
БІОРИЗНОМАНІТТЯ ТА БІОБЕЗПЕКА ЕКОСИСТЕМ

УДК 631.95:632.95.022:632.95.027+631.4+631.468

БИОСЕНСОРНЫЕ СВОЙСТВА ПОЧВЕННОЙ МИКРОБИОТЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПЕСТИЦИДОВ

И.С. Бровко, Я.В. Чабанюк, С.В. Мазур, В.У. Ящук

Институт агроэкологии і природокористування НААН

Висвітлено перспективи застосування тест-смужок для оцінки токсичності пестицидів різних класів щодо ґрунтового мікробіоценозу, які активно використовуються в агротехнічній практиці на території України. Досліджено добір оптимальних культур-біосенсорів для оцінювання токсичної дії пестицидів із застосуванням тест-смужок. Обґрунтовано, що чутливість досліджуваних мікроорганізмів до певних пестицидів є різною, оскільки кожна тест-культура по-різному реагує на їх застосування.

Ключові слова: пестициди, біотестування, мікробіота, біосенсор, тест-культура, *Azotobacter*.

Накапливаясь в почве, пестициды способны влиять на развитие полезной микробиоты и патогенных микроорганизмов, ингибируя или стимулируя их рост, также их действие может распространяться на развитие болезней, рост, споруляцию, прорастание спор, выживание и конкурентно-сапрофитную активность почвенных микромицетов [1–3].

Большинство работ, посвященных изучению влияния пестицидов на почвенную микробиоту, построено на проведении полевых опытов, однако влажность почвы, значение ее рН, содержание тяжелых металлов и ряд других факторов, могут существенно изменять состав и численность микроорганизмов [4–7]. Поэтому для оценки действия данных веществ необходимо проводить лабораторные тесты, которые обеспечат стандартные контролируемые условия для всех образцов, а единственной переменной величиной будет непосредственно класс исследуемого пестицида.

Для определения чувствительности бактерий к действию конкретного пестицида используют диско-диффузионный метод,

который имеет ряд недостатков, особенно в отношении сложности учета и интерпретации результатов [8].

Альтернативой общепринятому методу определения токсичности пестицидов нами предложено экспресс-метод с использованием тест-полосок, изготовленных на основе инертных материалов с нанесением градиента концентраций пестицида, которые способны отображать наименьшие изменения чувствительности культуры. Преимущество такого теста заключается в его простоте, скорости подготовки и постановке.

Целью нашего исследования был подбор оптимальных культур биосенсоров для оценки токсичного воздействия пестицидов с применением тест-полосок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Оценку токсичности пестицидов проводили в лабораторных условиях с применением тест-полосок, на поверхность которых нанесен градиент концентраций пестицидов, в следующих вариантах: вода (контроль), минимальная рекомендованная рабочая доза (РРД), средняя РРД, макси-

мальная РРД, доза, увеличенная в 2, 4, 10 раз относительно максимально рекомендованной. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) определялась по месту пересечения зоны задержки роста (ЗЗР) культуры с зоной полоски определенной концентрации. Обработку результатов проводили с помощью микробиологического анализатора BIOMIC V3 (Giles Scientific Inc., США). Для посева исследуемых микроорганизмов готовили гомогенные суспензии плотностью $1-2 \cdot 10^8$ клеток/мл, используя только чистые культуры. В качестве биосенсоров использовали микроорганизмы следующих родов: *Azotobacter* (*A. chroococcum*), *Rhizobium* (*R. leguminosarum*), *Bradyrhizobium* (*B. japonicum*), *Pseudomonas* (*P. fluorescens*), *Azospirillum* (*A. lipoferum*), *Bacillus* (*B. subtilis*), *Paenibacillus* (*P. polymyxa*) коллекции Института агроэкологии и природопользования НААН. Культивирование микроорганизмов проводили по общепринятым методикам, учет реакции осуществляли через 24, 48 и 72 часа (с целью исключения ошибочной интерпретации, ввиду возможного временного бактериостатического эффекта препарата).

