

УДК 631.46:632.954

**МИКРООРГАНИЗМЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В РАЗЛОЖЕНИИ ГЕРБИЦИДОВ,
ПРОИЗВОДНЫХ СИММ-ТРИАЗИНОВ, В ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ
ПОЧВЕ**

В. Т. ЕМЦЕВ, Е. З. ТЕППЕР, К. С. ТЛАС ФАРЗАТ, Е. Н. МАКСИМОВА
(Кафедра микробиологии)

Одно из первых мест по объему производства гербицидов занимают триазины (атразин и симазин), широко применяющиеся при выращивании кукурузы, сорго, проса, плодов и овощей. Остатки триазинов могут довольно долго (до 18 мес) сохраняться в почве и причинять существенный

вред последующим культурам [5]. В связи с этим необходимо изыскивать пути снижения фитотоксичности, а также разложения гербицидов, в том числе и триазинов, в почве.

В литературе указывается [3], что фитотоксичность гербицидов значительно сни-

жается при внесении различных органических добавок (листьев и стеблей кукурузы, соломы, сидератов) в почву. Предполагается [3], что одним из факторов детоксикации гербицидов может быть биохимическая активность полифенолоксидаз, находящихся в большом количестве в растительных остатках (листьях, стеблях) кукурузы. Таким фактором может быть и способность гербицидов вступать в комплексные соединения с органическими веществами почвы [2].

В литературе имеются также сведения о влиянии почвенных микроорганизмов на деградацию гербицидов. Так, отмечается большая роль почвенных микроорганизмов: грибов, некоторых бактерий и актиномицетов *Streptomyces* — в разложении триазинов (симазина и атразина) [1, 5, 6, 10]. Из грибов приводятся представители родов *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geothrichum*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, из бактерий — *Achromobacter*, *Bacterium*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*. В детоксикации симазина могут принимать участие и микроскопические водоросли [4].

В большинстве приведенных работ были выделены чистые культуры микроорганизмов из почвы, обогащенной гербицидами, и испытывалась их способность разлагать последние или изучалась способность музейных культур ассилировать симазин и атразин.

В опытах, проведенных одним из авторов данной статьи (К. С. Тлас Фарзат) в 1980 г., установлено, что органические добавки снижают фитотоксичность использованных гербицидов. Особенно эффективным было добавление гумата натрия из торфа, снизившего депрессивное действие на 50 %. При добавлении порошка из листьев и стеблей кукурузы фитотоксичность уменьшилась на 35 %.

В задачу наших исследований входило изучить действие триазинов на микрофлору почвы и выявить микроорганизмы, разлагающие эти гербициды в элективных условиях среды (в присутствии всей почвенной микрофлоры).

Объекты и методы

В первом лабораторном опыте дерново-подзолистая почва компостировалась в сосудах емкостью 250 мл при влажности 60 % ПВ. Схема опыта: 1-й вариант — почва без препарата (контроль); 2-й — почва + 10-кратная производственная доза препарата (атразина или симазина); 3-й — почва + 25-кратная доза; 4-й — почва + 50-кратная доза; 5-й — почва + 100-кратная доза препарата. Сосуды выдерживали при температуре 28 °.

Через 40 дней компостиования проводили посевы на мясо-пептонном агаре (МПА), крахмально-аммиачном (КАА) и нитритном агаре (НА). На последней среде наряду с другими микроорганизмами была выявлена микрофлора автохтонной группы, минерализующая гумусовые вещества [7]. В связи с резким снижением общей численности

микроорганизмов на первых двух средах под влиянием всех доз триазинов проведен повторный анализ через 105 дней инкубации.

Для выявления наиболее конкурентоспособных почвенных микроорганизмов, ассилирующих триазины, нами был поставлен второй лабораторный опыт по методу Н. С. Виноградского на гелевых пластинах в элективных условиях среды.

