

УДК [631.46+632.95](072.8)

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ МИКРООРГАНИЗМОВ И ПЕСТИЦИДОВ В ПОЧВЕ

О.Ю. Ксенофонтова, П.А. Чиров

*Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского
Россия, 410012, Саратов, Астраханская, 83*

Поступила в редакцию 24.12.04 г.

Экспериментальные данные о взаимодействии микроорганизмов и пестицидов в почве. – Ксенофонтова О.Ю., Чиров П.А. – Изучено действие пестицидов на почвенные микроорганизмы. Показана динамика численности микробов и деструкция бактериями родов *Bacillus* и *Pseudomonas*, которые использовали пестициды как источник питания и энергии.

Ключевые слова: пестициды, гербицид 3249, глины, каратэ, картоцид, нитролон, семихинон, хлортиазид, юглон, почвенные микроорганизмы, биодеструкция.

Experimental data on microorganism-pesticide interaction in soil. – Xenofontova O.Yu., Chirov P.A. – The influence of pesticides on soil microorganisms was studied. The dynamics of the microbe quantity and the destructive activity of some microorganisms of the *Bacillus* and *Pseudomonas* genera (they assimilate pesticides as a nutritious and energy substratum) were discovered.

Key words: pesticide, herbicide 3249, glin, karate, kartocid, nitrolon, semiquinone, chlortiasid, uglon, soil microorganisms, biodestruction.

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 (Вашков и др., 1965; Алексеев, 1975; Ермаков и др., 2001).

Использование пестицидов с целью повышения продуктивности в растениеводстве и животноводстве обуславливает рост ассортимента и объемов их применения. Вторая половина XX в., как известно, считается эрой синтетических соединений, абсолютно чуждых живой природе (Ананьева, 2003). В связи с этим в 1999 г. на совещании специалистов Госсанэпидслужбы России была обсуждена необходимость регламентации средств защиты растений и представлены принципы оценки пестицидов, используемых в ветеринарной практике. Более того, требовалось, чтобы вновь создаваемые препараты не обладали отдаленными токсическими последствиями и не создавали предпосылок для нарушения экологического баланса в различных экосистемах.

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, перси-

стентности препаратов, почвенно-климатических характеристик и пр. (Груздев, 1987; Круглов, 1991). Необходимость исследования взаимодействия пестицидов с почвенными микроорганизмами обусловлена их важнейшей ролью в создании почвенного плодородия и оптимизации условий вегетации растений. Поэтому особое значение имеют результаты, достигнутые при применении микробиологического способа очистки почвы от пестицидов (Васильева и др., 1994). В связи с этим ведутся поиски штаммов микробов-деструкторов пестицидов и интродукция их в природные экосистемы (Заборина и др., 1997; Кочетков и др., 1997; Плотникова и др., 2001; Шевелуха и др., 2003). Представляется актуальным также вопрос замены токсичных пестицидов на препараты нового типа, менее загрязняющие среду и обладающие способностью разрушаться под воздействием микроорганизмов.

Именно поэтому 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. В результате выделены штаммы бактерий, способные использовать пестициды в процессе жизнедеятельности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для экспериментов служила почва, взятая с участков землепользования экспериментального хозяйства НИИСХ «Юго-Восток», расположенного на правом берегу р. Волги. Почва представляет собой легкоглинистый южный чернозем, содержащий до 2.55% гумуса и имеющий рН от 6.8 до 7.2 (Медведев, 2001). Отбор проб почвы осуществляли по принципу «конверта» (Егоров, 1983) в стерильный пакет. 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 дозы, превышающие её в 10 и 100 раз. ПК рассчитывали по действующему веществу препарата. Пестициды предварительно разводили в растворителе (вода, ацетон, спирт), 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°C) и увлажнения (60% ПВ).

Численность микроорганизмов в почве, содержащей различные концентрации пестицида, определяли методом последовательных разведений почвенной суспензии (Егоров, 1983) сразу после внесения препарата, а также на пятые и тридцатые 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, содержащееся в одном грамме контрольной почвы, было принято нами за 100%. Динамику численности микроорганизмов в почве с пестицидом отражали в процентах по отношению к контролю.

Поиск микроорганизмов-деструкторов проводили в почве, содержащей высокие дозы пестицидов, путем выделения чистых культур микробов и изучения их на способность использовать углерод препаратов как единственный источник углеродного питания. Для этого культуры засеивали на плотную синтетическую среду М9 (Ralston, Vela, 1974), содержащую пестицид. Для подтверждения расщепления субстрата использовали индикатор бромтимоловый синий. В качестве контроля использовали среду М9, содержащую глюкозу. После инкубации посевов 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, содержащегося в пестициде, указывало на возможность его разложения. По этому признаку были отобраны штаммы-деструкторы пестицидов каратэ, картоцида, нитролона и хлортиазид.

