

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М.В. Ломоносова
Биологический факультет

На правах рукописи

КОЛУПАЕВ
АЛЕКСЕЙ ВЯЧЕСЛАВОВИЧ

**Почвенные микроорганизмы-биодеструкторы
органических пестицидов**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2010 г.

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Вятский государственный гуманитарный университет», г. Киров (ГОУ ВПО ВятГГУ) и Государственном научном учреждении Зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства Северо-Востока Россельхозакадемии, г. Киров

Научный руководитель **доктор биологических наук**
Широких Александр Анатольевич

Научный консультант **доктор технических наук**
Ашихмина Тамара Яковлевна

Официальные оппоненты: **доктор биологических наук**
Семенов Александр Михайлович

кандидат биологических наук
Дмитриева Елена Юрьевна

Ведущая организация
Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина РАН,
Пушино, Московская область

Защита состоится 26 октября 2010 г. в 15 ч. 30 мин. на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп. 12, Биологический факультет, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ.

Автореферат разослан _____ 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.б.н.

Пискункова Н.Ф.

Актуальность темы. Пестициды – химические средства защиты растений, интенсивное и не всегда обоснованное применение которых привело к тому, что в последнее время они рассматриваются также в числе самых опасных синтетических поллютантов (Ермаков и др., 2001; Ананьева, 2003). Одной их серьезных экологических проблем является загрязнение природных объектов органическими пестицидами, обладающими высокой токсичностью и персистентностью (Попов и др., 2003). Кроме мест интенсивного применения пестицидов, потенциальную опасность для окружающей среды и человека несут места их захоронения – специальные подземные бетонированные бункеры или колодцы. Одним из самых крупных среди таких объектов в РФ является Кильмезский полигон захоронения непригодных к использованию пестицидов и ядохимикатов (Кировская область), в котором захоронено около 590 т препаратов химической защиты. Токсичные вещества могут проникать из могильников в окружающую среду и создают угрозу для всех живых организмов, включая почвенное микробное население (Thyssen, 1998; Wodageneh, 1998). Большинство проводимых исследований посвящено изучению влияния пестицидов на популяции микроорганизмов в почвах агроценозов (Alexander, 1999; Soil pollution..., 2004), тогда как вопросы изучения почвенных микробных комплексов в районах захоронения пестицидов, освещены недостаточно. В то же время микроорганизмы, выделенные из экосистем, подвергающихся длительному воздействию пестицидов, обладают потенциалом к более быстрому разложению данных соединений (Nowak, 1998), что делает необходимым изучение микробных сообществ почв, загрязненных пестицидами, как для оценки биологического риска, так и для отбора перспективных агентов для технологии биоремедиации природных объектов.

Цель работы – изучение структуры микробных комплексов подзолистых почв в районе Кильмезского полигона захоронения пестицидов и поиск микроорганизмов-деструкторов органических пестицидов тетраметилтиурамдисульфида (ТМТД) и симазина.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Дать характеристику изменений в структуре микробного комплекса подзолистой почвы в условиях пестицидного загрязнения.

2. Описать адаптивные реакции у доминирующих в комплексе микроорганизмов (на примере *Trichoderma viride*) на присутствие в среде органических пестицидов ТМТД и симазина.

3. Путем селекции в условиях периодического культивирования в присутствии ТМТД и симазина выделить наиболее резистентные штаммы бактерий и микромицетов и провести анализ их свойств.

4. Составить искусственные ассоциации устойчивых к пестицидам изолятов бактерий и микромицетов и определить их эффективность в отношении биодеструкции ТМТД и симазина в условиях лабораторной модели.

Научная новизна работы. На основании морфологических и биохимических признаков (для бактерий) и экологических показателей (для микромицетов) впервые выявлены различия в структуре между комплексами микроорганизмов подзолистых почв из зоны влияния Кильмезкого полигона захоронения пестицидов и фоновой территории.

Установлено, что грибы рода *Trichoderma*, часто встречающиеся в комплексе микромицетов почвы с фоновой территории, переходят в разряд доминантных в комплексе при пестицидном загрязнении.

Выявлена характерная морфобиологическая реакция гриба *T. viride* на возрастание в среде концентрации симазина и ТМТД, заключающаяся в формировании мицелиальных агрегатов различной плотности. С увеличением степени коагрегации мицелия доля неагрегированного мицелия соответственно снижалась, а скорость биодеструкции пестицидов, наоборот, возрастала. Экспериментально показана существенная роль процессов агрегации гиф в увеличении устойчивости микромицета *T. viride* к симазину и ТМТД.

Показано, что эффективность биодеструкции симазина и ТМТД искусственными ассоциациями наиболее резистентных к данным пестицидам

представителей аборигенной почвенной микрофлоры выше при использовании бактериальной ассоциации, чем грибной и смешанной (грибы+бактерии).

Практическая значимость работы. Выявленные перестройки в структуре комплексов почвенных микромицетов и бактерий в зоне влияния объекта учтены при разработке методов биоиндикации почв на загрязнение органическими пестицидами. Полученные результаты вошли в разработанную с участием автора данного исследования областную программу «Комплексный экологический мониторинг окружающей среды в районе Кильмезского полигона захоронения пестицидов в Кировской области» (2008–2010 гг.).

Составлена рабочая коллекция, включающая 17 бактериальных изолятов и 4 изолята микромицетов из загрязненных пестицидами почв, перспективных для разработки технологий биоремедиации почв, загрязненных ТМТД и симазинном.

Штамм гриба *T. viride* S11 рекомендован для использования в целях биотестирования в отношении ТМТД и симазина.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на Всероссийской молодежной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Сыктывкар, 2009; 2010); Междисциплинарном микологическом форуме (Москва, 2009; 2010); Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2009» (Пушино, 2009); V молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2009); Всероссийском симпозиуме с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, 2009); Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития» (Киров, 2009; 2010), областной научно-практической конференции молодежи «Экология родного края: проблемы и пути их решения» (Киров, 2010), 14-й Пушкинской международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2010).

Публикации. Материалы исследований изложены в __ печатных работах, в том числе 4 статьи опубликованы журналах, включенных в перечень ведущих рецензируемых изданий ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 4-х глав экспериментальной части, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на __ страницах машинописного текста, включает __ рисунков и __ таблиц. Библиография насчитывает __ наименований, из них __ отечественных и __ зарубежных работ.

Место проведения работы. Пробоотбор производился совместно с сотрудниками ОГУ «Вятский научно-технический информационный центр мониторинга и природопользования» (ВятНТИЦМП). Пробоподготовка почвенных образцов к анализу проводилась в Лаборатории биомониторинга Института биологии Коми НЦ УрО РАН и ВятГГУ. Микробиологический анализ был выполнен в Лаборатории генетики ГНУ НИИСХ Северо-Востока Россельхозакадемии. Химический анализ проводился в лабораториях химического факультета ВятГГУ и химического факультета ВятГУ, лаборатории токсикологического анализа филиала ФГУ «Россельхозцентр». Автор выражает глубокую благодарность Широких И.Г., Ашихминой Т.Я., Перминовой Э.И., Огородниковой С.Ю., Дабах Е.В., Домниной Е.А., Соколовой Т.А., Сазанову А.В., Хабибуллиной Ф.М. и другим сотрудникам названных учреждений за помощь в выполнении работы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили образцы почв с территорий, расположенных вблизи Кильмезского полигона захоронения пестицидов. В рамках областной программы комплексного экологического мониторинга этого объекта были определены три площадки мониторинга (ПМ), расположенные вниз по склону от объекта на расстоянии 0,7 (ПМ 1); 1,8 (ПМ 2); 2 км (ПМ 3), а также фоновый участок (ПМ Ф), находящийся в 5 км от захоронения (рис. 1).