Отмытые от следов хлора и прокипяченные гелевые пластины пропитывали 3 мл минеральной среды следующего состава (в г на 200 мл дистиллированной воды): K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; $NaCl$ — 0,5; $FeSO_4$ — 0,01; $MnSO_4$ — 0,01; $CaCO_3$ — 5,0. В каждую чашку добавляли по 1 мл раствора симазина или атразина из расчета 2; 5; 10 и 20 мг д. в. и 1 мл почвенной суспензии в разведении 10^{-2} . Все растворы, внесенные в чашку, были тщательно перемешаны, затем подсушены (при температуре 40—45 °) до образования глянцевой поверхности, для инкубации чашки помешали во влажную камеру и выдерживали в термостате при температуре 28 °.

После 6-месячной инкубации опыт на гелевых пластинах был снят. Перед определением остаточного количества симазина и атразина чашки просматривали под микроскопом при $\times 30$ и $\times 80$, затем в одной из параллельных чашек были сделаны реплики микроорганизмов, развившихся на чашках с той или иной концентрацией гербицида, по методу Е. З. Теппер [8]. Суть данного метода заключается в следующем: с одного края чашки, в которой прошел тот или иной процесс, осторожно наливают дистиллированную воду, при этом бактерии с поверхности гелевых пластин поднимаются к поверхности воды; если к последней прикоснуться чистым обезжиренным предметным стеклом, на нем останется отпечаток (реплика) микроорганизмов, получивших развитие на геле. Исключение составляет мицелий актиномицетов и микромоноспор, которые врастают в гель. После фиксации и окраски препарата на нем хорошо просматриваются микробные пейзажи в иммерсионной системе микроскопа.

Определение остаточных количеств симазина и атразина проводилось методом тонкослойной хроматографии.

Результаты исследований и их обсуждение

Через 40 дней инкубации под влиянием всех доз симазина общая численность микроорганизмов, учитываемых на МПА, резко снизилась (табл. 1). При 10-кратной дозе она составила 22 %, в остальных вариантах — 6,9—7,5 % к контролю. Аналогичное влияние симазин оказывало и на группу, учитываемую на КАА, в том числе и на относительное содержание актиномицетов. При 10-кратной дозе препарата общая численность этих микроорганизмов составила только 16 % к контролю, при 100-кратной — 8 %.

Через 105 дней инкубации общая численность микроорганизмов в вариантах с си-

Таблица 1

**Численность микроорганизмов и их групповой состав в компостах с симазином
через 40 (числитель) и 105 (знаменатель) дней инкубации**

Показатель	Вариант				
	1 (контроль)	2	3	4	5
На МПА:					
всего, тыс. на 1 г абсолютно сухой почвы	18 354 <u>4533</u>	3973 <u>2064</u>	1269 <u>1727</u>	1377 <u>2161</u>	1214 <u>2322</u>
в т. ч. споронос- ные, %	Не опр. <u>14</u>	Не опр. <u>79</u>	Не опр. <u>70</u>	Не опр. <u>76</u>	Не опр. <u>72</u>
На КАА:					
всего, тыс. на 1 г абсолютно сухой почвы	16 758 <u>2115</u>	2606 <u>1334</u>	Не опр. <u>1224</u>	Не опр. <u>1218</u>	1399 <u>1456</u>
в т. ч. актиномицеты, %	8 <u>17</u>	5 <u>26</u>	Не опр. <u>17</u>	Не опр. <u>16</u>	Не опр. <u>20</u>
На НА (через 40 дней):					
всего, тыс. на 1 г або- лютно сухой почвы	19 920	4857	11 458	1158	2891
в т. ч., %:					
<i>Mycobacterium</i>	86	77	43	15	5
<i>Arthrobacter</i>	1,3	10	14	26	50
<i>Nocardia</i>	Не обн.	0,2	2,6	17	2,3
<i>Micromonospora</i>	Не обн.	Не обн.	Не обн.	2,3	4,0

мазином значительно возросла. Содержание микроорганизмов, учитываемых на МПА, составило уже от 38 до 51 % к контролю, причем их количество возросло в основном за счет спороносных форм — 70—79 % общей численности в вариантах с симазином, тогда как в контроле — лишь 14 %. Высокое содержание спороносных форм в компостах с симазином, возможно, связано с тем, что оставшиеся через 40 дней жизнеспособные зародыши в основном представляли собой спороносные формы в состоянии спор. По мере детоксикации к этому сроку общая численность микроорганизмов, учитываемых на КАА, еще более возросла. В вариантах с симазином содержание их уже колебалось от 58 до 59 % к контролю. По сравнению с предыдущим сроком в этих вариантах несколько увеличилось и относительное содержание актиномицетов. При 10-кратной дозе их количество заметно превысило контроль, в остальных вариантах оно мало отличалось от контроля.