Изучение деструктивного потенциала бактерий по отношению к каратэ проводили с помощью концентрационного фотоэлектроколориметра (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 длине волны 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, соответствующему пику максимального поглощения препарата ($\lambda_{\text{max}} = 280$ нм), установленным спектрофотометрически. Контролем служила концентрация пестицида, измеренная в среде без микроорганизмов. Рост культуры отмечали в области 440 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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, что 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 опы-

тах подавлял актиномицеты и грибы, но стимулировал размножение гетеротрофных бактерий, семихинон же ингибировал актиномицеты и бактерии, но стимулировал рост грибов.

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	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 $p \leq 0.05$.

Проведенные наблюдения за изменением численности микробов в почве, содержащей различные пестициды, позволяют сделать вывод об их избирательном влиянии на различные физиологические группы микроорганизмов. Более того, внесение в почву некоторых из них стимулировало размножение микробов, что

свидетельствует об использовании микроорганизмами в качестве источников питания и, следовательно, разрушении их.

Анализ деструктивной активности микробов показал, что внесение взвеси бактерий изменяет количество пестицида каратэ в среде по сравнению с контролем (рис. 1).

На протяжении шести суток отмечено снижение концентрации препарата при непрерывном росте штаммов-деструкторов. На шестые сутки концентрация каратэ соответствовала 14 мг/л от исходной концентрации (300 мг/л), т.е. произошло снижение содержания пестицида более чем в 20 раз. 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 на КФК-2 при длине волны 600 нм. Определение концентрации пестицида в среде и прирост биомассы проводили через 24 часа в течение четырех суток (рис. 2).

При оценке деструктивной активности выделенного штамма *Bacillus subtilis* путем измерения оптической плотности среды при длине волны 328 нм, соответствующей максимуму поглощения препарата (рис. 3), была выявлена закономерная зависимость изменения концентрации пестицида от роста культуры. После периода лаг-фазы, когда бактерии интенсивно размножались, отмечалось снижение концентрации хлортиазида в среде до 100 мг/л, т.е. в 2 раза.

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

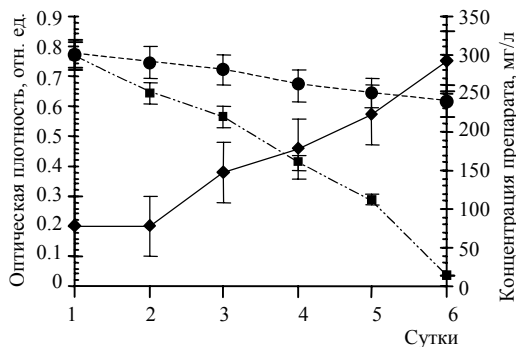


Рис. 1. Деструкция пестицида каратэ смесью культур бактерий *Bacillus* и *Pseudomonas*: ♦ – рост бактерий, D 440, отн. ед.; ■ – концентрация пестицида, мг/л; ● – контроль концентрации пестицида, мг/л

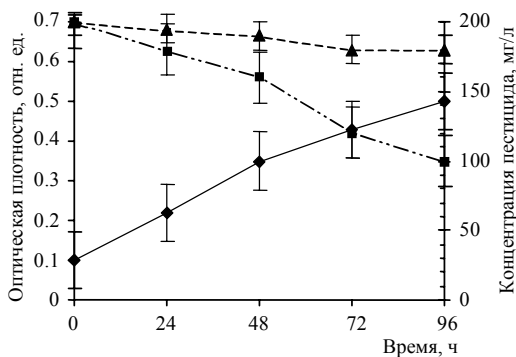


Рис. 2. Деструкция пестицида хлортиазида штаммом *Bacillus subtilis*: ♦ – рост бактерий, 600 нм, отн. ед.; ■ – концентрация пестицида, мг/л; ▲ – контроль концентрации пестицида, мг/л

Спектральная характеристика пестицида позволила выявить пик максимального поглощения ультрафиолетовых лучей при длине волны 225 нм, который сохранялся в течение 48 часов, что свидетельствовало о стойкости препарата в среде.

