УДК 631.466.3:631.453

# Биоиндикационные и биотестовые реакции организмов на действие метилфосфонатов и пирофосфата натрия

© 2014. Л. В. Кондакова<sup>1,2</sup>, д.б.н., доцент, Л. И. Домрачева<sup>1,3</sup>, д.б.н., профессор, С. Ю. Огородникова<sup>1,2</sup>, к.б.н., доцент, А. С. Олькова<sup>2</sup>, к.т.н., доцент, Н. А. Кудряшов<sup>3</sup>, аспирант, Т. Я. Ашихмина<sup>1,2</sup>, д.т.н., профессор, <sup>1</sup>Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, <sup>2</sup>Вятский государственный гуманитарный университет, <sup>3</sup>Вятская государственная сельскохозяйственная академия, e-mail: ecolab2@gmail.com

Пирофосфат натрия (ПФН) и метилфосфоновая кислота (МФК) потенциально могут попадать в почву при уничтожении фосфорсодержащих отравляющих веществ. Изучена реакция микрофототрофов на воздействие разных концентраций метилфосфонатов и ПФ для разработки методов биоиндикации и биотестирования.

Испытуемые фосфорсодержащие соединения активно влияют на развитие водорослей в почве.

Под действием возрастающих доз ПФН происходит снижение видового разнообразия водорослей и цианобактерий (ЦБ) во всех исследуемых типах почв, особенно существенное в подзолистых (на 33%) и аллювиальной дерновой (на 27%). Зелёные одноклеточные водоросли Chlamydomonas gloeogama и Chlorella vulgaris выделены среди видов, наиболее толерантных к действию поллютантов во всех почвах. Безгетероцистные из родов Phormidium, Plectonema, Leptolyngbya активно развиваются в дерново-подзолистой почве, загрязнённой ПФН, а азотфиксаторы из рода Nostoc—в аллювиальной дерновой.

МФК в концентрации 1·10<sup>-3</sup> моль/л не только стимулирует размножение водорослей, но также ускоряет ход альгосукцессий, способствуя появлению в структуре популяций гетероцистных азотфиксирующих ЦБ. В противоположность МФК, глифосат в целом отрицательно влияет на фототрофные группировки, полностью элиминируя размножение ЦБ, тормозя размножение зелёных водорослей. Внесение ГФ благоприятно для диатомовых водорослей.

Водные вытяжки, полученные из почв, загрязнённых МФК  $(1\cdot 10^{-2} \text{ и } 1\cdot 10^{-3} \text{ моль/л})$  не влияли на жизнеспособность клеток ЦБ Fischerella muscicola, тогда как в вариантах с ГФ отмечали снижение жизнеспособности клеток ЦБ. Это свидетельствует о большей токсичности для фототрофных организмов производного метилфосфоновой кислоты — глифосата по сравнению с МФК.

Изученные группы фототрофных микроорганизмов можно рассматривать в качестве потенциальных биоиндикаторов на загрязнение почвы пирофсфатом натрия, метилфосфоновой кислотой и глифосатом.

During decommissioning phosphorus-containing toxic substances it is possible that sodium pyrophosphate (SPP) and methylphosphonic acid (MPA) can get into soil. Reaction of microtrophs to different concentrations of methylphosphonates and SP was researched in order to work out the methods of bioindication and biotesting.

The researched phosphorus-containing complexes actively influence the development of algae in the soil. Under the influence of increasing SPP species diversity of algae and cyanobacteria (CB) decreases in all the soils under research, especially in podzolic soil (33%) and alluvial sod soil (27%).

Green unicellular algae *Chlamydomonasgloeogama* and *Chlorellavulgaris* are marked among the species which are the most tolerant to pollutants in all soils. The unheterocystic of the genera *Phormidium*, *Plectonema*, *Leptolyngbya* develop well in sod-podzolic soil polluted with SSP, while nitrogen fixers of the genus *Nostoc* develop in alluvial sod soil.

MPA in concentration of 1·10-3 mol/l does not only stimulate algae propagation, but also accelerates algosuccessions and contributes to the fact that heterocystic nitrogen fixing bacteria appear in the population. Unlike MPA, glyphosate influences phototrophic groups in a bad way. It fully eliminates CB propagation and hampers propagation of green algae. GP favourably influences diatomic algae.