Общая численность микроорганизмов, учитываемых на НА, через 40 дней инкубации в компостах с симазином также снизилась по сравнению с контролем, но не в строгом соответствии с увеличением его доз, как при учете на МПА и КАА (табл. 1). Так, при 10-кратной дозе симазина общая численность микроорганизмов на НА составила лишь 24 % к контролю, а в вариантах с 25- и 50-кратными дозами — 58 %. Такое действие препарата на общую численность микроорганизмов, видимо, обусловлено неодинаковым влиянием его доз на групповой состав. Так, численность *Mu-*

cobacterium по мере увеличения дозы симазина снижалась до 15 и 5 % против 86 % в контроле, а содержание *Arthrobacter* возросло до 50 % против 1,3 % в контроле. Группа *Nocardia* в контролльном варианте отсутствовала, но в компостах с симазином она была обнаружена; при дозах препарата 50 и 100 количество данных микроорганизмов составило 17 и 20 %. В этих же вариантах были выявлены и микромоноспоры.

В компостах с более низкими дозами симазина превалировали *Mycobacterium*, образующие выпуклые розоватые колонии с резко очерченным краем, в компостах с более высокими дозами препарата — плоские шероховатые колонии с выпуклым центром и мелкомицелиальным (кружевным) ободком *Arthrobacter* (рис. 1, а). Из группы *Nocardia* в вариантах с симазином преобладали сероватые колонии с хорошо выраженной мицелиальной зоной (рис. 1, б). Микромоноспоры, выявленные в вариантах с симазином, образовывали колонии, мицелий которых врастал в агар, а слизистые комочки (образования) желтовато-бурового цвета со спорами располагались на поверхности агара в центре и кольцеобразно вокруг него (рис. 1, в).

В компостах с атразином, как и с симазином, численность микроорганизмов, учитываемых на МПА и КАА, через 40 дней инкубации (табл. 3) резко снизилась. При учете на МПА их количество составило 13—10 % к контролю, а при учете на КАА в варианте с 10-кратной дозой — 47 %, в остальных вариантах — 7—12 %.

