

Е.В. Пименова

Пермская государственная сельскохозяйственная академия

Г.А. Козлова, М.В. Буркова

Пермский национальный исследовательский
политехнический университет

ОЦЕНКА МИКРОБНОЙ ДЕТОКСИКАЦИИ ГЕРБИЦИДА ТОРНАДО НА ОСНОВЕ ГЛИФОСАТА МЕТОДОМ ФИТОТЕСТИРОВАНИЯ

Исследована способность ряда штаммов бактерий к биодеструкции препарата торнадо – гербицида на основе глифосата, проведена оценка детоксикации среды в ходе роста микроорганизмов методом фитотестирования.

Одним из важных элементов интенсивных технологий, без которых невозможно получение высоких и стабильных урожаев практически ни одной сельскохозяйственной культуры, являются пестициды [1].

Препараты на основе глифосата (N-фосфонометилглицин) более 30 лет применяются как высокоэффективные малотоксичные гербициды общеистребительного действия. Однако в последние годы применение глифосата вызывает обоснованную тревогу у экологов, что обусловлено противоречивостью данных о влиянии данного соединения на все компоненты, а также об его устойчивости в почве.

Глифосат является активным компонентом различных препаративных форм, таких как раундап, торнадо, глиалка, глипер, глисол, глитан, глифопин, глифоген, глицел, граунд, мамба, нитосорг, свип, утал, форсат, фосулен, цидокор, ураган форте и др., выпускаемых многими отечественными и зарубежными фирмами-производителями. Кроме так называемого «активного» или действующего вещества (д.в.), каждая препаративная форма пестицида содержит так называемые инертные ингредиенты, которые нужны для облегчения использования продукта и увеличения его эффективности. Так, раунадап, кроме основного действующего вещества – глифосата, содержит десять инертных компо-

нентов. Независимые исследования, проведенные в ряде европейских стран, Японии и США, показали, что из-за «инертных» компонентов формула раундапа более токсична, чем сам глифосат [2].

В связи с этим возникает все более острая необходимость учета негативных экологических последствий антропогенной пестицидной нагрузки на биосферу [3]. При этом определение остаточных количеств действующих веществ и их метаболитов, а также инертных компонентов химическими и физико-химическими методами очень сложно и связано с использованием дорогостоящей аппаратуры.

В последние годы для оценки интегральной токсичности различных объектов окружающей среды используется более доступный, простой и быстрый метод – биотестирование. Так, для оценки токсичности почвы, загрязненной глифосатом, после проведения ее биоремедиации, были использованы такие показатели, как фитотоксичность в отношении овса, токсичность по отношению к дафниям, дегидрогеназная активность [4].

Цель данной работы – исследование биодеструкции гербицида торнадо на основе глифосата путем оценки изменения токсичности среды в ходе роста микроорганизмов методом фитотестирования в лабораторных условиях.

Материалы и методы исследования. Объектом исследований служили 5 изолятов бактерий, ранее выделенных из почвы поля Пермской ГСХА, подвергавшейся воздействию пестицидов, и сохранивших способность к росту на среде с гербицидом после продолжительного хранения под слоем вазелинового масла.

Культуры выращивали на ацетатно-минеральной среде в колбах объемом 250 мл на качалке при 30 °С и 140 об/мин на синтетической минеральной среде следующего состава, г/л: NH_4NO_3 – 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,2; Na_2CO_3 – 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,01 г. К 100 мл основной среды стерильно добавляли 5 мл буферного раствора, г/л: KH_2PO_4 – 2; Na_2HPO_4 – 3; и 0,1 мл раствора микроэлементов по Пфенингу [5]. Источник углерода – коммерческий препарат торнадо с содержанием глифосата 360 мг/мл – вносили в концентрациях, указанных ниже, в отсутствие и в присутствии дополнительного субстрата – ацетата натрия.

Интенсивность роста определялась по величине оптической плотности исследуемого раствора на КФК-2 ($\lambda = 670$ нм, толщина слоя 5 мм, раствор сравнения – ацетатно-минеральная среда без добавления гербицида).

В качестве фитотест-объекта для оценки интегральной токсичности среды и процесса деградации пестицида использовали редис сорта Красный с белым кончиком. Семена редиса – перспективный биотест, удовле-

творяющий основным требованиям к биотестам – сильная энергия прорастания семян и высокая чувствительность к токсическим веществам.

Интегральную токсичность среды, загрязненной глифосатом, до и после культивирования штамма бактерий, оценивали по изменению всхожести семян редиса на третьи сутки и средней длине корней проростков [6].

Отбирались семена, близкие по величине и цвету. Отобранные семена раскладывались в стерильные чашки Петри с кружками фильтровальной бумаги или соприкасающимися ватными дисками, в которые вносили по 10 мл анализируемой пробы (чашки Петри стерилизовались в сушильном шкафу при температуре +120 °С в течение 2 ч). В каждую чашку помещались 50 семян тремя пропорциями по 10 семян, которые равномерно распределялись по поверхности чашки. Контролем служили семена, замоченные в том же объеме стерильной водопроводной воды или питательной среды без источника углерода. Эксперименты проводились при комнатной температуре.