Water extracts from soil polluted with MPA  $(1\cdot10-2 \text{ and } 1\cdot10-3 \text{ mol/l})$  did not influence the vital capacity of the cells of CB Fischerellamuscicola. In samples with GP vital capacity of CB cells was decreased. It suggests that glyphosate, a derivant of methylphosphonic acid is more toxic to phototrophic organisms than MPA.

The researched groups of phototrophic microorganisms can be considered as potential bioindicators for soil contamination with sodium pyrophosphate, methylphosphonic acid and glyphosate.

Ключевые слова: цианобактерии, водоросли, микромицеты, биоиндикация, биотестирование, пирофосфат натрия, метилфосфоная кислота, глифосат.

Keywords: cyanobacteria, algae, fungi, bioindication, bioassay, sodium pyrophosphate, methylphosphonium acid, glyphosate.

Проблема безопасного для окружающей среды уничтожения химического оружия сохраняет свою актуальность. Лаборатория биомониторинга Института биологии Коми НЦ УрО РАН и ВятГГУ специализируется на разработке методов мониторинга природных сред и объектов, в том числе выполняются научно-исследовательские работы по изучению воздействия метилфосфоновой кислоты и пирофосфата натрия на различные компоненты природной среды. Используя диапазоны концентраций этих соединений в природной среде и модельных опытах (in vivo и in vitro) изучали порог толерантности к ним микроорганизмов различной систематической принадлежности. Постоянными обитателями микробоценозов в любых типах почв являются водоросли, цианобактерии и микромицеты, которые могут служить биомаркерами и индикаторами состояния почвы [1-4].

Метилфосфоновая кислота (МФК) и пирофосфат натрия (ПФН), как и любые другие соединения, попадающие в почву, оказывают определённые воздействия на микрофлору, среди которой есть группы организмов, чья реакция соответствует вектору доза-эффект. Поэтому подобные группы микробов можно использовать как организмы-индикаторы и тест-организмы на определение степени загрязнения среды данными фосфорсодержащими веществами или уровня их токсичности [5–7].

ПФН и МФК потенциально могут попадать в почву при уничтожении фосфоросодержащих отравляющих веществ (ФОВ). Технология уничтожения ФОВ такова, что на первом этапе происходит гидролиз ФОВ с образованием реакционных масс [8]. Метилфосфоновая кислота — конечный продукт гидролиза и универсальный маркер ФОВ, она отличается повышенной персистентностью в окружающей среде, сохраняется в почве десятилетиями [9]. На втором этапе уничтожения происходит сжигание реакционных масс с их деструкцией до минеральных соединений, в том числе и до ПФН [8]. Действующим веществом гербицида глифосата является производное МФК — N-фосфонометилглицин. Глифосат широко применяется для борьбы с сорными растениями в сельском хозяйстве и на приусадебных участках.

Целью работы было изучить реакцию микрофототрофов на воздействие разных концентраций метилфосфонатов и ПФН для разработки методов биоиндикации и биотестирования.

С ПФН была проведена серия полевых опытов, в ходе которой были заложены модельные площадки на дерново-подзолистой, подзолистой и аллювиальной почвах. Доза внесения ПФН (расчётная доза – РД) соответствовала уровню его предельного выпадения на поверхность почвы, который рассчитывался исходя из предположения, что весь фосфор, входящий в состав фосфорорганических веществ, будет при сжигании продуктов детоксикации выброшен в атмосферу в форме ПФН. 1 РД для дерново-подзолистой почвы составила 4,5 г/м<sup>2</sup>, соответственно, при 10 РД доза внесения ПФН – 45 г/м². Пробы почвы для качественного и количественного анализа альго-микофлоры отбирали через три месяца после закладки опыта.

Видовое разнообразие альгофлоры в контрольных вариантах составляло: 30 видов в дерново-подзолистой почве и по 15 видов — в подзолистой и дерновой аллювиальной почвах (табл. 1). Внесение ПФН по-разному сказывается на видовом составе водорослей в разных почвах: в дерново-подзолистой почве при внесении 1 РД число видов увеличилось с 30 до 35, в первую очередь, за счёт представителей

Таблица 1 Видовое разнообразие водорослей и цианобактерий дерново-подзолистой, подзолистой и аллювиальной дерновой почв и его изменение под влиянием пирофосфата натрия

	Тип почв, варианты								
Отдел	дерново-подзолистая почва			подзолистая			аллювиальная дерновая почва		
	К	1 РД	10 РД	К	1 РД	10 РД	К	1 РД	10 РД
Cyanobacteria	5	6	6	0	0	0	7	6	6
Chlorophyta	13	19	12	11	10	8	4	5	4
Xanthophyta+ Eustigmatophyta	7	7	3	3	4	2	3	2	1
Bacillariophyta	5	4	4	1	0	0	1	0	0
Всего	30	36	25	15	14	10	15	13	11

Примечание: К – контрольный вариант, РД – расчётная доза пирофосфата натрия.