Через 105 дней инкубации общая численность микроорганизмов, учитываемых на

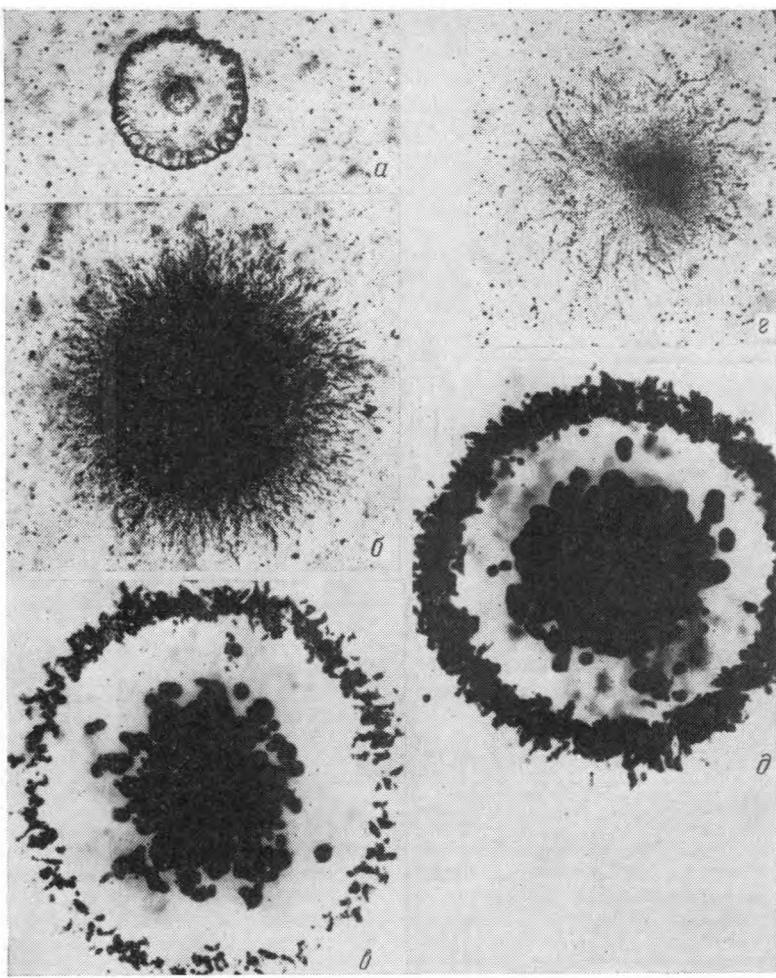


Рис. 1. Колонии микроорганизмов, выявленных на НА при посеве суспензии из компостов с симазином и атразином, через 40 дней инкубации.

a, b, c — соответственно колонии *Arthrobacter*, *Nocardia* и *Micromonospora* в вариантах с симазином (ув. 150); *d* — соответственно колонии *Nocardia* и микромоноспор в вариантах с атразином (ув. 150).

МПА и КАА, видимо, в результате частичной детоксикации гербицида меньше изменилась, чем в предыдущий срок, особенно при учете на МПА. Количество последних в вариантах с атразином составило уже 76—90 % к контролю, а при 10-кратной дозе даже превысило его. При этом относительное содержание спороносных форм в отличие от компостов с симазином было близко к контролю. В значительно меньшей мере относительно контроля изменилась численность микроорганизмов, учитываемых на КАА, составив в вариантах с атразином 38—58 %. Отмечена тенденция к увеличению доли актиномицетов в общем их количестве при высоких дозах атразина.

Общая численность микроорганизмов, учитываемых на НА, через 40 дней инкубации в вариантах с атразином также снижалась по сравнению с контролем (табл. 2), но характер снижения был иной, нежели при учете на МПА и КАА.

Последнее также объясняется изменением группового состава микрофлоры под действием атразина. Так, количество микроорганизмов *Mycobacterium* в контроле составило 49 %, в вариантах с атразином оно колебалось от 22 до 7 %, *Arthrobacter* в контроле — 12 %, в компостах с атразином — 49—62 %. При 10- и 25-кратной дозах препарата резко возрастила численность *Nocardia*, а по мере увеличения дозы атразина — и относительное содержание микромоноспор.

В компостах с атразином наряду с колониями *Arthrobacter*, выявленными на НА в компостах с симазином (рис. 1, *a*), были обнаружены формы, образующие мелкие белые и темноватые мажущиеся колонии с мелкомицелиальным ободком. В этих компостах преобладали почти бесцветные слипистые колонии *Nocardia*, отличающиеся по культуральным признакам от нокардий в вариантах с симазином (рис. 1, *c*). Преоб-

Численность микроорганизмов и их групповой состав в компостах с атразином
через 40 (числитель) и 105 (знаменатель) дней инкубации

Показатель	Вариант				
	1 (контроль)	2	3	4	5
На МПА:					
всего, тыс. на 1 г					
абсолютно сухой почвы	12 784 2814	1659 3192	1357 2142	1356 2541	1290 2331
в т. ч. спороносные, %	Не опр. 15	Не опр. 18	Не опр. 14	Не опр. 18	Не опр. 21
На КАА:					
всего, тыс. на 1 г					
абсолютно сухой почвы	4842 4704	2285 2772	479 1785	559 2394	361 2184
в т. ч. актиномицеты, %	Не опр. 8	Не опр. 11	Не опр. 9	Не опр. 15	Не опр. 13
На НА (через 40 дней):					
всего, тыс. на 1 г					
абсолютно сухой почвы	32 612	11 898	3691	16 306	11 960
в т. ч., %:					
<i>Mycobacterium</i>	49	22	7	15	12
<i>Arthrobacter</i>	12	53	49	62	59
<i>Nocardia</i>	6	14	31	8	9
<i>Micromonospora</i>	0.8	7	7	11	14

ладающие колонии микромоноспор также отличались от колоний на симазине темно-бурый, почти черной окраской слизистых образований со спорами (рис. 1, д).

