

СТІЙКІСТЬ ТА ДЕСТРУКТИВНА АКТИВНІСТЬ МІКРОБІОТИ ПЛОДОВОГО САДУ ДО СУЧАСНИХ ПЕСТИЦИДІВ

Н.М. Копча

Інститут захисту рослин НААН

Встановлено рівень стійкості та деструктивної активності епіфітної, ризосферної та ґрунтової мікробіоти плодового саду щодо ципродинілу, лямбда-цигалотрину, дифеноконазолу, ізопропіламіної солі гліфосату. В умовах виробничого пестицидного навантаження частка бактерій, стійких до дії вказаних сполук, становить 48,4–90,5%; частка бактерій, здатних розкладати діючі речовини пестицидів і використовувати їх як джерело біогенних елементів, варіює у межах 12,5–54,0%. Доведено перспективність пошуку біодеструкторів пестицидів серед асоціатів бактерій рослин.

Ключові слова: *стійкість, бактерії, біодеструкція пестицидів, ципродиніл, лямбда-цигалотрин, дифеноконазол, ізопропіламінна сіль гліфосату.*

Щорічно у світі використовується понад 3 млн т пестицидів, зокрема в Україні – 24 тис. т, що забезпечує хімічну обробку на площі 27,5 млн га [1]. Відомо, що цільових об'єктів, які повинні бути знищені за допомогою пестицидів, досягає лише 1–3% фунгіцидів та інсектицидів і 5–40% гербіцидів, а решта потрапляє у агроєкосистеми вже як антропогенний забруднювач, порушуючи природний кругообіг речовин [2–4].

Систематичне використання пестицидів спричиняє низку негативних наслідків: порушення існуючої рівноваги в екосистемах, накопичення залишків та міграцію стійких пестицидів, токсичність для біоти, створення потенційної загрози здоров'ю людини [3–5]. Тому очищення довкілля від залишкових кількостей пестицидів є однією із злободенних проблем сучасності [5–7].

Основним чинником знешкодження пестицидів, що потрапили у довкілля є їх мікробіологічна деструкція. Розклад пестицидів відбувається за дії мікроорганізмів, які мають пластичний ферментативний апарат та мінералізують складові пестицидів, не завдаючи негативного впливу екосистемам [7, 8], чим забезпечують кругообіг елементів і утримують рівновагу в планетарній екосистемі. З огляду на це, проводиться пошук активних мікроорга-

нізмів-деструкторів пестицидів, розробка методів їх інтродукції на забруднені території як біологічного чинника детоксикації залишків пестицидів [7, 8].

У цьому аспекті наукові дослідження у світі та Україні зокрема, головним чином, були присвячені взаємодії пестицидів із мікроорганізмами ґрунту [4–9]. Проте вплив пестицидів на бактерії філоплани, що перебувають у тіснішій взаємодії як компоненти мікробіоти рослин, оптимізують умови вегетації рослин, постачають їм доступні хімічні елементи, біологічно-активні речовини, слугують первинним бар'єром для захисту рослин від патогенних організмів [10, 11] і, насамперед, піддаються пестицидному навантаженню в нинішній системі захисту рослин, у науковій літературі висвітлено лише частково.

Все це свідчить про актуальність досліджень впливу пестицидів на асоційовані з рослинами бактерії, встановлення їх участі у процесах трансформації пестицидів та їх деструктивного потенціалу.

Мета досліджень – оцінити рівень стійкості та деструктивної активності епіфітної, ризосферної та ґрунтової мікробіоти плодового саду щодо нових пестицидів різного призначення.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Модельними зразками для дослідження процесів взаємодії мікроорганізмів із

пестицидами слугували природні асоціації мікробіоти плодового саду та мікроорганізми, ізольовані з наземних органів рослин (бруньок, квітів, листків) яблуні (сорт Білий налив, Голден Делішес), груші (сорт Лісова красуня, Парижанка) — всього 178 штамів, з ризосфери рослин — 64 та з педосфери — 64 штами. Ґрунт плодового саду, що зростає у низинній агрокліматичній зоні (Ужгородський р-н, Закарпатська обл.), — буроземно-підзолистий, поверхнево глейовий.

