

УДК 581.13.:504.054

¹А.А. Нуржанова*, ²С.Н. Калугин, ²Т. Мукашева, ²Р.Ж. Бержанова,
²С. Ибрагимова, ²Г. Демеубаева, ¹Ш. Сейсенбай, ²С.К. Турашева

¹Институт биологии и биотехнологии растений, Казахстан, г. Алматы

²Казахский Нацио-нальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

*e-mail: gen_asil@mail.ru

Количественный состав ризосферного микробного сообщества Xanthium strumarium и Cucurbita pepo L. pumpkin, произрастающие на пестицид-загрязненной почве

Изучен состав микроорганизмов в ризосфере и ризоплане Xanthium strumarium и Cucurbita pepo L. pumpkin, произрастающих на загрязненной хлорорганическими пестицидами почве.

Ключевые слова: микроорганизм, ризосфера, ризоплан, хлорорганические пестициды.

А.А. Нуржанова, С.Н. Калугин, Т. Мукашева, Р.Ж. Бержанова,
 С. Ибрагимова, Г. Демеубаева, Ш. Сейсенбай, С.К. Турашева

Пестицидпен ластанған топырақта өсетін Xanthium strumarium және Cucurbita pepo L. pumpkin ризосфералық микроб қауымдастығының сандық құрылымы

Хлорорганикалық пестицидтермен ластанған топырақтағы Xanthium strumarium және Cucurbita pepo L. pumpkin өсімдіктерінің ризосфералық және ризоплан аймағындағы мик-роорганизмдердің құрамы анықталған.

Түйін сөздер: микроорганизм, ризосфера, ризоплан, хлорорганикалық пестицидтер.

A.A. Nurzhanova, S.N. Kalugin, T. Mukasheva, R.Zh. Berzhanova,
 S. Ibragimova, G. Demeubaeva, Sh. Seisembai, S.K. Turasheva

The quantitative composition of the rhizosphere microbial community Xanthium strumarium and Cucurbita pepo L. pumpkin growing in pesticide-contaminated soil

Have been studied the composition of microorganisms in the rhizosphere and rizoplane of Xanthium strumarium and Cucurbita pepo L. pumpkin growing on soil contaminated with organo-chlorine pesticides.

Key words: microorganism, rhizosphere, rizoplane, organochlorine pesticides

Растительность является как бы резервуаром для многих органических веществ. Сочетание способности аккумулировать пестициды и сохранять их длительное время в вегетативных органах растений и метаболизировать их в нетоксичные соединения, позволяет использовать растения в фиторемедиационных системах для очистки загрязненной почвы и под-земных вод [1-3]. Как показывает мировая практика, одним из наиболее действенных приемов устранения данного вида загрязнения, является технология фиторемедиации, с использованием широкого спектра видов растений и насыщением почвенной биоты полезными видами микроорганизмов.

С экономической точки зрения фиторемедиация имеет преимущества перед «химическими» и «механическими» методами ремедиации почв, так как ее внедрение не предполагает крупных капиталовложений, и эксплуатационные расходы на реализацию данной технологии невелики.

Выбор растений для этой технологии определяется их способностью выносить на поверхность почвенные воды за счет эвапотранспирации, расщеплять загрязняющие соединения при помощи своих ферментов и накапливать эти соединения в биомассе. В настоящее время разработано фитотехнология для почв, загрязненных тяжелыми металлами и нефтью. Известно

более 400 видов растений, обладающих аккумуляционной способностью тяжелых металлов и нефтепродуктов к ним относятся: *Ambrosia artemisiifolia* L., *Thlaspi rotundifolium* L., *Thlaspi caerulescens* L., поглощающие в значительном количестве Zn, Cd, Pb. К гипер-аккумуляторам Ni относятся *Alyssum* L., *Arabidopsis* L., *Helianthus annuus* L., *Ricinus communis* L., *Sinapis alba* L. и др. [4]. По аналогии начаты исследования по использованию растений для очистки почв и воды, загрязненных органическими загрязнителями. Выявлено, что вид *Cucurbita pepo* L. pumpkin является гипераккумулятором хлорорганических пестицидов [5]. Установлено, что основными механизмами ремедиации почв, загрязненных хлорорганическими загрязнителями являются фитоэкстракция и фитостабилизация [3]. Фитоэкстракционный потенциал зависит от гидрофобности загрязнителя [6]. Например, инсектицид ДДТ и его метаболиты относятся к гидрофобным соединениям с высоким $\log K_{ow}$ значением, которые варьируют в пределах от 5.5 до 6.9 [3].

