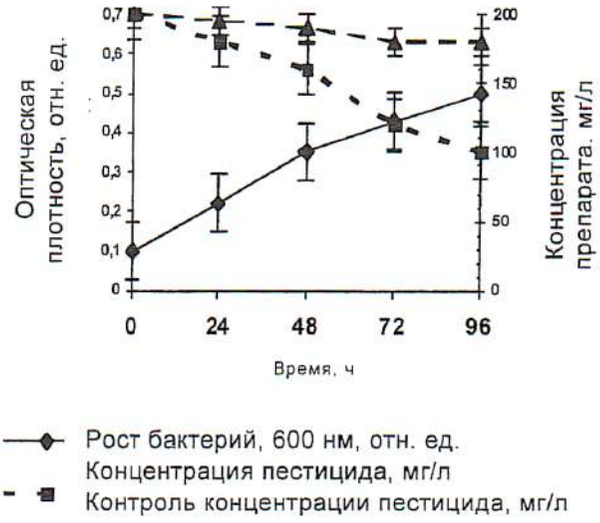

Рис.2. Деструкция хлортиазида бактериями *Bacillus subtilis*

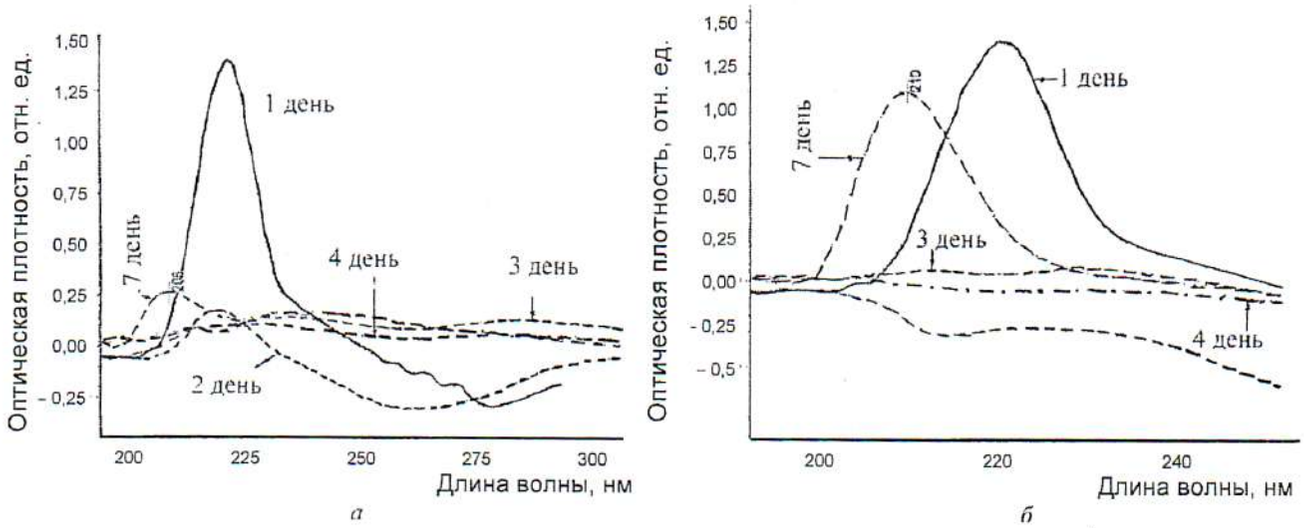

Рис.3. Спектральный анализ деструкции картоцида штаммами *Bacillus mycoides* (*а*) и *Bacillus megaterium* (*б*)

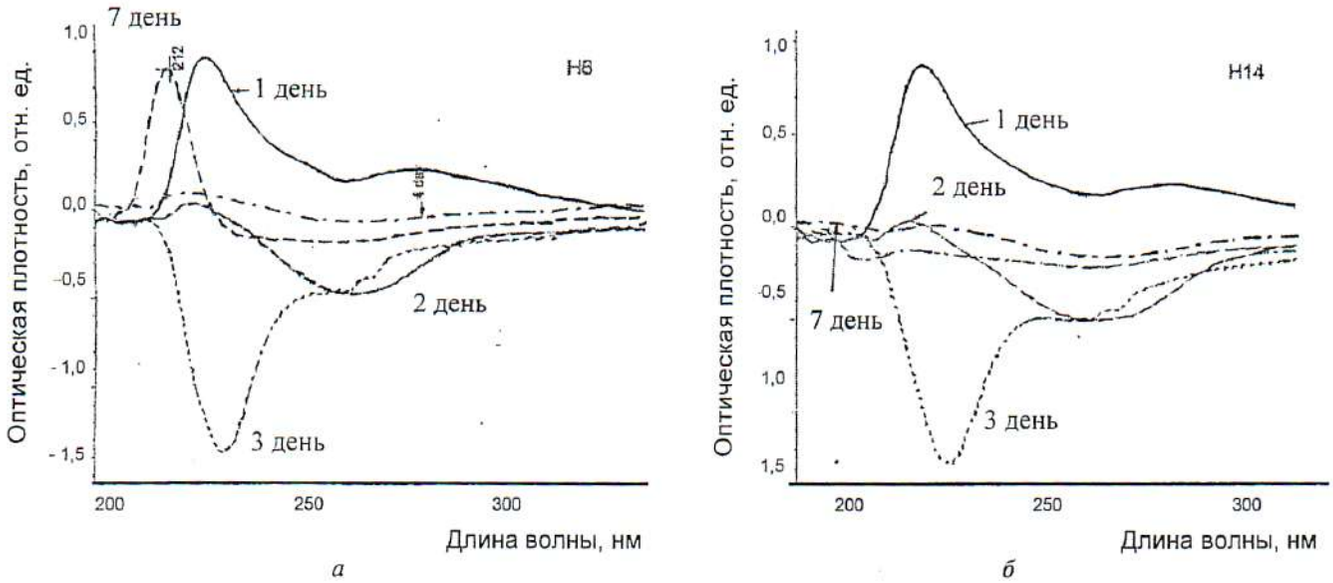

Рис.4. Спектральный анализ деструкции нитролона штаммами *Pseudomonas fluorescens* (*а*) и *Bacillus subtilis* (*б*)