Таким образом, к симазину и атразину очень чувствительны микроорганизмы, учитываемые на МПА и КАА. При учете на НА чувствительными к высоким дозам триазинов оказались микробактерии. Под влиянием симазина и атразина особенно активизировалась группа *Arthrobacter*, затем группа *Nocardia* и *Micromonospora*.

При просмотре чашек со всеми концентрациями симазина и атразина наблюдалась желтовато-бурые и темно-бурые компактные колонии микромоноспор (рис. 2, е и рис. 3, е).

В вариантах с 2 и 5 мг и очень редко с 10 мг симазина и атразина на поверхности геля просматривались едва заметные колонии в виде желтоватых или буроватых пятен. При концентрации 20 мг триазинов обнаружены только колонии отмеченных выше микромоноспор.

Изучение микробных пейзажей показало, что в чашках с симазином в концентрации 2 мг очень часто встречаются фрагментированные гифы, палочковидные и кокковидные фрагменты нокардий (рис. 2, а), скопления палочек, кокков, защелкивающиеся формы, характерные для *Arthrobacter* (рис. 3, б), и обрывки пленок типа *Bactoderm*. В отличие от вариантов с симазином при концентрации атразина 10 мг несколько реже, чем при концентрациях 2 и 5 мг, встречаются палочковидные клетки, соединенные в пленку типа *Bactoderm* (рис. 3, в), и обрывки септированных гифов нокардий. Микробный пейзаж при концентрации атразина 20 мг оказался таким же, как и при той же концентрации симазина.

Септированные гифы, палочковидные и кокковидные фрагменты *Nocardia* (рис. 2, д), имеются также обрывки пленок типа *Bactoderm*. Однако в этом варианте обсемененность указанными микроорганизмами несколько ниже, чем при 2 мг симазина.

В микробном пейзаже из чашки с 10 мг симазина в основном просматриваются очень мелкие споры микромоноспор и изредка септированные гифы нокардий, в чашках с 20 мг препарата — только разбросанные очень мелкие (едва заметные) отдельные споры микромоноспор или соединенные слизью в конгломераты.

При изучении микробных пейзажей на гелевых пластинах с атразином получена аналогичная картина. В чашках с 2 и 5 мг препарата также часто встречаются септированные гифы, палочковидные фрагменты *Nocardia* (рис. 3, а), скопления палочек и кокков, защелкивающиеся формы, характерные для *Arthrobacter* (рис. 3, б), и обрывки пленок типа *Bactoderm*. В отличие от вариантов с симазином при концентрации атразина 10 мг несколько реже, чем при концентрациях 2 и 5 мг, встречаются палочковидные клетки, соединенные в пленку типа *Bactoderm* (рис. 3, в), и обрывки септированных гифов нокардий. Микробный пейзаж при концентрации атразина 20 мг оказался таким же, как и при той же концентрации симазина.

Итак, просмотр под микроскопом гелевых пластин с триазинами после 6-месячной инкубации и изучение микробных пейзажей в чашках с разными концентрациями симазина и атразина показали, что те