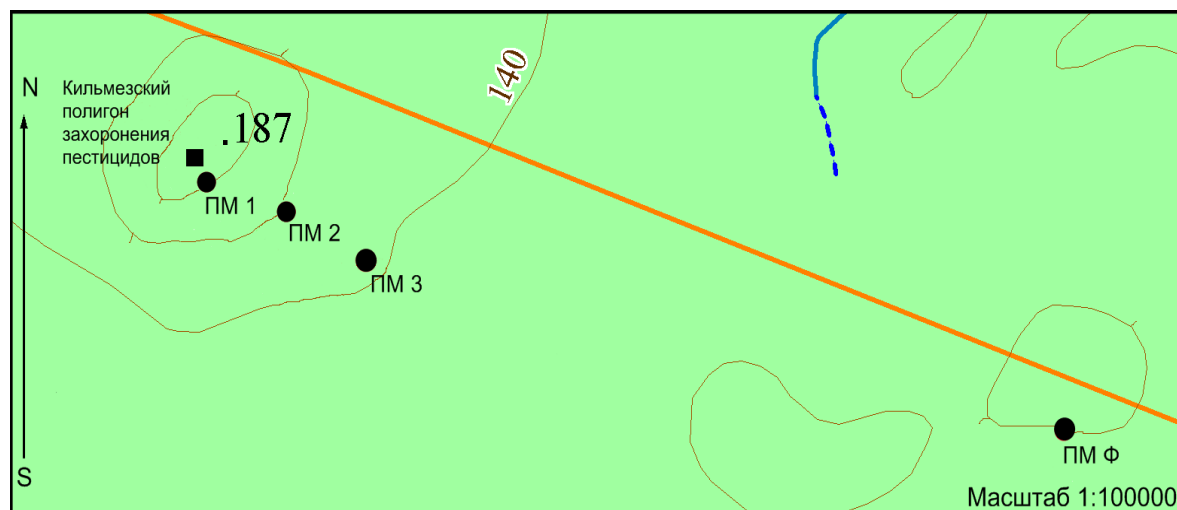


Рис. 1. Схема расположения площадок мониторинга в районе Кильмезского полигона захоронения пестицидов (ПМ 1 – площадка мониторинга № 1; ПМ 2 – площадка мониторинга № 2; ПМ 3 – площадка мониторинга № 3; ПМ Ф – фоновый участок)

Для оценки влияния пестицидов на микробный комплекс почвы сравнивали численность и структуру комплексов бактерий и микромицетов в образцах, отобранных на ПМ 1 и ПМ Ф, характеризующихся сходными по генезису и свойствам почвами: подзолистые супесчаные с маломощной подстилкой (до 3 см), среднекислые (pH_{KCl} 4,5–4,8) с низким содержанием элементов питания. Почва с ПМ 2 была отнесена к дерново-подзолистым легкосуглинистым, с ПМ 3 – к аллювиальным болотным. Их исследование проводили для выявления общих закономерностей изменений в структуре почвенных микробных комплексов под воздействием пестицидов.

Химический анализ на наличие в почве пестицидов проводили методом газовой хроматографии (Цвет-500, ПИД).

Для определения численности и выделения микроорганизмов из почвы использовали методы посева на агаризованные питательные среды RHM (для бактерий) (Belimov, Deitz, 2000) и Чапека (для микромицетов) из разведений почвенных суспензий (Методы почвенной ..., 1991). Структуру комплекса бактерий характеризовали с использованием физиолого-биохимических и морфологических показателей отдельных культур (Нетрусов и др., 2005). Родовую идентификацию проводили согласно определителю бактерий Берджи (1997). Структуру комплекса микромицетов определяли с использованием показателя пространственной частоты встречаемости родов, видовое разнообразие – на основе расчёта индекса Шеннона, для определения степени сходства комплексов микромицетов использовали коэффициент Сьеренсена (Кураков, 2001). Родовую принадлежность микромицетов определяли по морфологическим и культуральным признакам (Литвинов, 1967; Сагтон и др., 2001). Грибы рода *Trichoderma* определяли по ключу Александровой и др. (2006).

Радиальную скорость роста микромицетов определяли на агаризованной среде Чапека (Кожевин, 1989).

Способность штамма гриба *T. viride* S11 к биодеструкции и реакции на присутствие пестицидов в среде выявляли в модельном опыте по методике (Monharram et al., 1994) в нашей модификации. Культивирование гриба осуществляли в жидкой среде Чапека (рН 4,5) с добавлением 0,1; 0,2; 0,4; 1 и 2 мкг/мл симазина и 0,03; 0,06; 0,12; 0,3; 0,6 мкг/мл ТМТД, что соответствует 0,5; 1; 2; 5 и 10 ПДК для симазина и 0,5; 1; 2; 5 и 10 ОДК для ТМТД. В эксперименте использовали стандартные образцы (ГСО) данных пестицидов. Контролем в опыте служил вариант без добавления пестицида. Остаточную концентрацию пестицидов в культуральной жидкости микроорганизмов определяли методом хромато-масс-спектрометрии (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu, Япония). Химический анализ проб культуральной жидкости, микроскопию и определение биомассы микроорганизмов в каждом из вариантов проводили на первые, третьи и седьмые сутки. Концентрацию

свободных аминокислот определяли методом хромато-масс-спектрометрии в пробах культуральной жидкости по методике, изложенной в (Strigácová et al., 2001). Морфобиологическую реакцию гриба *T. viride* S11 на повышение концентрации пестицида в среде оценивали по значению длины неагрегированного мицелия, концентрации и структуре мицелиальных агрегатов (Cox et al., 1998; Maheshwari, 2005). Для характеристики структуры мицелиальных агрегатов рассчитывали коэффициент K_D (%), равный отношению ширины периферического мицелия к диаметру мицелиального агрегата (Paul, Thomas, 1998). Биомассу гриба определяли гравиметрически после высушивания до воздушно-сухого состояния. Повторность опыта пятикратная.

Бактериальные и грибные штаммы, способные к биодеструкции симазина и ТМТД, выделяли методом, изложенным в (Klages, Lingens, 1980) в нашей модификации. Исходным материалом служила смешанная проба из образцов почв, отобранных с ПМ 1 – ПМ 3. Селекцию микроорганизмов проводили при периодическом культивировании в жидкой питательной среде Чапека (рН 7,0) с постоянно возрастающим фактором селекции (ТМТД или симазин) в двух вариантах: в первом пестицид служил в качестве единственного источника углерода, во втором – дополнительно вносили 1% сахарозы. Культивирование проводили в качалочной культуре при температуре 27°C в течение 40 суток. Исходная концентрация ввиду различной токсичности пестицидов составляла для симазина 5,0 мкг/мл, для ТМТД – 0,05 мкг/мл. После каждых пяти суток инкубации культуры пассировали на свежую питательную среду с добавлением соответствующего пестицида в концентрации, превышающей предыдущую в 1,5 раза (до 100 мкг/г для симазина и до 1 мкг/мл для ТМТД). Микробные изоляты из последнего пассажа каждого из вариантов выделяли на среде РНМ (бактерий) и Чапека (микровицеты).