Для оценки были выбраны пестициды, относящиеся к разным классам токсичности по отношению к почвенному микробиоценозу и активно использующиеся в агротехнической практике Украины, рабочие растворы готовили согласно инструкций фирм производителей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование гербицидов Пульсар и Захист не производили бактериостатический эффект ни на одну из тест-культур биосенсоров. Препарат Примэкстра Голд на какое-то время ингибировал рост микроорганизмов *R. leguminosarum* и *B. subtilis*, уменьшение ЗЗР последних имело место на третьи сутки, а использование гербицида Ураган Форте отразилось в виде бактериостатического эффекта на культуре *B. subtilis*. Использование фунгицида Фоликур привело к возобновлению роста микроорганизмов *A. chroococcum* и *B. subtilis* на третьи сутки проведения опыта. Наи-

более выраженным бактериостатическим действием характеризовался препарат Фастак, который на некоторое время ингибировал рост трех культур — *R. leguminosarum*, *P. fluorescens* и *A. lipoferum*.

Для исключения пролонгированного бактериостатического эффекта все варианты, в которых имело место возобновление роста на третьи сутки, инкубировали еще на протяжении 24 часов, однако площадь ЗЗР ни в одном варианте не изменилась.

Результаты проведенного анализа указывают на то, что касательно скорости реакции, оптимальной культурой-биосенсором является *P. polymyxa*, при использовании которой учет можно проводить уже через сутки, поскольку к этому времени формируется четкая ЗЗР (рисунок).

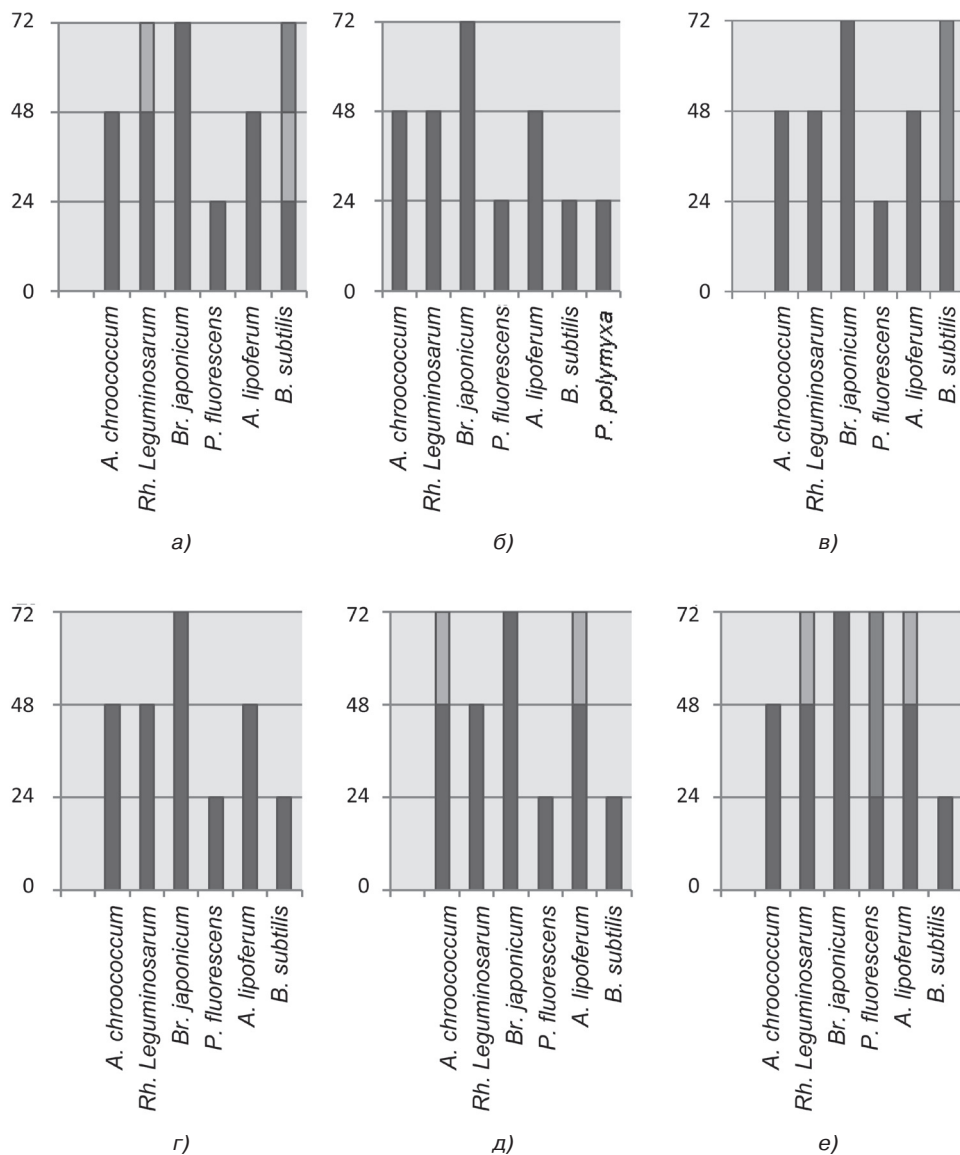
По тем же соображениям среди других тест-культур нужно выделить *P. fluorescens*, в случае с которой для всех исследуемых пестицидов, за исключением инсектицида Фастак, регистрацию реакции можно проводить в то же время.