Ризосфера это почвенная зона, прилегающая к корневой системе растений, является средой обитания для огромного количества микроорганизмов, способных разрушать пестициды [7]. Например, в ризосфере сахарного тростника численность микроорганизмов де-структоров 2,4-Д в 200 раз выше, в сравнении с усредненным почвенным образцом [8]. Вопрос о диапазоне пестицидов, к которым ризосфера имеет видовую специфичность, до сих пор неясен. Например, бобовые поддерживают большие популяции нескольких родов микроорганизмов. Они могут обладать избирательной способностью и разрушать несколько пестицидов, а другие виды микроорганизмов – деградировать только ароматические соединения, такие как полициклические углеводороды и ДДТ [7]. В связи с этим изучение роли растительного и микробного сообщества в процессе фиторемедиации загрязненных почв представляет огромный научный и практический интерес.

Острая необходимость в разработке фиторемедиационной технологии почв, загрязненных пестицидами возникла в связи с тем, что Казахстану в качестве «экологического наследия» от распавшегося СССР достались многочисленные очаги загрязнения устаревшими непригодными к применению пестицидами

– территории бывших хранилищ химических средств защиты растений и металлургических заводов и прилегающие к ним земли. В настоящее время территории загрязненные остатками пестицидов превратились в так называемые «горячие точки», которые представляют высокую экологическую опасность для окружающей среды и здоровья человека. Установлено, что почва вокруг недействующих хранилищ химических средств защиты растений загрязнены хлорорганическими пестицидами: ДДТ (p,p'-дихлордифенилтрихлорэтан) и ГХЦГ (гексахлорциклогексан) и их метаболитами: 2,4'ДДД, 4,4'ДДД, 4,4'ДДТ; 4,4'ДДЕ, α -ГХЦГ, β -ГХЦГ, γ -ГХЦГ [9]. Хотя эти пестициды представляют собой только часть устаревших пестицидов, они важны из-за их статуса, так как они входят, по списку UNEP, в "черную дюжину" наиболее стойких и опасных органических загрязнителей, угрожающих окружающей среде планеты.

Целью данной статьи является изучение состава микроорганизмов в ризосфере и ризоплане растений, произрастающих на загрязненной хлорорганическими пестицидами почве.

Объектом исследования были *Xanthium strumarium* и *Cucurbita pepo* L. pumpkin гипераккумулятор хлорорганических пестицидов.

В качестве почвенной культуры использовали почву из территории бывших хранилищ пестицидов (пос. Кызыл-Кайрат Талгарский район Алматинская область). Средняя концентрация хлорорганических пестицидов в почве из загрязненной территории составляло 1425 $\mu\text{г кг}^{-1}$ ПДК метаболитов ДДТ и изомеров ГХЦГ в почве равен 100 $\mu\text{г кг}^{-1}$. В качестве контроля использовали незагрязненную пестицидами почву.

Перед экспериментом почву просеяли через сито (3 мм) и затем тщательно перемешали. Затем галькой заполнили дно сосуда (2/3 дна сосуда, масса 500 г). Далее дренаж закрывали марлей и сверху насыпали речной песок 2/3 от дренажа (масса песка 500 г) и снова закрывали марлей. Затем сосуд заполняли почвой (масса почвы 5000 г). Посев семян проводили в горшках в трех повторностях. Посев семян провели в течение одного и того же дня. Полив проводили ежедневно утром проточной водой (объем воды – 400 мл на сосуд).

Отбор образцов и определение содержания пестицидов в почве до и после эксперимента, в золе и в вегетативных органах растений в период

цветения определяли с помощью стандартных методов, применяемых в Казахстане на хроматографе цвет с использованием капиллярной колонки HP-5 и электронно-захватного детектора.

Выделение и идентификацию микроорганизмов из ризосферы и ризопланы растений проводили в период цветения по общепринятой методике [10,11]. Для изучения состава популяции микроорганизмов, выделенных из ризосферы и ризопланы растений использовали различные питательные среды: численность бактерий, использующих органические формы азота, учитывали на мясопептонном агаре; на крахмально-аммиачном агаре определяли численность бактерий, использующих минераль-

ные формы азота (на 3-10 сутки роста); на среде мясопептонном агаре/Сабуро учитывали численность спорообразующих микроорганизмов (на 3-8 сутки роста); на среде Сабуро учитывали численность дрожжей (на 7-10 сутки).

Все экспериментальные данные статистически обрабатывали общепринятыми методами построение графиков, диаграмм проводили после обработки данных с использованием компьютерной программы "Microsoft Excel".