Библиографический список

1. *Ермаков Н.М., Корнеев Г.А. и др.* Неспецифическая профилактика зооантропонозных инфекций (дезинсекция), пути её развития // Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье. Саратов, 2001. Вып.1. С.66–69.

2. *Ананьева Н.Д.* Микробиологические аспекты самоочищения и устойчивости почв. М., 2003. 223 с.

3. *Юрин В.М.* Основы ксенобиологии. М., 2002. 267 с.

4. *Груздев В.А.* Химическая защита растений. М., 1987. 415 с.

5. *Круглов Ю.В.* Микрофлора почвы и пестициды. М., 1991. 128 с.

6. *Нетрусов А.И., Бонч-Осмоловская Е.А., Горленко В.М. и др.* Экология микроорганизмов. М., 2004. 272 с.

7. *Васильева Г.К., Суровцева З.Г., Белоусов В.В.* Разработка микробиологического способа для очистки почвы от загрязнения пропанидом и 3,4-дихлоранилином // Микробиология. 1994. Т.63, №1. С.129–144.

8. *Заборина О.Е., Барышникова Л.М., Баскунов Б.П. и др.* Разложение пентахлофенола в почве интродуцированным штаммом *Streptomyces Rochei* 303 и активированной почвенной микрофлорой // Микробиология. 1997. Т.66, №5. С.661–666.

9. *Кочетков В.В., Балакшина В.В., Мордухова Е.А., Боронин А.М.* Плазмиды биодеградации нафталина в ризосферных бактериях рода *Pseudomonas* // Микробиология. 1997. Т.66, №2. С.211–216.

10. *Плотникова Е.Г., Алтынцева О.В., Кошелева И.А. и др.* Бактерии-деструкторы полициклических ароматических углеводородов, выделенные из почв и донных отложений района солеразработок // Микробиология. 2001. Т.70, №1. С.61–69.

11. *Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Воронин Е.С.* Сельскохозяйственная биотехнология. М., 2003. С.72–75.

12. *Медведев И.Ф.* Агроэкологические основы повышения плодородия склоновых черноземных почв Поволжья: Дис. ... д-ра сельхоз. наук, 2001. 384 с.

13. *Егоров Н.С.* Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М., 1983. 224 с.

14. *Ralston J.R., Vela J.R.* A medium for detecting phenol-degrading bacteria // Bacteriology. 1974. V.37, №3. P.347–351.

УДК 575.174.595.773.4

БИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА СООБЩЕСТВ, ПОПУЛЯЦИЙ, КАРИОТИПА И мтДНК ХИРОНОМИД (*CHIRONOMIDAE, DIPTERA*)

Н.В. Полуконова, М.В. Ермохин*, М.Ю. Воронин*, А.Г. Демин*, И.В. Катаева*, И.А. Федорова, М.С. Козлов*

Саратовский государственный медицинский университет,
кафедра общей биологии
* Саратовский государственный университет,
кафедра морфологии и экологии животных,
кафедра биохимии
E-mail: ecoton@rambler.ru

В работе показаны возможности и перспективы комплексного подхода к оценке качества среды в водных экосистемах различных типов на основе использования личинок комаров-звонцов. Продемонстрированы преимущества и недостатки исследований на различных уровнях их организации: сообщества (таксоценозы), популяции, особи, клетки и молекулярном уровне.

Biological Monitoring of Aquatic Ecosystems on the Base Midges (*Chironomidae, Diptera*) Communities, Population, Karyotype and mtDNA Analysis

N.V. Polukonova, M.V. Yermokhin, M.Yu. Voronin, A.G. Djomin, I.V. Kataeva, I.A. Fedorova, M.S. Kozlov

Possibility and perspectives of the complex approach to environment quality estimation are shown in this article for the different types of aquatic ecosystems on base of the midge larvae using. The advantage and defect of the investigations on different levels of its organization (community (taxocenosis), populations, individuals, cells and molecular level) are demonstrated.

© Н.В. Полуконова, М.В. Ермохин, М.Ю. Воронин, А.Г. Демин, И.В. Катаева, И.А. Федорова, М.С. Козлов, 2007

Введение

На современном этапе развития биологического мониторинга водных экосистем необходимо внедрение комплексного подхода, включающего исследование разных уровней организации живого – биоценотического, популяционно-видового, организменного, клеточного и молекулярного. Уникальным модельным объектом, удовлетворяющим всем требованиям такого подхода, служат личинки комаров-звонцов (Chironomidae, Diptera). Они широко используются для биоиндикации влияния антропогенных факторов на качество среды [1] и по сравнению с другими гидробионтами имеют ряд преимуществ. Во-