Значительную скорость роста при бактериостатическом воздействии препарата показала культура-биосенсор *A. chroococcum*, четкая ЗЗР формировалась на вторые сутки и лишь под действием препарата Фоликур изменялась со временем.

Микроорганизмы *R. leguminosarum* и *A. lipoferum* по скорости роста не уступали *A. chroococcum*, однако время для отдельных исследуемых препаратов необходимо было увеличивать до 72 час. Следует отметить, что при одинаковой чувствительности разных микроорганизмов к одному и тому же пестициду показатель скорости формирования стойкой ЗЗР может служить поводом для выбора других бактерий в качестве биосенсоров.

Нестабильный рост показывали микроорганизмы *B. subtilis*, а необходимость увеличения срока инкубации до 72 час снижал их ценность как тест-культур.

Установлено, что при воздействии гербицида Примэкстра Голд все микроорганизмы, кроме *B. japonicum*, реагировали формированием ЗЗР, чувствительными оказались микроорганизмы рода *Azotobac-*



Скорость формирования стойкой ЗЗР с учетом бактериостатического влияния препарата: а) Примекстра Голд, б) Пульсар, в) Ураган Форте, г) Захист, д) Фоликур, е) Фастак (часов)

ter, где ингибирующее действие препарата имело место даже в рабочей концентрации, а также бактерии *A. lipoferum* та *P. polyмуха*.

Рост микроорганизмов *P. fluorescens* и *B. subtilis* прекращался в варианте с кон-

центрацией гербицида, увеличенной в 4 раза по сравнению с рекомендованной максимальной дозой. Значительную стойкость проявили бактерии *R. leguminosarum*, рост которых ингибировался лишь с применением 10-тикратной дозы.

К действующему веществу препарата Пульсар наибольшую чувствительность проявляли *P. polymyxa*, МИК для них служила двойная доза пестицида. Одинаковые значения чувствительности показывали культуры *A. chroococcum* и *A. lipoferum*, которые приостанавливались в росте при использовании четырехкратной максимальной концентрации препарата.

Малочувствительными к действию гербицида оказались микроорганизмы *P. fluorescens* и *B. subtilis*, рост которых прекращался при действии максимальной 10-кратной концентрации препарата. Два вида (*R. leguminosarum*, *B. japonicum*) не проявили реакции на действие гербицида. Для каждого из микроорганизмов рабочая концентрация препарата Пульсар не являлась токсичной.

Наименьшее отрицательное действие на микроорганизмы оказывал препарат Ураган Форте.

Лишь одна тест-культура (*P. fluorescens*) положительно откликнулась на его присутствие в среде с 10-кратной максимальной концентрацией, однако и тогда диаметр ЗЗР был незначительным.

Анализ реакции тест-культур на действие фунгицида Захист показал, что данный препарат характеризуется значительной антимикробной активностью, даже в разведениях, рекомендованных для рабочего раствора. Сверхчувствительность к данному препарату показали *B. japonicum*, *B. subtilis* и *P. polymyxa*, рост которых прекращался даже в вариантах с применением минимальных концентраций. Четко выраженное ингибирующее действие пестицида имело место также и в случае с бактериями *R. leguminosarum*, *A. chroococcum*, для которых МИК составляла средняя рабочая доза препарата.

Малочувствительными оказались *B. subtilis*, ЗЗР которых сформировалась лишь в случае с наибольшей концентрацией фунгицида. Не среагировала на препарат культура-биосенсор *A. lipoferum*.

Чувствительными сенсорами при действии препарата Фастак являются *A. chroococcum*, *R. leguminosarum* и *P. polymyxa*,

МИК которых отвечала двойной дозе препарата, а самыми стойкими в этом случае оказались микроорганизмы *B. subtilis* и *A. lipoferum* — ингибирование их роста имело место лишь при действии наибольшей концентрации этого инсектицида. Препарат Примэкстра Голд даже в рабочих дозах проявлял токсическое действие на *A. chroococcum*, а фунгицид Захист, применяемый в концентрациях, соответствующих рекомендованным дозам, тормозил рост всех микроорганизмов. Наименьшую чувствительность в качестве тест-культуры продемонстрировал к препарату Ураган Форте лишь один биосенсор (*P. fluorescens*) формированием ЗЗР.