Чувствительность изолятов к повышенным концентрациям ТМТД (0,1 и 0,2 мг/мл) и симазину (10,0 и 20,0 мг/мл) определяли методом дисков (Microbiological application ..., 2001).

В модельном опыте изучали способность бактериальной, грибной и смешанной ассоциаций к биодеструкции ТМТД и симазина. Культивирование микроорганизмов проводили в жидкой среде Чапека (рН 7,0) с использованием в качестве источника углерода ТМТД или симазина в концентрациях 0,2 и 0,4 мг/мл соответственно. Контролем служили аналогичные варианты ассоциаций с добавлением глюкозы в концентрации 2% в качестве единственного источника углерода. Остаточную концентрацию симазина определяли методом хромато-масс-спектрометрии, ТМТД – фотометрически (Sharma et al., 2003) на 3, 7 и 14-е сутки. Биомассу микроорганизмов определяли гравиметрически после высушивания до воздушно-сухого состояния.

Фитотоксичность культуральной жидкости тестировали на проростках ячменя сорта Новичок по методикам, изложенным в ГОСТ 12038-84.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью встроенного статистического пакета Excel (MS Office 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате химического анализа почв, отобранных в пределах ПМ 1 – ПМ 3, было установлено наличие органических пестицидов симазина и ТМТД в концентрациях 0,001–0,002 мкг/г (0,01 ПДК) и 0,02–0,04 мкг/г (0,33–0,66 ОДК), соответственно. В пробах почв с ПМ Ф данные соединения не обнаружены.

Численность и структура комплексов бактерий и микромицетов почв окрестностей Кильмезского полигона захоронения пестицидов

В почвах с ПМ 1 численность бактерий достигала $2,4 \times 10^9$ КОЕ/г, а микромицетов – $1,6 \times 10^5$ КОЕ/г. Для ПМ Ф эти показатели составили соответственно $1,2 \times 10^9$ КОЕ/г и $0,15 \times 10^5$ КОЕ/г, т.е. существенно не отличались. Более значительными были изменения в структуре микробных комплексов.

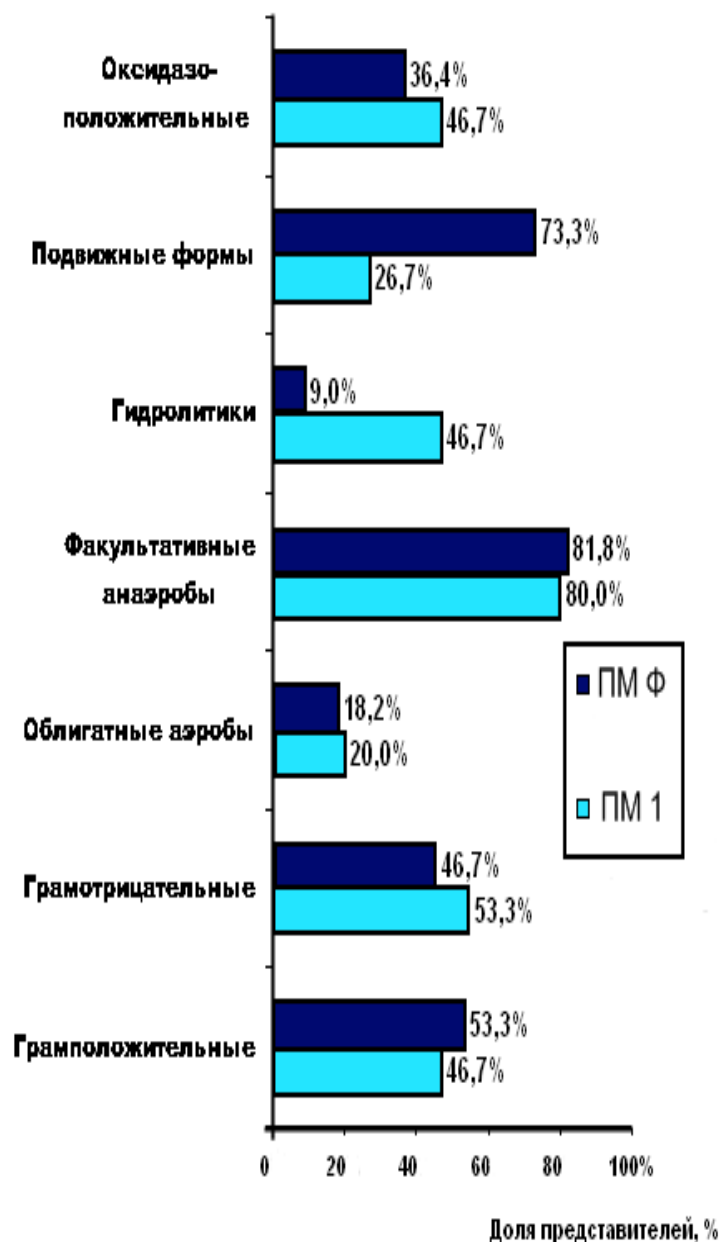


Рис. 2. Сравнительная характеристика комплексов бактерий по морфологическим и биохимическим признакам в подзолистых почвах в зоне влияния объекта (ПМ 1) и фоновой (ПМ Ф)

(рис. 3). Доминировали представители р. *Penicillium*, к числу типичных частых относились рр. *Trichoderma*, *Cladosporium*, типичных редких – *Aspergillus*, *Acremonium*, *Geomyces*, *Humicola*, *Paecilomyces*.

Из образцов подзолистой почвы было изолировано 22 культуры бактерий, относящихся к рр. *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* и др. В структуре комплекса бактерий почв с ПМ 1 по сравнению с ПМ Ф выявлены следующие отличительные особенности:

1) уменьшение в 2,7 раза доли подвижных форм бактерий;

2) увеличение на 10% доли оксидазоположительных изолятов бактерий;

3) увеличение в 5,2 раз количества изолятов бактерий-гидролитиков;

4) тенденция к увеличению доли грамотрицательных бактерий в комплексе (рис. 2).

Комплекс микроскопических грибов в почве с ПМ Ф был представлен видами 11 родов

Род	ПМ Ф	ПМ 1	ПМ 2	ПМ 3
<i>Penicillium</i>			■	■
<i>Trichoderma</i>	■			
<i>Cladosporium</i>	■			
<i>Geomyces</i>	■	■	■	■
<i>Aspergillus</i>	■	■		
<i>Humicola</i>	■			
<i>Paecilomyces</i>	■		■	
<i>Acremonium</i>	■		■	
<i>Phialophora</i>	■	■		
<i>Geothrichum</i>	■			■
<i>Scopulariopsis</i>	■			
<i>Ulocladium</i>		■		

Разряд	Частота встречаемости	Цвет
Доминирующий	≥ 60%	■
Типичный частый	> 30 до ≥ 60%	■
Типичный редкий	≥ 10 до ≥ 30%	■
Случайный	от 0 до > 10%	■
Отсутствие рода		

Рис. 3. Структура комплексов микромицетов в подзолистых, дерново-подзолистой и аллювиальной болотной почвах

К числу отличительных особенностей структуры комплекса микромицетов почвы с ПМ 1 по сравнению с ПМ Ф являлись: 1) сокращение количества родов с 11 до 6; 2) снижение частоты встречаемости представителей рода *Aspergillus*; 3) исчезновение из комплекса типичных представителей родов *Cladosporium*, *Humicola*, *Acremonium* и *Paecilomyces*; 4) появление нового рода *Ulocladium*; 5) переход рода *Trichoderma* из разряда часто встречающихся в разряд доминирующих.