Були використані пестициди, зареєстровані і внесені до Переліку дозволених для використання в Україні: фунгіциди — Хорус 75WG, в.г. (ципродиніл, 750 г/кг; норма витрат (н.в.) 0,2–0,3 кг, л/га), Скор, 250 ЕС к.е. (дифеноконазол 250 г/л; н.в. 0,2 кг, л/га), інсектицид, акарицид — Карате Зеон, 050 CS мк.с. (лямбда-цигалотрин 50 г/л; н.в. 0,15–0,4 кг, л/га); гербіцид — Раундап, к.е. (ізопропіламінна сіль гліфосату 482 г/л, н.в. 2,0–8,0 кг, л/га) [12].

Відбір зразків органів рослин здійснювали у різні фенологічні періоди загальноприйнятими методами [13]. Для виділення епіфітних мікроорганізмів використовували метод посіву з послідовних розведень водних змивів із поверхні 1 г зразків рослин на живильне середовище (поживний агар) [13], для виділення мікробіоти ризосфери рослин та ґрунту — метод послідовних розведень 1 г ґрунтових суспензій у стерильній водопровідній воді з подальшим висівом на поживний агар [14]. Інкубували дві доби при температурі $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

Для оцінки стійкості рослин до дії пестицидів ізоляти висівали на агаризоване мінеральне середовище (МС, складом: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ — 2,0, K_2HPO_4 — 2,0, MgSO_4 — 0,5, NaCl — 5,0 г, глюкоза — 5 г, вода водопровідна — 1000 мл) з додаванням пестицидів відповідно до рекомендованої в Україні норми використання — 1,0 н.в. [12]. Контролем слугував посів бактерій на МС без додавання пестицидів. Стійкість бактерій визначали за ростом колоній після двох діб їх культивування на живильних середовищах.

Для встановлення деструктивної активності бактерій щодо кожного досліджуваного пестициду використовували модифіковані МС: МС-Г, з якого вилучено джерело вуглецю та додано пестицид у кількості 1,0 н.в., та МС-Н, з якого вилучено сполуку азоту та додано пестицид у кількості 1,0 н.в. Контролем слугував посів бактерій на МС без додавання пестицидів. Ріст бактерій на поверхні МС, в якому джерело вуглецю або азоту замінено пестицидом, свідчить, що бактерії можуть засвоювати необхідний біогенний елемент з пестициду як джерело живлення. Визначали частку бактерій, стійких та деструктивно-активних щодо пестицидів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження були спрямовані на розкриття екологічної взаємодії мікроорганізмів та пестицидів і проводились у таких двох основних напрямках: 1) оцінка впливу пестицидів на життєдіяльність мікроорганізмів; 2) розкриття здатності бактерій до деструкції пестицидів.

Пошук стійких до дії пестицидів мікроорганізмів є важливим етапом для вивчення можливостей мікробного розпаду пестицидів і передумовою для відбору мікроорганізмів, здатних до біодеградації токсикантів.

Аналіз результатів проведених досліджень з визначення рівня стійкості мікробіоти плодового саду щодо виробничих концентрацій пестицидів засвідчив, що епіфітні бактерії були найстійкішими до дії ципродинілу (фунгіцид Хорус) та лямбда-цигалотрину (інсектицид Карате) — частка стійких ізолятів становила 90,5 та 88,7% відповідно; стійкими до дифеноконазолу (фунгіцид Скор) — 58,4, до ізопропіламінної солі гліфосату (гербіцид Раундап) — 55,6% ізолятів (рис. 1).

Ризосферні та ґрунтові бактерії теж були найстійкішими до дії ципродинілу (84,3 і 75,0% відповідно) та лямбда-цигалотрину (87,5 і 73,4% відповідно). Натомість, вказані бактерії були чутливішими до дії дифеноконазолу (50,0 і 48,4% відповідно)

та ізопропіламіної солі гліфосату (64,1 і 59,4% відповідно).