Повторность опытов 4-кратная. Результаты обрабатывались с помощью программы Excel, рассчитывалась наименьшая существенная разница при уровне вероятности 0,95 ($НСР_{05}$) по методике Доспехова [7].

Результаты и их обсуждение. Первоначально была определена токсичность растворов гербицида с концентрацией от 1 до 100 мг/л на минеральной основе в присутствии ацетата натрия (табл. 1, рисунок).

Данные по определению фитотоксичности препарата в интервале концентраций от 1 до 100 мг/л по д.в. свидетельствуют о том, что самая малая концентрация гербицида (1 мг/л) на всхожесть семян практически не влияет, но значительно снижает длину корней проростков редиса. Концентрации, начиная с 10 мг/л, оказывают сильное математически доказанное ингибирующее действие и влияют как на прорастание семян, так и на длину корней проростков редиса, что подтверждает гербицидные свойства глифосата, т.е. его токсичность в отношении растений.

Таблица 1

Зависимость всхожести семян и длины корней редиса
от концентрации глифосата

Концентрация гербицида, мг/л	Всхожесть, %	Длина корней, см
1	96,3±2,7	1,15±0,18
10	79,5±6,2	0,73±0,07
50	17,5±4,7	0,43±0,07
100	9,0±3,0	0,3±0,18
Контроль	96,5±2,70	1,93±0,22
$НСР_{05}$	5,70	0,18



а

б

Рис. Всхожесть семян:

а – без гербицида; *б* – концентрация гербицида 100 мг/л

После проведения скрининга штаммов микроорганизмов, выделенных ранее с территории, обработанной пестицидами, был выбран наиболее активный штамм-деструктор глифосатсодержащих пестицидов – МЗ (при концентрации торнадо в среде 50 мг/л по д.в., удельная скорость роста 0,139 г/л·ч), с которым проводились дальнейшие исследования. В результате оценки влияния различных доз гербицида (10, 50 и 90 мг/л) на динамику роста культуры МЗ на среде с ацетатом обнаружено, что величина удельной скорости роста микроорганизмов существенно уменьшается и через трое суток составляет, соответственно, 84, 65 и 54 % по отношению к контролю (среда без гербицида).

Определение деструкционной способности штамма МЗ через сутки и трое суток роста на среде с торнадо (50 мг/л по д.в.) без дополнительного источника углерода показало значительное снижение фитотоксичности культуральной жидкости. Уже через сутки роста микроорганизмов всхожесть семян редиса в культуральной жидкости увеличилась с 17,5 до 75,5 %, а длина корней проростков с 0,43 до 0,88 см, а через трое суток наблюдалось практически полное отсутствие токсичности среды: всхожесть увеличилась до 95,5 %, а длина корней проростков до 1,58 см (табл. 2).

Таким образом, биотест выявил, что даже малые концентрации торнадо оказывают отрицательное влияние на длину корней проростков редиса по отношению к контролю, что является показателем токсичности при применении химических средств защиты растений. Штамм бактерий, использованный в работе, в процессе своего роста способен снизить фитотоксичность среды.

Изменение токсичности среды в процессе роста культуры МЗ

Время культивирования	Среда с пестицидом (без ацетата)		Среда с пестицидом (с ацетатом)	
	всхожесть, %	длина корней, см	всхожесть, %	длина корней, см
1 сут	75,5±2,65	0,88±0,13	22±3,92	0,4±0,11
3 сут	95,5±2,65	1,58±0,13	35±3,58	0,6±0,16
Контроль	96,2±1,75	1,82±0,28	96,5±2,70	1,93±0,22

Следует также отметить, что при выращивании на ацетатно-минеральной среде с внесением гербицида в той же концентрации снижение токсичности по сравнению со средой без ацетата происходит намного медленнее, что может объясняться тем, что изначально микроорганизмы используют ацетат в качестве источника углерода и энергии и только затем глифосат.

Список литературы

1. Круглов Ю.В. Микрофлора почвы и пестициды. – М.: Агропромиздат, 1991. – 128 с.
2. Микробные биотехнологии ремедиации почв, загрязненных фосфорорганическими пестицидами // Коммерческая биотехнология: интернет-журнал. – URL: <http://www.cbio.ru/modules/news/print.php?storyid=3381>.
3. Лозановская И.Н., Орлов Д.С., Садовникова Л.К. Экология и охрана биосферы при химическом загрязнении. – М.: Высшая школа, 1998. – 287 с.
4. Ермакова И.Т., Шушкова Т.В., Леонтьевский А.А. Микробная деструкция органофосфатов почвенными бактериями // Микробиология. – 2008. – Т. 77, № 5. – С. 689–695.
5. Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. – М.: Наука, 1989. – 228 с.
6. Определение суммарной токсичности почвы, корневой системы и конечной продукции при применении химических средств защиты растений: методика и результаты / В.Г. Минеев, Е.Х. Ремпе, Л.П. Воронина, Л.В. Коваленко // Вестн. сельскохоз. науки. – 1991. – № 6. – С. 63–71.
7. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта: (С основами статистической обработки результатов исследований). – М.: Колос, 1979. – 416 с.

Получено 2.06.2011