Анализ чувствительности некоторых микроорганизмов к определенным пестицидам показал, что каждая тест-культура реагирует на них по-разному (таблица).

Самыми чувствительными сенсорами можно назвать *A. chroococcum* и *P. polymyxa*, рост которых прекращался даже при незначительном превышении рекомендованной дозы. Исключением был гербицид Ураган Форте, который по шкале токсичности относится к группе условно токсичных, возможно, пестициды этой категории требуют индивидуального подбора, так как лишь некоторые типы микроорганизмов реагируют на его умеренные концентрации.

Ценным свойством этих микроорганизмов как сенсоров является отсутствие взаимосвязи между степенью чувствительности и типом препарата. Все типы пестицидов (гербициды, фунгициды, инсектициды) провоцировали формирование ЗЗР. В целом, можно утверждать, что тест-культуры *A. chroococcum* и *P. polymyxa* могут быть использованы с целью определения токсического воздействия большинства пестицидов.

Высокую чувствительность к действию пестицидов показали бактерии вида *P. fluorescens* — для задержки их роста в трех случаях было достаточно использования четырехкратных доз, два препарата (Примэкстра Голд, Ураган Форте) проявляли бактерицидное действие в концентрациях, которые в 10 раз превышали рекомендо-

Рекомендуемые биосенсоры для некоторых пестицидов

Препарат	Тест-культура	Срок инкубации, час
Примекстра Голд	<i>P. polymyxa</i>	24
	<i>P. fluorescens</i>	24
	<i>A. chroococcum</i>	48
Пульсар	<i>P. polymyxa</i>	24
	<i>P. fluorescens</i>	24
	<i>A. chroococcum</i>	48
Ураган Форте	<i>P. fluorescens</i>	24
Захист	<i>P. polymyxa</i>	24
	<i>A. chroococcum</i>	48
Фоликур	<i>P. polymyxa</i>	24
	<i>P. fluorescens</i>	24
Фастак	<i>P. polymyxa</i>	24
	<i>A. chroococcum</i>	48
	<i>P. fluorescens</i>	48

ванную дозу. Помимо этого, *P. fluorescens* является единственной тест-культурой, позитивно среагировавшей на малотоксичный препарат Ураган Форте, что свидетельствует о ее диагностической ценности.

Умеренная чувствительность зафиксирована в варианте с тест-культурой *B. subtilis* — только один пестицид не привел к формированию ЗЗР, большинство исследуемых препаратов отрицательно влияли на рост этих микроорганизмов при увеличении их концентраций в 10 раз, а чувствительность данной культуры не зависела от типа препарата.

ВЫВОДЫ

Анализ данных чувствительности исследуемых микроорганизмов к отдельным пестицидам показал, что каждая тест-культура по-разному реагирует на их применение. Чувствительными сенсорами можно

считать *A. chroococcum* и *P. polymyxa*. Сравнивая полученные данные скорости формирования устойчивой зоны задержки роста и чувствительности микроорганизмов к действию конкретных препаратов, можно утверждать, что сенсоры *P. polymyxa* и *P. fluorescens* пригодны для биотестирования различных типов пестицидов. При изучении реакции предложенных тест-культур на другие виды пестицидов необходимо контролировать зону задержки роста через сутки после ее формирования для исключения бактериостатического действия препарата и неточностей интерпретации результатов.

Все исследуемые пестициды, за исключением гербицида Ураган Форте, в разной степени проявляли токсичное воздействие в отношении микроорганизмов-индикаторов. Полученные данные требуют пересмотра регламентов применения пестицидов при проведении их экологической экспертизы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ананьева Н.Д. Оценка устойчивости микробных комплексов почв к природным и антропогенным воздействиям / Н.Д. Ананьева, Е.В. Благодатская, Т.С. Демкина // Почвоведение. — 2002. — № 5. — С. 580–587.
2. Бублик Л.И. Методы мониторингу забруднення пестицидами ґрунту агроценозів / Л.І Бублик, І.В. Крук, Л.С. Крук // Захист і карантин рослин. — 2008. — Вип. 54. — С. 87–99.
3. Тараненко С.В. Вплив різних технологій вирощування кукурудзи на ґрунтові мікроорганізми [Електронний ресурс] / С.В. Тараненко // Наукові доповіді НУБіП України. — 2015. — № 53.