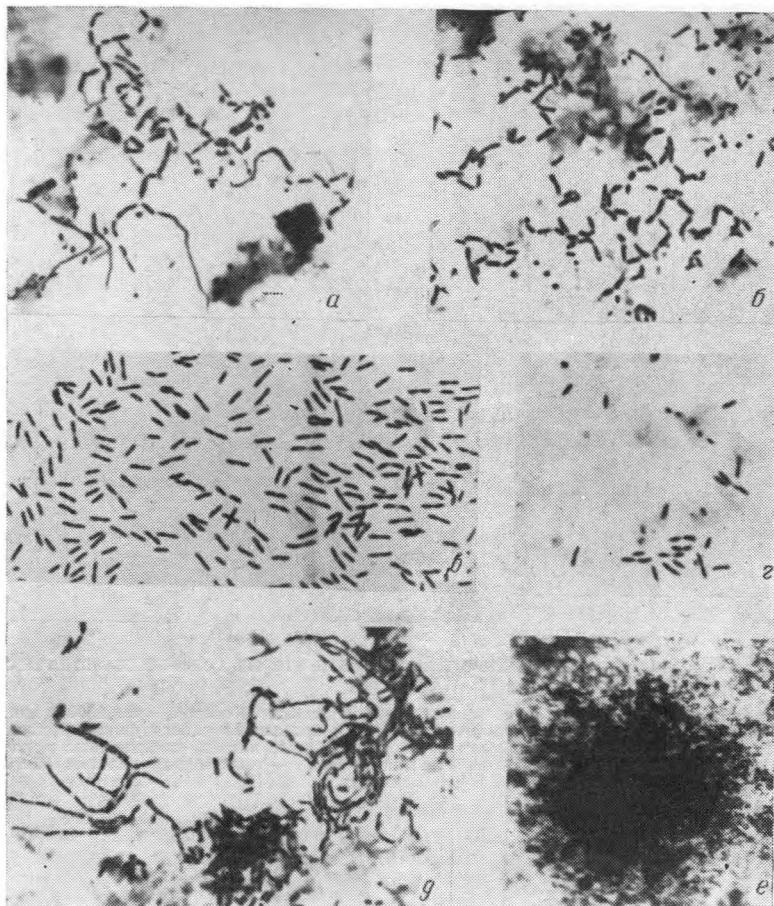


Рис. 2. Колонии и микробные пейзажи в опыте на гелевых пластинах с симазином.

a — септированные нити, палочковидные и кокковидные фрагменты *Nocardia* (ув. 1500), концентрация 2 мг; *б* — скопление палочек, кокков и защелкивающиеся формы *Arthrobacter* (ув. 1500), концентрация 2 мг; *в* и *г* — соответственно палочковидная стадия и стадия образования кокковых форм *Arthrobacter* (ув. 1500), концентрация 5 мг; *д* — септированные гифы, палочковидные и кокковидные фрагменты *Nocardia* (ув. 1500), концентрация 5 мг; *е* — желтовато-бурая колония *Micromonospora* (ув. 150), концентрация 20 мг.

группы микроорганизмов (*Arthrobacter*, *Nocardia*, *Micromonospora*), которые активизировались в почвенных компостах с триазинами, в элективных условиях среды на гелевых пластинах (где также обнаружены бактерии группы *Bacillus*), проявили себя наиболее конкурентоспособными. Последнее не говорит о том, что чистые культуры других микроорганизмов, указанных выше [1, 4, 5, 6, 10], способны принимать участие в разложении триазинов.

Следует отметить, что ассоциация микроорганизмов, проявившая способность ассимилировать триазины, оказалась причастной и к минерализации гумусовых веществ [7].

Для определения интенсивности разложения симазина и атразина за 6 мес инкубации под воздействием развившейся микрофлоры гелевые пластины с остаточным количеством гербицида подвергались химическому анализу.

Из данных табл. 3 видно, что триазины даже в оптимальных условиях среды разлагаются очень медленно, особенно атразин.

Суммируя результаты опытов, можно прийти к заключению, что испытанные триазины резко подавляют микрофлору, учтываемую на МПА и КАА, и даже через 3 мес при частичной детоксикации препаратов численность этой микрофлоры, как правило, составляет лишь около 50—60 % к контролю. Микробактерии оказались чувствительны к более высоким концентрациям симазина и атразина.

Микроорганизмы родов *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Micromonospora* активизировались при внесении в почву симазина и атразина и проявили способность в элективных условиях среды использовать их как единственный источник углеродного и азотного питания.