Таблица 2 Влияние пирофосфата натрия на численность микрофототрофов в дерново-подзолистой почве (тыс. клеток/г)

Вариант	Группы фототрофов					
	зелёные диатомовые цианобактерии всего					
Контроль	900±173	130±5	2100±107	3130±285		
1 РД	230±6	270±15	2900±500	3400±521		
10 РД	200±10	100	730±115	1030±125		

Chlorophyta, и этот же показатель снижается при 10 РД с 30 до 25 видов. В двух других исследуемых почвах возрастание концентрации ПФН приводит к выпадению ряда видов и неуклонному снижению их числа.

Наиболее устойчивыми к действию ПФН видами в дерново-подзолистой и аллювиальной дерновой почве были цианобактерии (ЦБ): Cylindrospermum licheniforme и Nostoc punctiforme. Специфическая устойчивость в дерново-подзолистой почве отмечена также для Phormidium boryanum, Ph. formosum, Plectonema boryanum, Leptolyngbya frigida, а в аллювиальной дерновой – для Cylindrospermum muscicola, Nostoc linckia, N. paludosum. Сквозные доминирующие константные виды,

Таблица 3 Влияние пирофосфата натрия на структуру фототрофных микробных комплексов (%)

Вариант	Фототрофы				
	водоросли цианобактери				
Контроль	49,0	51,0			
1 РД	14,7	85,3			
10 РД	14,2	85,8			

Таблица 4 Влияние возрастающих концентраций пирофосфата натрия на структуру почвенных микоценозов (%)

Вариант	Микромицеты				
	с окрашенным	с бесцветным			
	мицелием	мицелием			
Контроль	56,8	43,2			
1 РД	69,7	30,3			
10 РД	76,9	23,1			

обладающие уникальной устойчивостью к ПФН во всех трёх типах почвы, относятся к Chlorophyta: Chlamydomonas gloeogama и Chlorella vulgaris. В подзолистой почве выявлен толерантный к ПФН вид — Coccomyxa confluens, а в дерново-подзолистой и подзолистой почвах неизменно встречаются два вида нитчатых зелёных — Klebsormidium flaccidum и K. nitens, которые не встречаются в аллювиальной дерновой почве. По степени угнетения альгофлоры ПФН почвы располагаются в следующем ряду: подзолистая > дерново-подзолистая > аллювиальная дерновая.

Прямой микроскопический учёт микрофототрофов показал, что ПФН в концентрации 1 РД не токсичен для цианобактерий (ЦБ), а подавляет развитие только представителей Chlorophyta, тогда как при 10 РД пирофосфата натрия происходит ингибирование размножения всех групп водорослей (табл. 2) с одновременным усилением доминирования ЦБ (табл. 3), т. е. наблюдается цианофитизация фототрофных комплексов, явление, постоянно отмечаемое нами как неспецифическая реакция альго-цианобактериальных почвенных комплексов на действие разнообразных поллютантов (тяжёлые металлы, нефть и нефтепродукты, пестициды, отходы производства фторполимеров и т. д.).

Индикационным признаком на загрязнение почвы ПФН можно также считать реакцию почвенных грибов, которая проявляется в усилении степени меланизации микокомплексов (табл. 4).

Воздействие различных концентраций МФК на численность и видовой состав водо-

Таблица 5 Влияние метилфосфоновой кислоты (моль/л) на видовой состав водорослей и цианобактерий дерново-подзолистой почвы

	Варианты опыта						
Отделы	5 дней пред	цварительной	инкубации	20 дней предварительной инкубации			
	контроль	МФК 5·10-4	МФК 5∙10-3	контроль	МФК 5·10-4	МФК 5∙10-3	
Cyanobacteria	9	11	9	8	11	10	
Bacillariophyta	3	2	3	4	6	2	
Chlorophyta	2	5	2	4	4	3	
Итого	14	18	14	16	21	15	

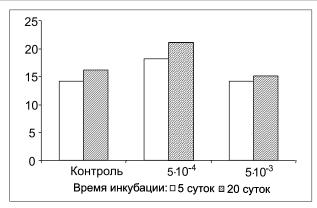


Рис. 1. Влияние метилфосфоновой кислоты на количество видов в альгогруппировках. По вертикальной оси — количество видов; по горизонтальной оси — варианты опыта: контроль без МФК, разные концентрации МФК моль/л.