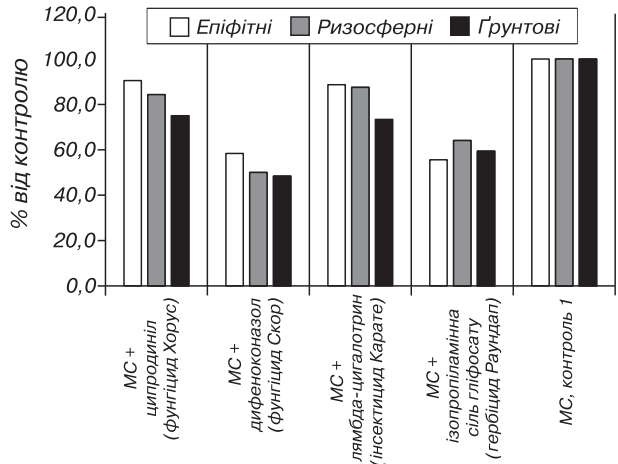
Тобто епіфітна мікробіота рослин характеризується найвищою стійкістю до досліджуваних пестицидів. Разом з тим епіфітні бактерії були найстійкішими до дії ципродинілу та лямбда-цигалотрину, як і ризосферні та ґрунтові; а найчутливішими — до дії ізопропіламіної солі гліфосату, тоді як ризосферні і ґрунтові ізоляти були найчутливішими до дифеноконазолу.

Відомо, що одним із шляхів руйнування пестицидів та зменшення їх негативного впливу на довкілля є здатність мікроорганізмів у процесі деградації використовувати складові пестицидів як джерела живлення для свого росту і розвитку [7, 8]. У наших дослідженнях ізоляти-бактерії виявили здатність використовувати пестициди як джерело основних біогенних елементів — вуглецю та азоту (рис. 2). Так, серед епіфітних штамів частка бактерій, що використовували дифеноконазол (фунгіцид Скор) як джерело вуглецю та азоту, становила 16,9 та 34,0%; серед ризосферних — 15,6 та 14,2; ґрунтових — 12,5 та 12,5% відповідно.

Частка мікроорганізмів, здатних використовувати лямбда-цигалотрин (інсектицид Карате) як джерело вуглецю та азоту, також була найвищою серед епіфітних бактерій — 42,7 та 54,0%; серед ризосферних — 31,0 та 20,5; ґрунтових — 20,0 та 17,0% відповідно.

Частка ізолятів, здатних використовувати ізопропіламіну сіль гліфосату (гербіцид Раундап) як джерело вуглецю та азоту, серед епіфітних бактерій становить 23,6 та 25,0%; серед ризосферних — 31,3 та 20,3; ґрунтових — 20,3 та 17,2% відповідно. Тобто частка бактерій, здатних використовувати ізопропіламіну сіль гліфосату як джерело живлення, була дещо вищою серед ризосферних штамів (рис. 2).

Отже, серед епіфітної мікробіоти налічувалася найбільша частка бактерій, здатних використовувати дифеноконазол



Склад живильного середовища

Рис. 1. Частка ізолятів-бактерій, стійких до дії пестицидів

і лямбда-цигалотрин як джерело живлення, натомість за здатністю використовувати ізопропіламіну сіль гліфосату штами різних угруповань відрізнялись меншою мірою. Серед епіфітів частка бактерій, здатних розкладати пестициди і використовувати як джерело вуглецю, була меншою (16,9–42,7%), ніж частка бактерій, здатних використовувати досліджувані пестициди як джерело азоту (25–54), тоді як серед ризосферної і ґрунтової мікробіоти більшою була частка бактерій, здатних використовувати пестициди як джерело вуглецю (12,5–20,3), і меншою — як джерело азоту (12,5–17,2%).

Слід зауважити, що найдоступнішим як джерело живлення для мікробіоти плодового саду є лямбда-цигалотрин (для 17,0–54,0% бактерій); найменш доступним для епіфітів є ізопропіламіну сіль гліфосату (деструкторами були 23,6–25,0% бактерій); а для ризосферних та ґрунтових бактерій — дифеноконазол (лише 12,5–15,6% ізолятів).

Узагальнення результатів проведених досліджень дало змогу встановити розповсюдженість у довкіллі бактерій-деструкторів діючих речовин новітніх пестицидів, які широко використовуються у сільськогосподарській практиці. Так, серед