Видовое разнообразие мицелиальных грибов в почве с ПМ Ф (H=5,04) было в 2,3 раза выше, чем в почве с ПМ 1 (H=2,14). Сравнение комплексов микромицетов, выделенных из исследованных почв, с помощью коэффициента

сходства Сьеренсена ($K_s=0,52$) подтверждает существенные перестройки в комплексе микромицетов, что, возможно, обусловлено воздействием пестицидов.

Анализ структуры комплексов микромицетов загрязнённых пестицидами дерново-подзолистой (ПМ 2) и аллювиальной болотной (ПМ 3) почв выявил общие с комплексом подзолистой почвы (ПМ 1) особенности структуры, заключающиеся в узком родовом спектре (5 и 4 рода) и доминирующем положении гриба *Trichoderma viride*.

Таким образом, нами выявлены изменения в структуре микромицетного и бактериального комплексов почв, загрязненных пестицидами, которые можно использовать для биодиагностики в отношении пестицидного загрязнения почвы.

Выявление способности к биодеструкции и реакций штамма *Trichoderma viride* S11 на присутствие пестицидов

Известно, что наличие в среде таких поллютантов, как тяжёлые металлы (Татзетдинова, 2008) и пестициды (Colla et al., 2008) оказывает влияние на морфобиологические и кинетические показатели *Trichoderma viride*. Поэтому представляло интерес изучение реакций природных изолятов данного гриба, выделенного из загрязнённых пестицидами почв, на присутствие в среде ГМТД и симазина.

Значение радиальной скорости роста колоний у изолята *T. viride*, выделенного из почвы с ПМ 1 ($K_r=0,65\pm 0,11$ мм/ч), было в 2,5 раза меньше скорости роста изолята, полученного из почвы с ПМ Ф ($K_r=1,61\pm 0,15$ мм/ч). Максимальное значение данного показателя отмечено для изолята *T. viride* из почвы с ПМ 3 ($K_r=1,90\pm 0,04$ мм/ч). Скорость роста для изолята, выделенного из дерново-подзолистой почвы с ПМ 2, имела промежуточное значение ($K_r=1,50\pm 0,15$ мм/ч), которое существенно не отличалось от фонового. Полученные данные свидетельствуют о кинетической разнокачественности

штаммов этого вида, обусловленной, возможно, воздействием пестицидного загрязнения.

В дальнейшем для постановки модельных экспериментов использовали изолят *T. viride* S11. Наблюдали за изменениями химических показателей культуральной жидкости и биоморфологической структуры *T. viride* S11 при росте в жидкой питательной среде Чапека с добавлением ТМТД и симазина в различных концентрациях.

Выявление способности к биодеструкции ТМТД и симазина у T. viride S11

При культивировании *T. viride* S11 в жидкой питательной среде с добавлением ТМТД и симазина во всех вариантах опыта наблюдалось уменьшение концентрации исследуемых пестицидов в культуральной жидкости (табл.1).

Таблица 1

Степень и скорость биодеструкции симазина и ТМТД в глубинной культуре *T. viride* S11 (на седьмые сутки)

Вариант ПДК	Симазин				ТМТД			
	Исходная концентрация, мкг/мл	Остаточная концентрация, $\times 10^{-3}$ мкг/мл	Степень деструкции, %	Скорость деструкции, $\times 10^{-3}$ мкг/ч	Исходная концентрация, мкг/мл	Остаточная концентрация, $\times 10^{-3}$ мкг/мл	Степень деструкции, %	Скорость деструкции, $\times 10^{-3}$ мкг/ч
0,5	0,1	0	100,0	0,60	0,03	0	100,0	0,09
1	0,2	7,8 \pm 1,3	60,7	0,72	0,06	29,4 \pm 0,4	50,8	0,18
2	0,4	12,0 \pm 1,4	70,0	1,66	0,12	29,5 \pm 0,9	75,4	0,53
5	1,0	17,1 \pm 2,2	82,9	4,94	0,3	20,2 \pm 0,5	93,3	1,67
10	2,0	27,4 \pm 5,2	86,3	10,27	0,6	7,5 \pm 0,4	98,7	3,54

Таким образом, в результате анализа нами было выявлено, что штамм *T. viride* S11 обладает способностью к биодеструкции пестицидов ТМТД (при исходной концентрации 0,6 мкг/мл) на 98,7% и симазина (при 2,0 мкг/мл) на 86,3%. Выявлена линейная зависимость скорости биодеструкции обоих пестицидов от их исходной концентрации (рис. 4).

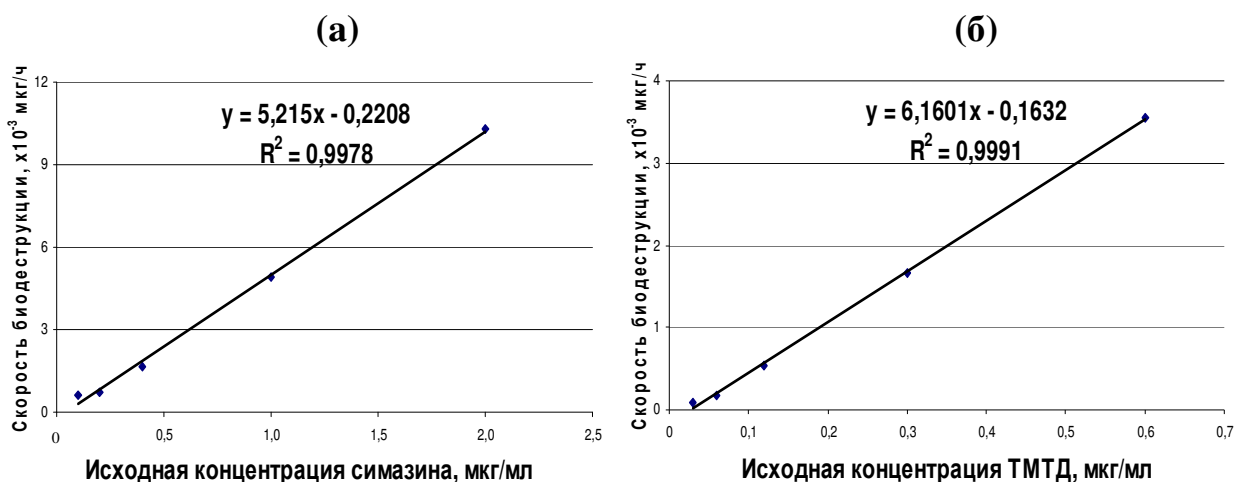


Рис. 4. Изменение скорости биодеструкции в зависимости от начальной концентрации симазина (а) и ТМТД (б)

Выявление адаптивных реакций у T. viride S11 на присутствие в среде ТМТД и симазина

Нами установлено методом хромато-масс-спектрометрии наличие в культуральной жидкости *T. viride* S11 свободных аминокислот при достаточно высоких концентрациях пестицидов (от 2 ПДК и выше), в то время как в контрольном варианте эти соединения не были выявлены. Обнаруженные аминокислоты были идентифицированы как γ -аминобутират и глутамат. Максимальные концентрации этих соединений в вариантах с симaziном были отмечены на первые сутки культивирования ($2,1 \times 10^{-6}$ – $2,7 \times 10^{-6}$ мг/л), а в случае с ТМТД они возрастали (от $0,3 \times 10^{-6}$ до $1,2 \times 10^{-6}$ мг/л) вплоть до окончания периода наблюдения. Поскольку в литературе сообщалось, что экскреция свободных аминокислот в среду повышает устойчивость гриба к пестицидам (Pesticide Biotransformation in ..., 2001; Гончарова и др., 2010), мы можем рассматривать накопление этих соединений в культуральной жидкости как адаптивную реакцию к токсическому действию симазина и ТМТД.