рослей дерново-подзолистой почвы изучали в условиях лабораторного эксперимента.

В опытах использовали пахотную дерново-подзолистую среднесуглинистую почву, наиболее распространённую в Кировской области и на территории санитарно-защитной зоны объекта уничтожения химического оружия «Марадыковский». Почву отбирали с глубины 0–10 см. Содержание органического углерода в ней составляло 3,46%, рН водной вытяжки — 5,04. Почву с МФК в первой серии опытов инкубировали в течение 5 суток, во второй серии — 20 суток. В контрольном варианте в почву вносили дистиллированную воду, в опытных вариантах — МФК в концентрациях 5·10-3 и 5·10-4 моль/л. После

инкубации почвенные образцы помещали в чашки Петри, увлажняя до 70% от полной влагоёмкости. На гладкую поверхность почвы раскладывали покровные стёкла, на которых в течение 3 месяцев определяли видовой состав и обилие водорослей.

Наибольшее количество видов водорослей установлено при предварительных длительных сроках инкубации почвы с МФК. На рисунке представлено количество видов, выявленных на 20-е сутки эксперимента. При этом МФК в малых дозах стимулировала развитие водорослей при любых сроках инкубации. По видовому составу в исследованной почве преобладали ЦБ (табл. 5, рис. 1).

Наиболее богатое видовое разнообразие ЦБ отмечено для варианта МФК 5·10<sup>-4</sup> моль/л (инкубация 20 дней). Из Bacillariophyta встречались обычные для региона представители родов Navicula, Hantzschia, Pinnularia. Среди Chlorophyta преобладали виды родов Chlamydomonas и Coccomyxa.

В другой серии опытов установлено, что внесение в почву МФК и глифосата (производное МФК — N-фосфонометилглицин) оказывает значительное воздействие на плотность фототрофных популяций (табл. 6) и на их структуру (табл. 7).

Так, МФК в низкой концентрации (1·10<sup>-3</sup> моль/л) ускоряет ход альгосукцессии в почве, что проявляется в появлении гетероцистных (ГЦ) форм цианобактерий, которые практически не встречаются в других вариантах. Именно сезонное развитие гетероцистных ЦБ

Таблипа 6

Влияние метилфосфоновой кислоты (МФК) и глифосата (ГФ) на численность фототрофных микробных популяций (клеток/см²)

на численность фотогрофных микрооных популяции (клеток/см.)							
Вариант, Водоросли		оросли	Цианобан	Всего			
(моль/л)	зелёные	диатомовые	безгетероцистные	гетероцистные			
Контроль (0)	192±37	92±12	717±62	не обнаруж.	1001±112		
МФК $(1.10^{-3})$	167±37	212±5	1167±22	450±25	1996±89		
МФК $(1.10^{-2})$	142±27	67±12	332±12	не обнаруж.	541±49		
$\Gamma\Phi$ (1·10 <sup>-4</sup> )	82±12	555±25	не обнаруж.	не обнаруж.	637±37		
$\Gamma\Phi (1.10^{-3})$	$457 \pm 22$	450±100	не обнаруж.	не обнаруж.	907±122		

Особенности структуры фототрофных микробных комплексов в условиях загрязнения почвы метилфосфоновой кислотой и глифосатом (%)

Вариант,	оросли	Водоросли	Цианобактерии	
(моль/л)	зелёные	диатомовые		
Контроль (0)	67,4	32,6	28,4	71,6
МФК (1·10 <sup>-3</sup> )	43,9	56,1	19,0	81,0
МФК (1·10-2)	67,9	32,1	38,6	61,4
ГФ (1·10-4)	12,9	87,1	100	0
$\Gamma\Phi (1.10^{-3})$	50,4	49,6	100	0

в нашей зоне и становится завершающей климаксной стадией альго-цианобактериальных сукцессий. При этом в данном варианте наблюдается максимальная суммарная численность водорослей и ЦБ, которая практически в 2 раза превышает аналогичный показатель в контроле. Следовательно, низкие концентрации МФК выступают как стимулятор развития таких групп фототрофов, как диатомеи, а также безгетероцистные и ГЦ формы цианобактерий. Повышение концентрации МФК приводит к угнетению прокариотных водорослей (ЦБ).