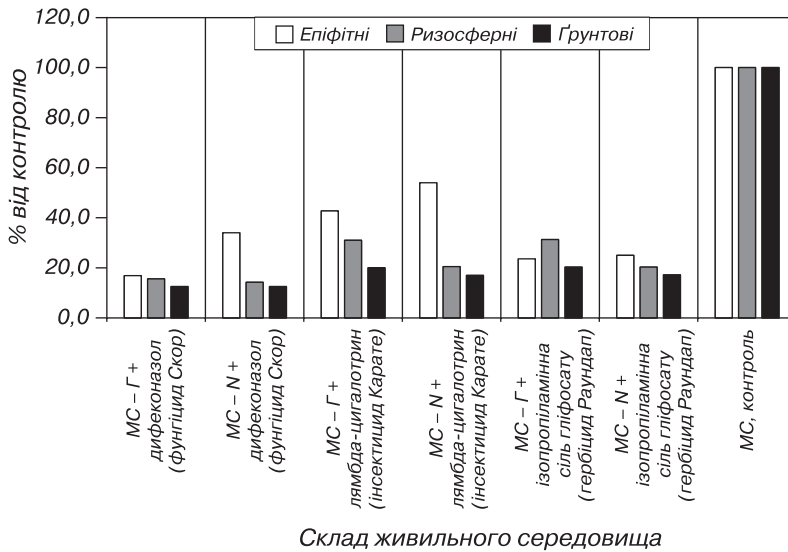


Рис. 2. Частка епіфітних, ризосферних та ґрунтових бактерій плодового саду, здатних засвоювати азот та вуглець пестицидів

мікробіоти плодового саду частка бактерій, здатних розкласти такі токсичні сполуки, як лямбда-цигалотрин, дифенокназол, ізопропіламінна сіль гліфосату, становить 12,5–54,0%.

Згідно з даними наукової літератури, існують значні розбіжності у визначенні загальної чисельності мікроорганізмів, здатних розкласти пестициди. За одними даними їх чисельність становить 1–245 клітин/1 г, за іншими – близько 10^3 клітин на 1 г ґрунту, або 1% від загальної кількості бактерій [2, 4, 7–9]. Також зафіксовано результати досліджень [4] з їх відносною часткою в 5%, а в процесі інкубації ґрунту з додаванням глюкози цей показник зростав до 55%. У науковій літературі відзначено подібність результатів модельних лабораторних досліджень щодо впливу пестицидів на мікроорганізми із даними, отриманими в польових умовах [2, 4].

Як відомо, умови у філосфері характеризуються своєю динамічністю, впродовж доби часто змінюється рівень температури, відносної вологості, ультрафіолетового та видимого спектра сонячного світла. Задовольнятися значно обмеженими запасами поживних речовин з поверхні рослин мо-

жуть далеко не всі мікроорганізми, тому склад епіфітної мікробіоти є доволі специфічним [10, 11, 15].

Результати досліджень свідчать, що існування епіфітних бактерій у малосприятливих умовах, вірогідно, і є вирішальним чинником для формування їх стійкості та деструктивної активності щодо токсичних сполук. Це питання є надзвичайно актуальним в контексті пестицидного навантаження як одного з визначальних екологічних чинників. Своєю чергою, висока деструктивна активність дає змогу припустити важливу роль епіфітних бактерій в очищенні довкілля від залишків пестицидів та розглядати її як перспективне джерело для пошуку мікроорганізмів-деструкторів.

ВИСНОВКИ

Встановлено рівень стійкості та деструктивної активності мікробіоти плодового саду щодо ципродинілу, лямбда-цигалотрину, дифенокназолу, ізопропіламіної солі гліфосату. Виявлено, що в умовах виробничого пестицидного навантаження частка бактерій, стійких до дії пестицидів, становить 48,4–90,5%; зокрема, найвищою стійкістю характеризувалась епіфітна мікробіота плодів (55,6–90,5%); серед-

ною — ризосферна (50,0–87,5), найменш стійкими до дії пестицидів — ґрунтові мікроорганізми (48,4–75,0%).

Серед мікробіоти плодового саду частка бактерій, здатних розкласти лямбда-цигалотрин, дифеноконазол, ізопропіламінну сіль гліфосату, становить 12,5–54,0%, тобто є високою, зокрема: деструкторами пе-

стицидів є 16,9–54,0% епіфітних бактерій, 14,1–31,3 — ризосферних та 12,5–20,3% ґрунтових бактерій.