Подтверждено, что отобранные из дикорастущей популяции вид *Xanthium strumarium* и *Cucurbita pepo L. pumpkin* обладают способностью аккумулировать хлороорганические пестициды, обладают способностью транслоци-

Таблица 1 – Остаточное количество пестицидов в вегетативных органах и в почве до/после эксперимента, фитоэкстракция, коэффициент биологического поглощения и транслокации пестицидов растениями, произрастающими на загрязненной пестицидами почве

Варианты опыта	Остаточное количество пестицидов, $\mu\text{г кг}^{-1}$	Масса, кг	Фито экстракция, $\mu\text{г}$	КБП	Кт
<i>Xanthium strumarium</i>					
Почва до эксперимента	1425	5	7125	2.9	0,6
Надземная часть	1725	0.0133	22.9		
Корень	2500	0.003	7.5		
Почва после эксперимента	756	5	3780		
<i>Cucurbita pepo L. pumpkin</i>					
Почва до эксперимента	1425	5	7125	1.3	0,44
Надземная часть	215	0,013	6,5		
Корень	1575	0,0005	1,0		
Почва после эксперимента	597	5	2985		
Примечание: 1. Кт – коэффициент транслокации (отношение остаточного количества пестицидов в надземной части к подземной части);					
2. КБП – коэффициент биологического поглощения (отношение остаточного количества пестицидов в вегетативных органах к остаточному количеству пестицидов в почве).					

Таблица 2 – Численность аммонифицирующих бактерии, микромицетов, спорных бактерий и актинобактерий в ризосфере и ризоплане растительного организма, в 10^5 КОЕ/г абс. сухой почвы

Растение	Ризосфера		Ризоплан	
	Контроль	Загрязненная почва	Контроль	Загрязненная почва
Численность аммонифицирующих бактерий				
<i>X. strumarium</i>	32,5 \pm 1,5	36,8 \pm 1,9	22,1 \pm 0,8	29,0 \pm 1,3*
<i>C. pumpkin</i>	24,0 \pm 1,2	19,4 \pm 0,8*	17,5 \pm 0,6	11,6 \pm 0,5*
Численность микромицетов				
<i>X. strumarium</i>	5,6 \pm 0,4	16,3 \pm 0,8*	2,5 \pm 0,4	1,4 \pm 0,1*
<i>C. pumpkin</i>	1,7 \pm 0,1	2,4 \pm 0,3*	0,7 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1*
Численность спорных бактерий				
<i>X. strumarium</i>	23,5 \pm 1,2	18,4 \pm 0,9*	12,5 \pm 0,6	10,9 \pm 0,5*
<i>C. pumpkin</i>	19,5 \pm 1,0	10,4 \pm 0,5*	8,2 \pm 0,4	4,8 \pm 0,3*
Численность актинобактерий				
<i>X. strumarium</i>	26,2 \pm 1,3	17,5 \pm 0,9*	35,4 \pm 1,7	43,5 \pm 2,1*
<i>C. pumpkin</i>	20,5 \pm 1,1	11,7 \pm 0,7*	14,2 \pm 0,7	12,5 \pm 0,4*
Примечание: * - $t > 2,0$ (разность достоверна при 95% уровне вероятности)				

ровать пестициды в системе «почва – корень – надземная часть» и высоким коэффициентом биологического поглощения (таблица 1).

Из ризоплана и ризосферы изученных растений были выделены бактерии, дрожжи, актинобактерий и спорообразующие микроорганизмы. Отмечено, что общее количество бактерий в ризосфере изученных растений было значительно выше, чем их численность в ризоплане (таблица 2). Из таблицы 2 видно, в ризосфере и ризоплане гипераккумулятора *C. Pumpkin*, произрастающих на пестицид-загрязненной почве статистически значимо возрастает численность как аммонифицирующих бактерии, так спорных бактерий и актинобактерий, а в ризосфере и ризоплане *X. strumarium* – только численность актинобактерий, микромицетов и спорных бактерий. При этом, общее количество микромицетов в ризоплане изучаемых видов растений, произрастающих на загрязненной пестицидами почве, снижалось почти в два раза, а в ризосфере, наоборот, повышалось. В контрольных образцах микрофлора ризосферы и ризопланы была разнообразнее и представлена различными родами. Наибольшее количество встречались бактерии родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter* и *Azotobacter*. Независимо от вида растений в ризосфере и ризоплане, про-

израстающих на чистой почве в незначительном количестве были обнаружены представители родов *Streptomyces* и *Micrococcus*.

При изучении родовых признаков выявлено, что преобладающими представителями в ризосфере и ризоплане у исследуемых растений, произрастающих на загрязненной почве были бесспорные формы группы аммонификаторов представители родов *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium* и грамположительные спорные палочки рода *Bacillus*. При этом замечено, что в ризосфере и ризоплане *X. strumarium* доминировали в основном представители рода *Pseudomonas*, а *C. pumpkin* – представители родов *Streptomyces* и *Micrococcus*, а также микромицеты.