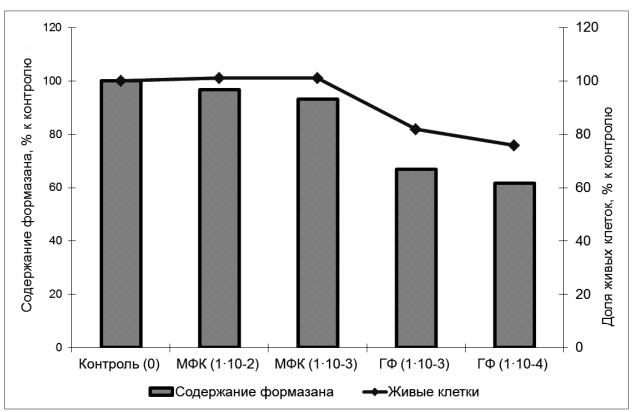
Другое соединение, глифосат (ГФ), на развитие фототрофных группировок действует парадоксальным образом: угнетая развитие водорослей при более низкой концентрации и стимулируя их размножение, по сравнению с контролем, при более высокой концентрации (табл. 6). Особенно ярко стимулирующий эффект проявляется в отношении диатомовых водорослей. Однако ГФ полностью подавляет развитие ЦБ, которые по отношению к самым разным поллютантам обычно выступают в роли наиболее стойких микроорганизмов.

Анализ структуры фототрофных комплексов (табл. 7) показывает широкую вариабельность представительства водорослей и ЦБ в различных вариантах.

Из водорослей в контроле доминируют зелёные, численность которых более чем в 2 раза превышает численность диатомей. При сравнении представительства водорослей и ЦБ видно, что на долю ЦБ приходится более 70% в структуре фототрофных популяций. ЦБ представлены только в контроле и в вариантах с внесением МФК. Причём при малой концентрации МФК численность ЦБ на 10% больше, чем в контроле, а при большой – на 10% меньше. Внесение в почву ГФ полностью тормозит развитие ЦБ. Фототрофные популяции на 100% состоят из водорослей. ГФ в концентрации 1·10-4 моль/л, подавляя развитие зелёных водорослей (табл. 6, 7), стимулирует размножение диатомовых водорослей как в абсолютном количестве (555 кл./см<sup>2</sup> против 92 кл./см<sup>2</sup> в контроле), так и в долевом участии (87,1% против 9,2% в контроле).

Были проведены лабораторные опыты по изучению токсичности водных вытяжек из почв, загрязнённых растворами МФК и ГФ. Окультуренную дерново-подзолистую почву помещали в сосуды и увлажняли растворами МФК и ГФ, время инкубации — 2 недели. Оценивали токсичность вытяжек из почв по жизнеспособности клеток ЦБ Fischerella muscicola.

В качестве признака жизнеспособности клеток ЦБ был выбран фермент дегидроге-



**Рис. 2.** Влияние почвенной вытяжки на жизнеспособность и накопление формазана в клетках *Fischerella muscicola*.

наза, который работает в живых клетках и инактивируется в клетках погибших. В живых клетках при участии фермента дегидрогеназы происходит образование кристаллов формазана красного цвета из бесцветного трифенилтетразолий хлорида. Дегидрогеназную активность клеток ЦБ оценивали тетразольно-топографическим методом [10] и по количественному накоплению формазана в клетках ЦБ [11].

При определении жизнеспособности клеток тетразольно-топографическим методом было установлено, что водные вытяжки из почв, загрязнённых МФК, практически не влияют на жизнеспособность клеток ЦБ (рис. 2). Вытяжки, полученные из почв, загрязнённых ГФ, оказывают токсическое действие на клетки ЦБ, при этом сходные эффекты выявлены в опытах с внесением разных концентраций ГФ (табл. 2).

Одновременно с оценкой жизнеспособности клеток ЦБ Fischerella muscicola тетразольно-топографическим методом было определено количественное накопление формазана в культуре ЦБ. Выявлена тесная корреляция между данными по оценке жизнеспособности клеток ЦБ, полученными разными методами (r=0,99).

Снижение жизнеспособности клеток ЦБ Fischerella muscicola в водных вытяжках, полученных из почв, загрязнённых ГФ, и отсутствие эффекта в вариантах с МФК свидетельствует о большей токсичности ГФ для фототрофных организмов по сравнению с МФК.