За результатами теоретичних узагальнень і експериментальних досліджень доведено перспективність пошуку біодеструкторів пестицидів серед асоційованих з рослинами епіфітних бактерій.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ящук В.У. Державні випробування та реєстрація пестицидів та агрохімікатів / В.У. Ящук // Фітосанітарна безпека та біоекологія застосування пестицидів: матеріали Всеукраїнської конференції (Чернівці — Бояни, 14–17 вересня 2010 р.) / під ред. Р.О. Кордулян. — Чернівці: ПП Глібка ОО, 2010. — С. 13–18.
2. Круглов Ю.В. Микрофлора почвы и пестициды / Ю.В. Круглов. — М.: Агропромиздат, 1991. — 128 с.
3. Wodageneh A. Obsolete pesticides: problems / A. Wodageneh // Prevention and disposal: 5th International HCH and pesticides forum (Basque country, 25–27 June 1998). — Bilbao, Spain, 1998. — P. 21–27.
4. Функціонування мікробних ценозів ґрунту в умовах антропогенного навантаження / К.І. Андриєнко, Г.О. Іутинська, А.Ф. Антипчук та ін. — К.: Обереги, 2001. — 240 с.
5. Оценка экологической опасности пестицидов для агробиоценозов / К.Е. Новожилов, Г.И. Сухорученко, Н.Н. Семенова и др. // Региональная экология. — 2010. — № 1–2 (28). — С. 73–79.
6. Биосенсорные свойства почвенной микробиоты при воздействии пестицидов / И.С. Бровко, Я.В. Чабанюк, С.В. Мазур, В.У. Ящук // Агроэкологический журнал. — 2016. — № 3. — С. 111–116.
7. Пошук шляхів біоремедіації ґрунтів за допомогою мікроорганізмів / О.В. Тертична, Г.Г. Андриєнко, Л.І. Моклячук та ін. // Екологія: проблеми адаптивно-ландшафтного землеробства: матеріали Міжнар. наук.-практ. конф. (Івано-Франківськ, 20–21 червня 2006 р.). — Івано-Франківськ, 2006. — С. 192–193.
8. Использование микроорганизмов-деструкторов для биоремедиации почв, загрязненных токсичными химическими веществами / Г.А. Жариков, В.В. Капранов, Н.И. Киселева и др. // Вермикомпостирование и вермиккультура как основа экологического земледелия в XXI веке: Сб. научно-практ. конф. / Ин-т зоологии НАН Беларуси. — Минск, 2007. — С. 98–100.
9. Occurrence, Degradation and Fate of Pesticides during composting / R. Rynk et al. // Compost science and utilization. — 2000. — Vol. 1. — No. 4. — P. 125–135.
10. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized / C.H. Yang, D.E. Crowley, J. Borneman, N.T. Keen // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2001. — Vol. 98. — P. 3889–3894.
11. Мошинець О.В. Екологія фітосфери: Рослинно-мікробні взаємовідносини. Структурно-функціональна характеристика ризо-, ендо- та філосфери / О.В. Мошинець, І.В. Косаківська // Вісник Харківського національного аграрного університету. — 2010. — Вип. 2. — С. 19–35.
12. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні // Пропозиція. — 2016. — 832 с. — (Спецвипуск).
13. Методи фітопатології / З. Кирай, З. Клемент, Ф. Шоймоши, Й. Вереш; [пер. с англ. С.В. Васильевой]. — М.: Колос, 1974. — 344 с.
14. Tenner E.Z. Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. — М.: Дрофа. — 2004. — 256 с.
15. Van Elsas J.D. Horizontal gene transfer in the phytosphere / J.D. Van Elsas, S. Tumer, M.J. Bailey // New Phytologist. — 2003. — Vol. 157. — P. 525–537.

REFERENCES

1. Kordulian R.O., Yashchuk V.U. (2010). *Derzhavni vyprobuvannia ta reiestratsiia pestytsydiv ta ahrokhimikativ* [The state testing and registration of pesticides and agrochemicals]. *Fitosanitarna bezpeka ta bioekologhiia zastosuvannia pestytsydiv: materialy vseukrainskoi konferentsii* [Proceeding of Ukrainian Conference: Phytosanitary biocology safety and pesticide application]. Chernivtsi: PP Hlibka O.O. Publ., pp. 13–18 (in Ukrainian).
2. Kruglov Yu.V. (1991). *Mikroflora pochvy i pestytsydy* [The microflora of the soil and pesticides]. Moskva: Agropromizdat Publ., 128 p. (in Russian).
3. Wodageneh A. (1998). Obsolete pesticides: problems, Prevention and disposal: 5th International HCH and pesticides forum. (Basque country, 25–27 June 1998), Bilbao, Spain, pp. 21–27 (in English).
4. Andreiuk K.I., Iutynska H.O., Antypchuk A.F., Valahurova O.V., Kozrytska V.E., Ponomarenko S.P. (2001). *Funktsionuvannia mikrobnykh tsenoziv gruntu v umovakh antropo-henmoho navantazhennia* [Functioning of microbial communities in soil conditions anthropo-genetic load]. Kyiv: Oberehy Publ., 240 p. (in Ukrainian).