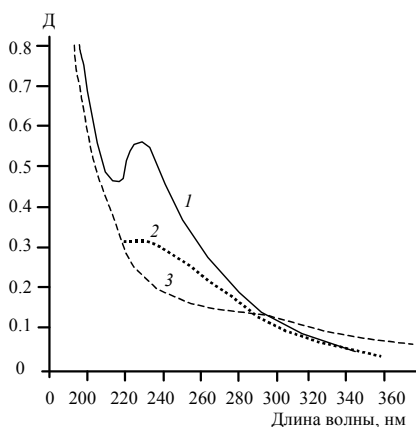


Рис. 3. Спектральный анализ деградации хлортиазид-картоцида: 1 – перед инкубацией, 2 – через 6 суток инкубации, 3 – через 8 суток инкубации

Наблюдение за состоянием картоцида в среде с микроорганизмами вели в области 225 нм. Спектральный анализ проводили через каждые 24 часа в течение трех суток. На основании полученных данных можно полагать, что под воздействием микроорганизмов происходит трансформация картоцида; выявлены изменения и смещения пиков поглощения УФ-излучения.

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 ($\lambda_{\max} = 225, 310$ и 480 нм). При изучении спектра пестицида в среде было замечено изменение поглощения в течение

трех дней в области 480 нм. Остальные пики не подвергались изменениям и отличались стабильностью. Анализ полученных данных показал, что внесение в среду с пестицидом штаммов-деструкторов (*Pseudomonas fluorescens* и *Bacillus subtilis*), выделенных из почвы, длительное время содержащей нитролон, вызывает изменение спектра в области 225 нм, что позволяет предположить о деградации препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные наблюдения за изменением численности микробов в почве, содержащей различные пестициды, позволяют сделать вывод об их избирательном влиянии на различные физиологические группы микроорганизмов. Препараты хлортиазид, картоцид и нитролон разрушались бактериями рода *Bacillus* (*B. mycoides*, *B. megaterium*, *B. subtilis*) и *Pseudomonas fluorescens*, которые могут быть использованы в качестве деструкторов названных пестицидов. Представители этих родов бактерий, вероятно, и обуславливают детоксикацию 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алексеев А.Н. Перспективы разработки методов борьбы с гнусом и иксодовыми клещами // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 1975. №1. С. 3 – 10.
 Ананьева Н.Д. Микробиологические аспекты самоочищения и устойчивости почв. М.: Наука, 2003. 223 с.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

- 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.
- Ваишков В.И., Сухова М.Н., Кербабаяев Э.Б., Шнайдер Е.В. Инсектициды и их применение в медицинской практике. М.: Медицина, 1965. 524 с.
- Груздев В.А. Химическая защита растений. М.: Агропромиздат, 1987. 415 с.
- Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: Изд-во МГУ, 1983. 224 с.
- Ермаков Н.М., Корнеев Г.А., Якавлев С.А., Колнобрицкая О.А., Попов Н.В., Толоконникова С.И. Неспецифическая профилактика зооантропонозных инфекций (дезинсекция), пути её развития // Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2001. Вып. 1. С. 66 – 69.
- Заборина О.Е., Барышникова Л.М., Баскунов Б.П., Головлев Е.Л., Головлева Л.А. Разложение пентахлорофенола в почве интродуцированным штаммом *Streptomyces Rochei* 303 и активированной почвенной микрофлорой // Микробиология. 1997. Т. 66, №5. С. 661 – 666.
- Кочетков В.В., Балакишина В.В., Мордухова Е.А., Боронин А.М. Плазмиды биodeградации нафталина в ризосферных бактериях рода *Pseudomonas* // Микробиология. 1997. Т. 66, №2. С. 211 – 216.
- Круглов Ю.В. Микрофлора почвы и пестициды. М.: Агропромиздат, 1991. 128 с.
- Медведев И.Ф. Агроэкологические основы повышения плодородия склоновых черноземных почв Поволжья: Дис. ... д-ра с.-х. наук. Саратов, 2001. 384 с.
- Плотникова Е.Г., Алтынцева О.В., Кошелева И.А., Пунтус И.Ф., Филонов А.Е., Гавриш Е.Ю., Демаков В.А., Боронин А.М. Бактерии-деструкторы полициклических ароматических углеводородов, выделенные из почв и донных отложений района солеразработок // Микробиология. 2001. Т. 70, №1. С. 61 – 69.
- Шевелуха В.С., Калашикова Е.А., Воронин Е.С. Сельскохозяйственная биотехнология. М.: Высш. шк., 2003. С. 72 – 75.
- Ralston J.R., Vela J.R. A medium for detecting phenol-degrading bacteria // Bacteriology. 1974. Vol. 37, №3. P. 347 – 351.