Таким образом, в ходе проведённых исследований было установлено, что испытуемые фосфорсодержащие соединения активно влияют на развитие водорослей в почве. Сила и вектор влияния во многом определяются концентрацией веществ.

Под влиянием возрастающих доз ПФ происходит снижение видового разнообразия водорослей и ЦБ во всех исследуемых типах почв, особенно существенное в подзолистых (на 33%) и аллювиальной дерновой (на 27%). Зелёные одноклеточные водоросли Chlamydomonas gloeogama и Chlorella vulgaris выделены среди видов, наиболее толерантных к действию поллютантов во всех почвах. БГЦ из р.р. Phormidium, Plectonema, Leptolyngbya активно развиваются в дерново-подзолистой почве, загрязнённой ПФН, а азотфиксаторы из рода Nostoc — в аллювиальной дерновой.

МФК в концентрации 1·10<sup>-3</sup> моль/л не только стимулирует размножение водорослей,

но также ускоряет ход альгосукцессий, способствуя появлению в структуре популяций ГЦ азотфиксирующих ЦБ. В противоположность МФК, ГФ в целом отрицательно влияет на фототрофные группировки, полностью элиминируя размножение ЦБ, тормозя размножение зелёных водорослей. Внесение ГФ благоприятно для диатомовых водорослей.

Водные вытяжки, полученные из почв, загрязнённых МФК (1·10<sup>-2</sup> и 1·10<sup>-3</sup> моль/л) не влияли на жизнеспособность клеток ЦБ Fischerella muscicola, тогда как в вариантах с ГФ отмечали снижение жизнеспособности клеток ЦБ. Это свидетельствует о большей токсичности для фототрофных организмов производного метилфосфоновой кислоты – глифосата по сравнению с МФК.

Следовательно, ПФН, МФК и ГФ можно считать своеобразными селектирующими агентами в отношении почвенных водорослей и ЦБ. Вследствие этого данные группы фототрофных микроорганизмов можно рассматривать в качестве потенциальных бионидикаторов на загрязнение почвы пирофсфатом натрия, метилфосфоновой кислотой и глифосатом.

### Литература

- 1. Штина Э.А., Голлербах М.М. Экология почвенных водорослей. М.: Наука, 1977. 143 с.
- 2. Домрачева Л.И. «Цветение» почвы и закономерности его развития. Сыктывкар, 2005. 336 с.
- 3. Марфенина О.Е. Антропогенная экология почвенных грибов. М.: Медицина для всех, 2005. 192 с.
- 4. Терехова В.А. Микромицеты в экологической оценке водных и наземных экосистеи. М.: Наука, 2007. 215 с.
- 5. Ашихмина Т.Я., Кондакова Л.В., Домрачева Л.И., Огородникова С.Ю. Метилфосфоновая кислота как регулятор биологических процессов в экологических экосистемах: действие на микроорганизмы, ферментативную активность и высшие растения // Теоретическая и прикладная экология. № 2. 2007. С. 78–87.
- 6. Кондакова Л.В., Огородникова С.Ю., Ашихмина Т.Я., Домрачева Л.И. Влияние метилфосфоновой кислоты на развитие водорослей в почве // Ботанический журнал. 2009. Т. 94. № 1. С. 42–48.
- 8. Ашихмина Т. Я. Комплексный экологический мониторинг объектов хранения и уничтожения химического оружия. Киров: Вятка, 2002. 544 с.
- 9. Савельева Е. И., Зенкевич И. Г., Кузнецова Т. А., Радилов А. С., Пшеничная Г.В. Исследование продук-

тов превращений фосфорорганических отравляющих веществ методом газовой хроматографии — масс-спектрометрии // Российский химический журнал. 2002. Т. 46. № 6. С. 82–91.

10. Домрачева Л.И., Кондакова Л.В., Ашихмина Т.Я., Фокина А.И., Огородникова С.Ю., Олькова А.С. Применение тетразольно-топографического метода определения дегидрогеназной активности цианобактерий в загрязнённых средах // Теоретическая и прикладная экология. 2008. № 2. С. 23–29.

11. Огородникова С.Ю., Домрачева Л. И., Горностаева Е. А., Фокина А. И. Методические подходы к количественному определению формазана в клетках цианобактерий // Актуальные проблемы региональной экологии и биодиагностика живых систем: Материалы XI Всероссийской научно-практической конференции-выставки инновационных экологических проектов с международным участием. (г. Киров, 26–28 ноября 2013 г.). Киров: ООО «Лобань», 2013. С. 48-51.