5. Novozhilov K.Ye., Sukhoruchenko G.I., Semenova N.N., Volgarev S.A., Pritulko V.M. (2010). *Otsenka ekologicheskoy opasnosti pestitsidov dlya agrobiotsenozov* [Assessment of the environmental risks of pesticides agrobiocenoses]. *Regionalnaya ekologiya* [Regional ecology]. No. 1–2 (28), pp. 73–79 (in Russian).
6. Brovko I.S., Chabanyuk Ya.V., Mazur S.V., Yashchuk V.U. (2016). *Biosensornyye svoystva pochvennoy mikrobioty pri vozdeystvii pestitsidov* [Biosensor properties when exposed to soil microbiota pesticides]. *Agroekologichnyy zhurnal* [Agroecological journal]. No. 3, pp. 112 (in Russian).
7. Tertychna O.V., Andriienko G.G., Mokliachuk L.I., Nedashkivska O.Yu., Andriienko V.O. (2006). *Poshuk shliakhiv bioremediatsii gruntiv za dopomogoi mikroorganizmiv* [Finding ways of bioremediation of soil doomoo scrooges]. *Ekologiya: problemy adaptivno-landshaftnogo zemlerobstva: Materialy Mizhnarodnoi naukovo-praktychnoi konferencii* [Proceeding of International scientific-practical conference: Ecology: problems of adaptive-landshaftnogo agriculture]. Ivano-Frankivsk, pp. 192–193 (in Ukrainian).
8. Zharikov G.A., Kapranov V.V., Kiseleva N.I. (2007). *Ispolzovanie mikroorganizmov-destruktorov dlya bioremediatsii pochv, zagryaznennykh toksichnymi khimicheskimi veshchestvami* [The use of microorganisms-destructors for the bioremediation of soils contaminated with toxic chemicals] *Vermikompostirovanie i vermikultura kak osnova ekologicheskogo zemledeliya v XXI veke Sbornyk nauchno-praktychnoy konferencii* [Collection of scientific-practical conference: Vermicomposting and vermiculture as the basis of organic agriculture in the twenty-first century.], Minsk, pp. 98–100 (in Russian).
9. Rynk R. (2000). Occurrence, Degradation and Fate of Pesticides during composting, Compost science and utilization, Vol 1, No. 4, pp. 125–135 (in English).
10. Yang C.H., Crowley D.E., Borneman J., Keen N.T. (2001). Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 98, pp. 3889–3894 (in English).
11. Moshynets O.V., Kosakivska I.V. (2010). *Ekologiya fitosfery: Roslynno-mikrobni vzaiemovidnosyny. Strukturno-funktsionalna kharakterystyka ryzo-, endo- ta filofery* [Ecology fitosfery: plant-microbe relationships. Structural and functional characteristics ryzo-, endo- and filofery]. *Visnyk Kharkivskoho natsionalnoho ahrarnoho universytetu* [Bulletin of Kharkiv National Agricultural University]. Iss. 2, pp. 19–35 (in Ukrainian).
12. *Perelik pestytsydiv i ahrokhimikativ dozvolenykh do vykorystannia v Ukraini* [The list of pesticides and agrochemicals permitted for use in Ukraine]. Spetsvypusk zhurnalu Propozytsiia [Special issue of the journal: Offer]. Kyiv: Yunivest Media Publ, 2016, 832 p. (in Ukrainian).
13. Vasileva S.V., Kiray Z., Klement Z., Shoymoshi F., Veresh Y. (1974) *Metody fitopatologii* [Methods of Phytopathology]. Moskva: Kolos Publ., 344 p. (in Russian).
14. Tepper Ye.Z., Shilnikova V.K., Pereverzeva G.I. (2004). *Praktikum po mikrobiologii* [Workshop on microbiology]. Moskva: Drofa Publ., 256 p. (in Russian).
15. Van Elsas J.D., Tumer S., Bailey M.J. (2003). Horizontal gene transfer in the phytosphere, New Phytologist, Vol. 157, pp. 525–537 (in English).