Под влиянием пестицидов наблюдалось на первые и третьи сутки культивирования снижение биомассы гриба по сравнению с контрольным вариантом в 1,5–2 раза. На седьмые сутки значение биомассы в контроле ($4,56 \pm 0,55$ г/л) достоверно не отличалось от каждого из опытных вариантов (3,41–4,45 г/л), что косвенно свидетельствует о преодолении грибом токсического действия пестицидов.

При глубинном культивировании биомасса гриба *T. viride* S11 была представлена следующими структурами: мицелиальные агрегаты (пеллеты), свободный неагрегированный мицелий и споры (рис. 5).

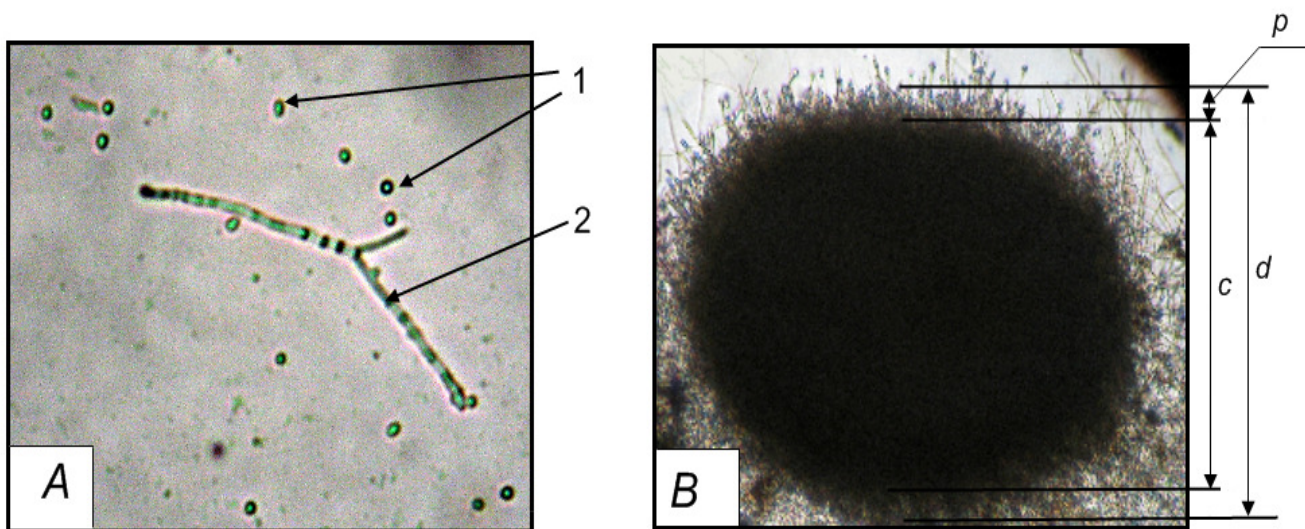


Рис. 5. Морфологические структуры, образуемые *T. viride* S11 при глубинном культивировании в жидкой питательной среде. А: 1 – споры; 2 – свободный мицелий; В: – мицелиальный агрегат (p – периферическая зона; c – центральная зона; d – диаметр мицелиального агрегата)

Характерной морфобиологической реакцией *T. viride* S11 на повышение концентрации пестицидов в среде было увеличение концентрации мицелиальных агрегатов. На третьи сутки культивирования количество данных структур в опытных вариантах превышало контрольное значение в 1,3–3,6 раза в зависимости от исходной концентрации пестицида. На седьмые сутки только в вариантах 5 и 10 ПДК количество мицелиальных агрегатов было в 1,8–2,8 раза, больше чем в контроле (рис. 6).

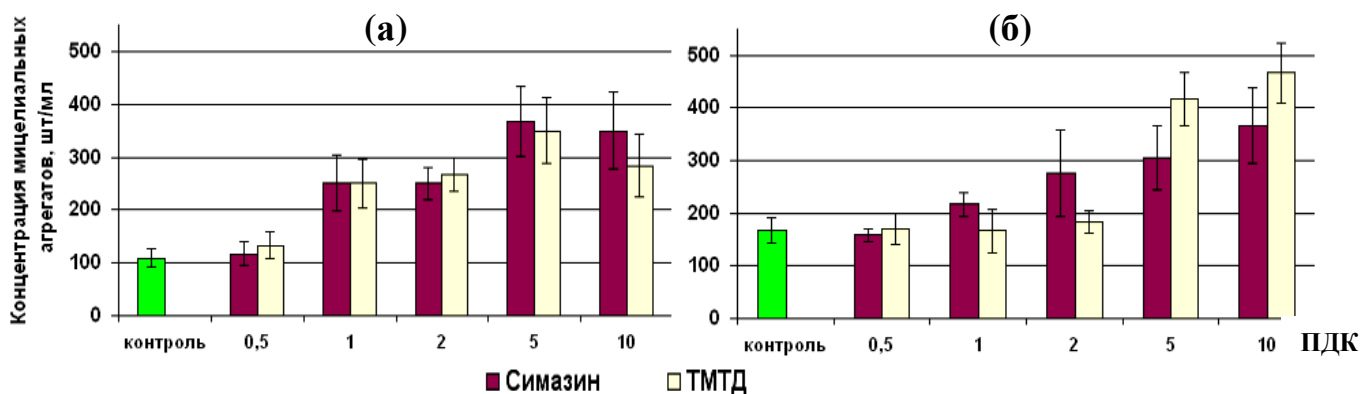


Рис. 6. Концентрация мицелиальных агрегатов по вариантам опыта (а) – 3-и сутки культивирования; (б) – 7-е сутки культивирования

Наряду с увеличением концентрации мицелиальных агрегатов характерной морфобиологической реакцией на пестициды было возрастание плотности этих структур, подтверждаемое результатами измерения величины их отдельных зон с последующим расчетом K_D (данные приведены в диссертации). В частности, на седьмые сутки культивирования значение коэффициента K_D в каждом из опытных вариантов уменьшалось в 2,1–3,5 раза по сравнению с контролем (85,7%) по мере увеличения концентрации пестицида в среде.

Другой реакцией *T. viride* S11 на увеличение концентрации пестицида в среде было изменение длины неагрегированного мицелия. Если в первые сутки культивирования присутствие симазина и ТМТД в среде стимулировало рост мицелия в 1,2–2,6 раза, то при дальнейшем культивировании значение данного показателя в каждом из опытных вариантов уступало контрольному в 1,2–3,5 раза.