Таким образом, общее количество бактерий в ризосфере *Xanthium strumarium* и *Cucurbita pepo L. pumpkin* выше, чем ризоплане. Микробный комплекс корневой зоны растений, выращенных в присутствии хлорорганических пестицидов формировали представители родов *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Streptomyces* и *Micrococcus*. Особый интерес представляют бактерии рода *Pseudomonas*, так как они являются основной группой почвенных микроорганизмов, разрушающих ксенобиотики.

Литература

1. Sicbaldi F., Sacchi G.S., Trevisan M., Del re A. M. Root Uptake and Xylem Translocation of Pesticides from Different Chemical Classes // *Pesticide Science*, 1997. Vol.50. – P.111-119.
2. Frazar C. The Bioremediation and Phytoremediation of Pesticide-contaminated Sites // *National Network of Environmental Studies*. 2000, <http://www.clu-in.org>.
3. Sophie Pascal-Lorber, François Laurent. Phytoremediation Techniques for Pesticide Contaminations // *Alternative Farming Systems, Biotechnology, Drought Stress and Ecological Fertilisation, Sustainable Agriculture*. Springer Science + Business Media. 2011– P. 77-105.
4. Brooks R.R. Plants that hyperaccumulate heavy metals // *Wallingford, UK: CAB International*, 1998. – 53 p.
5. White J.C. Different bioavailability of field-weathered p,p-DDE to plants of the *Cucurbita* and *Cucumers* genera // *Chemosphere*. 2002. Vol. 49. – P. 143-152
6. Alexander M. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants // *Environ. Science Techn.* 2000. Vol. 34. – P. 4259-4265.
7. Anderson T.A., Guthrie E.A., Walton B.T. Bioremediation in the rhizosphere // *Environmental Science and Technology*. 1993. № 27. – P. 2630-2636.
8. Sandermann H., Loos M. Enumeration of 2,4-D-Degrading Microorganism Soils and Crop Plant Rhizospheres Using Indicator Media: High Populations Associated with Sugar Cane // *Chemosphere*. 1984. Vol. 13, № 9. – P. 1073-1084.
9. Нуржанова А., Седловский А., Калмыков Е. Анализ содержания хлорорганических пестицидов в почвах некоторых объектов Алматинской и Акмолинской областей // *Биотехнология. Теория и практика*. 2004. № 3. – С. 99-105.
10. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. Изд-во МГУ. 1991.– 250с.
11. Определитель бактерий Берджи. Москва. Мир. 1997. – 234 с.

Reference

1. Sicbaldi F., Sacchi G.S., Trevisan M., Del re A. M. Root Uptake and Xylem Translocation of Pesticides from Different Chemical Classes // *Pesticide Science*, 1997. Vol.50. – P.111-119.
2. Frazar C. The Bioremediation and Phytoremediation of Pesticide-contaminated Sites // *National Network of Environmental Studies*. 2000, <http://www.clu-in.org>.
3. Sophie Pascal-Lorber, François Laurent. Phytoremediation Techniques for Pesticide Contaminations // *Alternative Farming Systems, Biotechnology, Drought Stress and Ecological Fertilisation, Sustainable Agriculture*. Springer Science + Business Media. 2011– P. 77-105.
4. Brooks R.R. Plants that hyperaccumulate heavy metals // *Wallingford, UK: CAB International*, 1998. – 53 p.
5. White J.C. Different bioavailability of field-weathered p,p-DDE to plants of the Cucurbita and Cucumers genera // *Chemosphere*. 2002. Vol. 49. – P. 143-152
6. Alexander M. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants // *Environ. Science Technol.* 2000. Vol. 34. – P. 4259-4265.
7. Anderson T.A., Guthrie E.A., Walton B.T. Bioremediation in the rhizosphere // *Environmental Science and Technology*. 1993. № 27. – P. 2630-2636.
8. Sandermann H., Loos M. Enumeration of 2,4-D-Degrading Microorganism Soils and Crop Plant Rhizospheres Using Indicator Media: High Populations Associated with Sugar Cane // *Chemosphere*. 1984. Vol. 13, №. 9. – P. 1073-1084.
9. Nurzhanova A., Sedlovskiy A., Kalmykov E. Analiz sodержaniya hlororganicheskikh pestitsidov v pochvah nekotorykh ob'ektov Almatinskoy i Akmolinskoy oblastey // *Biotechnologiya. Teoriya i praktika*. 2004. # 3. – S. 99-105.
10. Zvyagintsev D.G. *Metody pochvennoy mikrobiologii i biohimii*. Izd-vo MGU. 1991.– 250s.
11. *Opredelitel bakteriy Berdzhii*. Moskva. Mir. 1997. – 234 s.