- Режим доступу: <http://elibrary.ru/contents.asp?issueid=1439306>
4. Assessing the risk of pesticide environmental impact in several Argentinian cropping systems with a fuzzy expert indicator / M. Arregui, D. S'anchez, R. Althaus et al. // *Pest Management Science* — 2010. — Vol. 66, No. 7. — P. 736–740.
 5. *Карпачевский Л.О.* Биодиагностика почв и ее роль в биогеоценологических исследованиях / Л.О. Карпачевский // Биологическая диагностика почв. — М.: Наука. — 1976. — С. 113–114.
 6. Monitoring of pesticide residues in human milk, soil, water, and food samples collected from Kafr

El-Zayat Governorate / S. Dogheim, E. Mohamed, S. Alla et al. // *J. AOAC Int.* — 1996. — Vol. 79, No. 1. — P. 111–116.

7. Екологічна оцінка впливу пестицидів та агрохімікатів на ґрунтові мікроорганізми: методичні рекомендації / Я.В. Чабанюк, О.В. Шерстобоева, В.В. Чайковська та ін. — К., 2015. — 63 с.
8. *Тертична О.В.* Модифікація методу дифузії в агар для визначення чутливості мікроорганізмів до пестицидів / О.В. Тертична // *Агроекологічний журнал*. — 2004. — № 4. — С. 68–70.

REFERENCES

1. Ananeva N.D., Blagodatskaya Ye.V., Demkina T.S. (2002). *Otsenka ustoychivosti mikrobnnykh kompleksov pochv k prirodnyim i antropogennym vozdeystviyam* [Assessment of the stability of soil microbial complexes to natural and anthropogenic influences]. *Pochvovedenie* [Soil science]. No. 5, pp. 580–587 (in Russian).
2. Bublyk L.I., I.V. Kruk I.V., Kruk L.S. (2008). *Metody monitoryngu zabrudnennia pestytsydamy ґruntu ahrotsenoziv* [Methods for monitoring soil pollution by pesticides agrocenoses]. *Zakhyst i karantyn roslyn* [Protection and plant quarantine]. Iss. 54, pp. 87–99 (in Ukrainian).
3. Taranenko S.V. (2015). *Vplyv tekhnolohii vyroshchuvannia kukurudzy na ґruntovi mikroorhanizmy* [The impact of technology growing corn on soil microorganisms]. [Electronic resource]. *Naukovi dopovidi NUBiP Ukrainy* [Scientific reports NUBiP Ukraine]. No. 53. Access mode: <http://elibrary.ru/contents.asp?issueid=1439306> (in Ukrainian).
4. Arregui M., S'anchez D., Althaus R. (2010). Assessing the risk of pesticide environmental impact in several Argentinian cropping systems with a fuzzy expert indicator, *Pest Management Science*, Vol. 66, No. 7, pp. 736–740 (in English).
5. Karpachevskiy L.O. (1976). *Biodiagnostika pochv i ee rol v biogeotsenoticheskikh issledovaniyakh* [Biological diagnosis of soil]. Moskva: Nauka Publ., pp. 113–114 (in Russian).
6. Dogheim S., Mohamed E., Alla S. (1996). Monitoring of pesticide residues in human milk, soil, water, and food samples collected from Kafr El-Zayat Governorate, *J. AOAC Int*, Vol. 79, No. 1, pp. 111–116 (in English).
7. Chabaniuk Ya.V., Sherstoboieva O.V., Chaikovska V.V. (2015). *Ekolohichna otsinka vplyvu pestytsydiv ta ahrokhimikativ na ґruntovi mikroorhanizmy: metodychni rekomendatsii* [Environmental impact assessment of pesticides and agrochemicals on soil organisms: guidelines]. Kyiv, 63 p. (in Ukrainian).
8. Tertychna O.V. (2004). *Modyfikatsiia metodu dyfuzii v ahar dlia vyznachennia chutlyvosti mikroorhanizmiv do pestytsydiv* [Modification agar diffusion method for determining the sensitivity of microorganisms to pesticides]. *Ahroekolohichnyi zhurnal* [Agroecological journal]. No. 4, pp. 68–70 (in Ukrainian).