Установлено, что *T. viride* S11 проявляет адаптивные реакции на присутствие пестицидов ТМТД и симазина, заключающиеся в выделении в среду свободных аминокислот, в уменьшении длины неагрегированно мицелия, в увеличении концентрации и плотности мицелиальных агрегатов, что свидетельствует о его потенциале для биотестирования в отношении данных пестицидов.

Отбор штаммов микроорганизмов, способных к деградации пестицидов ТМТД и симазина

Отбор микробных штаммов-деструкторов осуществляли в несколько этапов: 1) селекция наиболее устойчивых к действию пестицидов штаммов в периодической культуре 2) анализ их физиологических признаков и свойств, включая выявление антагонизма между изолятами бактерий и микромицетов и 3) определение у них резистентности к повышенным концентрациям ТМТД и симазина.

Селекция микробных штаммов, наиболее устойчивых к действию ТМТД и симазина в периодической культуре

Исходя из литературных данных о роли кометаболитов в выделении микроорганизмов-деструкторов высоко персистентных пестицидов (Myazaki et al.,

1970; Yarden et al., 1985), селекцию штаммов микроорганизмов, устойчивых к действию ТМТД и симазина, проводили в двух вариантах: в первом – в качестве источника углерода служил пестицид, во втором – пестицид и 1% сахара.

Всего было отселектировано 19 штаммов бактерий и 4 штамма микромицетов (табл. 2). Предварительно бактериальные изоляты были отнесены к рр. *Enterobacteria*, *Flavobacterium*, *Rodococcus* и *Pseudomonas*. Большинство из них составили представители рр. *Pseudomonas* (57%) и *Flavobacterium* (26%).

Таблица 2

Результаты селекции штаммов, устойчивых к ТМТД и симазину

Вариант селекции		Бактериальные штаммы		Штаммы микромицетов	
Пестицид	Наличие кометаболита (сахарозы), +/-	Количество по вариантам, шт.	Родовая принадлежность	Количество по вариантам, шт.	Родовая принадлежность
ТМТД	+	3	<i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacteria</i>	2	<i>Mycelia sterilia</i>
	-	3	<i>Pseudomonas</i> , <i>Flavobacterium</i>	0	-
Симазин	+	4	<i>Flavobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacteria</i>	1	<i>Trichoderma</i>
	-	9	<i>Flavobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rodococcus</i>	1	<i>Mycelia sterilia</i>

Качественный и количественный состав бактериальных культур, выделенных с добавлением и без добавления кометаболита (сахарозы), принципиально не отличался. В частности, при сравнении признаков бактериальных штаммов, отселектированных по симазину и симазину+сахарозе, было установлено, что в вариантах с добавлением сахарозы доля гидролитиков составила 60%, а в вариантах без сахарозы – 80%. Также в аналогичных вариантах доли оксидазоположительных штаммов составили 80% и 60%, а облигатных аэробов – 90% и 80% соответственно. Такие же данные

получены в вариантах с ТМТД. Таким образом, селекция штаммов микроорганизмов-деструкторов ТМТД и симазина возможна и без добавления кометаболита.

Среди полученных в результате селекции микромицетов был идентифицирован вид *Trichoderma viride*, а три других штамма представляли собой светлоокрашенные формы стерильного мицелия *Mycelia sterilia*. Анализ результатов измерения радиальной скорости роста колоний (табл. 3) позволил отнести данные грибные изоляты к типу быстрорастущих в соответствии с градациями, использованными в ранее опубликованных работах (Терехова и др., 1998).

Таблица 3

Радиальная скорость роста изолятов микромицетов,
выделенных из различных вариантов опыта

Вариант селекции		Штамм	Скорость роста K_r , мм/ч
Пестицид	Наличие кометаболита (сахарозы), +/-		
ТМТД	+	<i>Mycelia sterilia</i> T11	0,83±0,13
		<i>Mycelia sterilia</i> T12	0,63±0,04
Симазин	+	<i>Trichoderma viride</i> SM1	1,80±0,06
	-	<i>Mycelia sterilia</i> S22	0,74±0,04

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что при длительном культивировании в присутствии органических пестицидов (симазина и ТМТД) преимущество получают быстрорастущие почвенные микромицеты.

Выявление антагонизма между штаммами бактерий и микромицетов

Большинство микроорганизмов в естественных условиях реализует потенциал к биодеструкции в комплексе с другими представителями микробной системы. При этом эффективная трансформация ксенобиотиков возможна лишь при условии отсутствия антагонизма между организмами-

деструкторами (Bandara et al., 2006). Следующим этапом работы явилось выявление возможного антагонизма между бактериальными и грибными изолятами, полученными в результате селекции на устойчивость к изучаемым пестицидам. В модельном опыте было установлено отсутствие антагонизма между отдельными изолятами микромицетов: не наблюдалось явного подавления роста и изменений морфобиологических показателей грибов (плотность, окраска мицелия). В то же время было отмечено, что два бактериальных штамма *Flavobacterium* sp. ВАС5Т2 и *Pseudomonas* sp. ВАС6S1 проявляли антагонизм по отношению ко всем грибным изолятам.

Определение чувствительности изолятов к повышенным концентрациям ТМТД и симазина

Наиболее устойчивые к токсическому действию пестицидов штаммы микроорганизмов, как правило, способны к активной биодеструкции этих ксенобиотиков (Bellinaso et al., 2003; Saikia, Gopal, 2004). Для выявления особо устойчивых штаммов использовали пестициды в концентрациях, превышающих в 100 и 200 раз концентрации, применявшиеся при селекции в последнем пассаже (табл. 4). В результате было определено, что штаммы *Pseudomonas* sp. ВАС8S1, *Pseudomonas* sp. ВАС11S2, *Pseudomonas* sp. ВАС15S2 и *Pseudomonas* sp. ВАС20S2 обладают резистентностью к симазину и ТМТД в концентрациях 20 и 0,2 мг/мл соответственно. В то же время были отмечены случаи ингибирования роста штаммов как пестицидом, по которому не проводилась селекция (симазин – штаммов *Enterobacteria* sp. ВАС1Т1, *Pseudomonas* sp. ВАС2Т1, *Pseudomonas* sp. ВАС3Т1 и ТМТД – *Enterobacteria* sp. ВАС7S1, *Pseudomonas* sp. ВАС13S2, *Flavobacterium* sp. ВАС19S2, *Rodococcus* sp. ВАС16S2), так и высокими концентрациями пестицида у штаммов, селектированных по данному пестициду (ТМТД – в концентрации 0,1 и 0,2 мг/мл – *Pseudomonas* sp. ВАС4Т2 и *Pseudomonas* sp. ВАС3рТ2, соответственно; симазин – в концентрации 10 мг/мл – *Flavobacterium* sp. ВАС14S2, *Flavobacterium* sp. ВАС17S2). Таким образом было определено, что

Чувствительность штаммов бактерий и микромицетов
к различным концентрациям ТМТД и симазина

Вариант селекции		Штамм	Концентрация, мг/мл			
			симазина		ТМТД	
Пестицид	Наличие кометаболита (сахарозы), +/-		10	20	0,1	0,2
Бактерии						
ТМТД	+	<i>Enterobacteria</i> BAC1T1	0	10	0	8
		<i>Pseudomonas</i> BAC2T1	7	-	0	-
		<i>Pseudomonas</i> BAC3T1	7	-	0	-
	-	<i>Pseudomonas</i> BAC3pT2	0	0	0	25
		<i>Pseudomonas</i> BAC4T2	0	-	7	-
Симазин	+	<i>Enterobacteria</i> BAC7S1	8,5	-	7	-
		<i>Flavobacterium</i> BAC8S1	0	0	0	0
		<i>Flavobacterium</i> BAC9S1	0	12	0	12
	-	<i>Pseudomonas</i> BAC11S2	0	0	0	0
		<i>Pseudomonas</i> BAC13S2	0	-	7,5	-
		<i>Flavobacterium</i> BAC14S2	20	-	0	-
		<i>Pseudomonas</i> BAC15S2	0	0	0	0
		<i>Rodococcus</i> BAC16S2	0	0	0	10
		<i>Flavobacterium</i> BAC17S2	20	-	0	-
		<i>Pseudomonas</i> BAC18S2	7,5	-	0	-
<i>Flavobacterium</i> BAC19S2	10	-	10	-		
<i>Pseudomonas</i> BAC20S2	0	0	0	0		
Микромицеты						
ТМТД	+	<i>Mycelia sterilia</i> T11	0	0	0	0
		<i>Mycelia sterilia</i> T12	0	0	10	0
Симазин	-	<i>Trichoderma viride</i> SM1	0	0	0	0
	+	<i>Mycelia sterilia</i> S22	0	0	0	0

Примечание: цифры обозначают радиус (мм) зоны отсутствия роста микроорганизмов вокруг диска с пестицидом; «-» – анализ не проводили

большинство бактериальных изолятов не обладают комплексной резистентностью к ТМТД и к симазину.

В случае грибных изолятов была выявлена чувствительность к ТМТД в концентрации 0,1 мг/мл только у *Mycelia sterilia* T12. Остальные штаммы микромицетов обладали резистентностью к высоким концентрациям данных пестицидов.

Таким образом, четыре штамма представителей рода *Pseudomonas* и штаммы микромицетов *Trichoderma viride* SM1, *Mycelia sterilia* T11 и *Mycelia sterilia* S22 обладают наибольшей резистентностью к ТМТД и симазину, что дает нам основание предполагать у них наличие потенциала к биодеструкции этих пестицидов.

Определение эффективности биодеструкции ТМТД и симазина искусственными ассоциациями микроорганизмов в модельных условиях

Биодеструкция пестицидов ассоциациями микроорганизмов

Из отселектированных и проявивших наибольшую резистентность к ТМТД и симазину штаммов были составлены три вида ассоциаций: бактериальная, грибная, смешанная (бактерии+грибы). Было установлено, что все экспериментальные ассоциации микроорганизмов были в разной степени способны к биодеструкции ТМТД и симазина (табл. 5).

Таблица 5

Динамика биодеструкции симазина и ТМТД ассоциациями микроорганизмов в модельных условиях

Ассоциация	Время культивирования, сут.	Пестицид			
		ТМТД (0,2 мг/мл)		Симазин (0,4 мг/мл)	
		Остаточная концентрация, мг/мл	Степень деструкции, %	Остаточная концентрация, мг/мл	Степень деструкции, %
Бактериальная	3	0,12±0,01	40,9	0	100,0
	7	0,09±0,01	52,2	-	-
	14	0,06±0,01	67,4	-	-
Грибная	3	0,18±0,02	11,6	0,051±0,001	87,0
	7	0,14±0,02	32,2	0	100,0
	14	0,08±0,01	59,3	-	-
Смешанная	3	0,17±0,03	17,7	0,132±0,002	67,5
	7	0,11±0,04	44,2	0	100,0
	14	0,07±0,01	61,2	-	-

Примечание: « - » – анализ не проводили

Продолжительность деструкции симазина и ТМТД исследуемыми микробными ассоциациями заметно различалась. Полная деструкция симазина бактериальной ассоциацией была отмечена уже на третьи сутки, тогда как

грибной и смешанной – на седьмые сутки с начала культивирования. За период наблюдений полной деструкции ТМТД ни в одном из вариантов опыта достигнуть не удалось. На 14-е сутки инкубации наибольшее значение степени биодеструкции было в варианте бактериальной ассоциации (67,2%) по сравнению с грибной (59,3%) и смешанной (61,2%) ассоциациями.

Была отмечена тенденция к увеличению микробной биомассы в ряду ассоциаций: бактериальная < грибная < смешанная (табл. 6). Биомасса бактериальных ассоциаций в опытных вариантах по сравнению с контрольным была меньше в 5–8 раз, а грибной – в 3 раза. В присутствии ТМТД смешанная ассоциация уступала контролю по биомассе в 3 раза, а в варианте с симазинном – значения достоверно не отличались. Эти данные свидетельствуют о замедлении процессов деления и развития клеток организмов-деструкторов под воздействием пестицидов.

Таблица 6

Биомасса (г/л) ассоциаций микроорганизмов в вариантах опыта

Ассоциация	Вариант опыта		
	Контроль	ТМТД	Симазин
Бактериальная	0,40±0,08	0,05±0,01	0,08±0,01
Грибная	3,6±0,4	1,2±0,2	1,2±0,1
Смешанная	4,6±0,8	1,4±0,2	4,2±0,4

Фитотоксичность исходных растворов пестицидов и культуральной жидкости микробных ассоциаций

Промежуточные продукты микробной деградации пестицидов могут оказаться более токсичными, чем исходные соединения (Попов и др., 2003). Поэтому важным показателем оценки перспективности штаммов для биоремедиации является отсутствие фитотоксичности (Молекулярные основы..., 2005).

В модельном опыте изучено влияние культуральной жидкости вариантов опыта и растворов пестицидов в исходных концентрациях на проростки ячменя. Оценивали всхожесть, показатели линейного роста и накопление биомассы

растений (табл. 7). Из исследуемых пестицидов наибольшее влияние на всхожесть семян оказывал симазин, снижая ее в 2,6 раза по сравнению с контролем. В меньшей степени снижалась всхожесть ячменя под влиянием ТМТД (на 13%). Культуральная жидкость микробных ассоциаций, культивируемых как в присутствии пестицидов, так и без них, также ингибировала всхожесть семян. Всхожесть снижалась в ряду: бактериальная > смешанная > грибная ассоциации. Линейные показатели проростков в вариантах с растворами пестицидов и культуральной жидкостью либо имели тенденцию к уменьшению значения, либо достоверно не отличались от контроля. Биомасса проростков в опытных вариантах достоверно не отличалась от биомассы контрольных растений.

Таблица 7

Влияние культуральной жидкости ассоциаций и растворов пестицидов на всхожесть, линейные показатели и накопление биомассы проростками ячменя

Вариант	Всхожесть, %	Длина, см		Биомасса, г
		побег	корень	
Контроль (дистиллированная вода)	94	7,2±1,0	6,7±1,0	0,21±0,24
Растворы пестицидов				
Раствор ТМТД (0,2 мг/мл)	81	8,0±1,3	4,1±0,7	0,23±0,03
Раствор симазина (0,4 мг/мл)	36	8,2±1,1	3,9±0,7	0,2±0,01
Культуральная жидкость контрольных вариантов ассоциаций				
Бактериальная	76	7,4 ±1,3	3,7±0,7	0,19±0,03
Грибная	9	5,1±0,6	2,4±0,4	0,13±0,01
Смешанная	28	7,9±1,4	3,6±0,5	0,19±0,03
Культуральная жидкость вариантов ассоциаций с ТМТД				
Бактериальная	77	8,0±1,4	5,3±1,0	0,2±0,03
Грибная	18	7,0±1,3	4,4±0,7	0,2±0,01
Смешанная	31	4,4±0,8	4,0±0,7	0,26±0,01
Культуральная жидкость вариантов ассоциаций с симазинном				
Бактериальная	76	8,5±1,6	4,6±0,9	0,21±0,03
Грибная	5	7,3±0,1	4,2±0,8	0,18±0,03
Смешанная	61	7,4±1,4	8,0±1,5	0,24±0,02

Наименьшим фитотоксическим действием в результате определения морфометрических показателей проростков характеризовалась бактериальная ассоциация, наиболее эффективно осуществлявшая биодеструкцию ТМТД и симазина среди всех испытанных ассоциаций. Таким образом, бактериальная

ассоциация наиболее перспективна в целях ремедиации почв, загрязненных пестицидами ТМТД и симазинном, по сравнению со смешанной и грибной ассоциациями.

ВЫВОДЫ

1. Впервые установлено, что структура комплекса микромицетов подзолистой почвы при пестицидном загрязнении имеет специфические черты, отличающие ее от комплекса микромицетов аналогичной почвы фоновой территории:

- расширение спектра доминантов за счет представителей рода *Trichoderma*,
- снижение родового и видового разнообразия,
- исчезновение представителей типичных частых и типичных редких в фоновой почве родов: *Cladosporium*, *Humicola*, *Paecilomyces*, *Acremonium*.

В структуре бактериального комплекса загрязненной пестицидами подзолистой почвы выявлено снижение в 2,7 раза доли подвижных форм и увеличение в 5,2 раз доли гидролитиков по сравнению с комплексом фоновой почвы. Это позволяет использовать комплексы микромицетов и бактерий в целях биоиндикации загрязненных пестицидами почв и разработки способов их ремедиации.

2. Составлена рабочая коллекция, включающая 17 изолятов бактерий и 4 изолята микромицетов, полученных путем селекции в периодической культуре с постоянно возрастающими концентрациями ТМТД и симазина. Наиболее устойчивыми к действию симазина и ТМТД среди бактерий были представители рода *Pseudomonas* sp., а среди микромицетов – штаммы *T. viride* и *Mycelia sterilia*.

3. В модельных опытах показана биоморфологическая и кинетическая разнокачественность грибов *T. viride*, выделенных из фоновой и загрязненной пестицидами подзолистой почвы, заключающаяся в вегетативной несовместимости штаммов при их попарном сращивании, более поздних сроках

начала спороношения и существенно меньшей радиальной скорости роста изолятов из загрязненной почвы.

4. Установлено, что к числу адаптивных реакций *T. viride* на присутствие в среде ТМТД (0,03–0,6 мкг/мл) и симазина (0,1–2,0 мкг/мл) относятся: уменьшение в 1,2–3,5 раза по сравнению с контролем длины неагрегированного мицелия, увеличение в 1,3–3,6 раза концентрации и в 2,1–3,5 раза плотности мицелиальных агрегатов. В культуральной жидкости *T. viride* в присутствии ТМТД (0,12–0,6 мкг/мл) и симазина (0,4–2,0 мкг/мл) выявлено наличие свободных аминокислот глутамата и γ -аминобутирата.

5. У природного изолята *T. viride* S11 при глубинном культивировании выявлена способность к биодеструкции симазина и ТМТД. Скорость биодеструкции линейно зависела от исходной концентрации того и другого пестицида. Степень деструкции на седьмые сутки культивирования микромицета в средах, содержащих пестицид в концентрациях равных 10 ПДК (ОДК), составила для симазина 86%, для ТМТД – 98% от исходного содержания.

6. Сравнительная оценка степени биодеструкции пестицидов искусственно составленными ассоциациями устойчивых к ним микроорганизмов показала, что бактериальная ассоциация штаммов *Pseudomonas* sp. ВАС8S1, *Pseudomonas* sp. ВАС11S2, *Pseudomonas* sp. ВАС15S2 и *Pseudomonas* sp. ВАС20S2 более эффективно осуществляла биодеструкцию ТМТД (67% на 14-е сутки культивирования) и симазина (100% на 3-и сутки) в сравнении с грибной и смешанной ассоциациями. Кроме того, при биотестировании бактериальная ассоциация характеризовалась меньшим по сравнению с грибной и смешанной ассоциациями фитотоксическим действием.

ПУБЛИКАЦИИ

1. Колупаев А.В., Ашихмина Т.Я., Широких И.Г. Реакция почвенных микромицетов на пестицидное загрязнение // Иммунология, аллергология, инфектология. 2009. № 2. С. 50–51.

2. **Колупаев А.В.**, Широких А.А., Широких И.Г. Реакция гриба *Trichoderma viride* на пестицидное загрязнение // Иммунология, аллергология, инфектология. 2010. № 1. С. 64.

3. **Колупаев А.В.**, Широких А.А., Широких И.Г. Биодegradация симазина и ТМТД микробными ассоциациями в лабораторных условиях // Иммунология, аллергология, инфектология. 2010. № 1. С. 64–65.

4. Ашихмина Т.Я., **Колупаев А.В.**, Широких А.А. Биотрансформация пестицидов в наземных экосистемах (обзор) // Теоретическая и прикладная экология. 2010. № 2. С. 4–12.

5. Широких А.А., **Колупаев А.В.** Грибы в биомониторинге наземных экосистем // Теоретическая и прикладная экология. 2009. № 3. С. 4–14.

6. **Колупаев А.В.**, Широких А.А., Широких И.Г. Трансформация пестицидов почвенной микрофлорой // Актуальные аспекты современной микробиологии: V молодежная школа-конференция с международным участием. Институт им. С.Н. Виноградского РАН – М.: МАКС Пресс, 2009. С. 112–114.

7. **Колупаев А.В.**, Широких А.А., Широких И.Г. Изучение бактериального комплекса почв, загрязненного пестицидами // Инновационные методы и подходы в изучении естественной и антропогенной динамики: Материалы всероссийской научной школы для молодежи (в 3 частях). Часть 3 (Киров, 30 ноября – 5 декабря 2009 г.). Киров: ООО «Лобань», 2010. С. 60–61.

8. **Колупаев А.В.**, Широких А.А., Широких И.Г. Характеристика комплекса микромицетов почв, загрязненных пестицидами // Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов: Всероссийский симпозиум с международным участием, Москва, МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 24–27 декабря 2009 г.: Материалы. М.: МАКС Пресс, 2009. С. 86.

9. **Колупаев А.В.**, Широких А.А. Влияние симазина на биоморфологическую структуру гриба *Trichoderma viride* в условиях лабораторной модели // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 14-я Пущинская международная школа-конференция молодых ученых. Пущино, 19–23 апреля. Сборник тезисов. 2010. С. 234.

Подписано в печать 13.09.2010 г.
Формат 60×84 ¹/₁₆.
Бумага офсетная.
Усл. печ. л. 1,7.
Тираж 100 экз.
Заказ № 1464.

Издательство Вятского государственного гуманитарного университета,
610002, г. Киров, ул. Красноармейская, 26

Издательский центр Вятского государственного гуманитарного университета,
610002, г. Киров, ул. Ленина, 111, т. (8332) 673-674