Возможно, что наиболее эффективное действие органической добавки в виде гу-

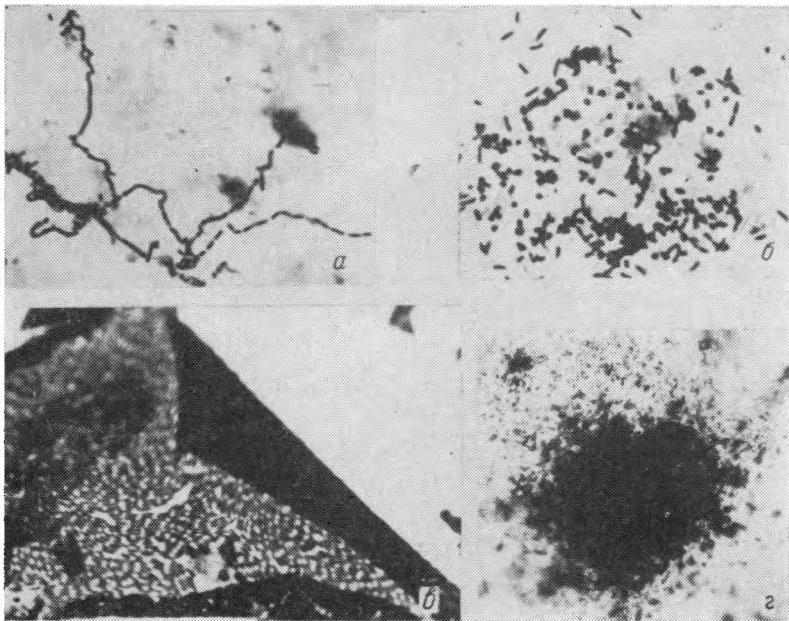


Рис. 3. Колонии и микробные пейзажи в опыте на гелевых пластинах с атразином.

a — септированные гифы и палочковидные фрагменты *Nocardia* (ув. 1500), концентрация 2 мг; *б* — скопление палочек, кокков и защелкивающиеся формы *Arthrobacter* (ув. 1500), концентрация 2 мг; *в* — палочковидные клетки, соединенные в пленки типа *Bactodermella* (ув. 1500), концентрация 10 мг; *г* — темно-бурая колония *Micromonospora* (ув. 150), преобладающая при концентрации 20 мг.

маты натрия связано с активацией автохтонной группы, разлагающей гумусовые вещества, которая также причастна к разложению атразина и симазина.

Таблица 3

Содержание симазина и атразина в гелевых пластинах после 6 мес. инкубации

Первоначальное содержание гербицида, мг на чашку	Симазин		Атразин		Разложилось в среднем, %	
	мг	% от исходного	мг	% от исходного	симазин	атразин
2	0,12	6	0,36	18,2	92,0	81,8
	0,20	10	0,36	18,2		
5	0,42	8,4	1,6	32,0	92,6	68,0
	0,32	6,4	1,6	32,0		
10	0,72	7,2	2,64	26,4	92,8	74,8
	0,72	7,2	2,40	24,0		
20	5,80	29	6,0	30,0	74,5	70,0
	4,40	22	6,0	30,0		

Заключение

Опыт по компостированию дерново-подзолистой почвы с симазином и атразином в разных дозах показал, что микрофлора, учитываемая на МПА и КАА, под воздействием этих гербицидов подавляется. По мере повышения концентрации гербицидов увеличивалось относительное содержание

микроорганизмов, учитываемых на НА: *Arthrobacter*, *Nocardia* и *Micromonospora*.

Анализ микробных пейзажей на гелевых пластинах, в которых триазины служили единственным источником углерода и азота, подтвердил высокую способность этих же групп, а также группы *Bactodermella* асимилировать симазин и атразин в почве.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абедель Монети. Взаимодействие микрофлоры почвы и пестицидов атразина, базудина и ТМТД. — Автореф. канд. дис. Л., 1981. — 2. Круглов Ю. В., Масленникова В. Г. Разложение и распределение симазина (^{14}C) в почве. — Агрони-

мия, 1975, № 6, с. 112—115. — 3. Круглов Ю. В., Масленникова В. Г. Влияние растительных остатков на детоксикацию симазина в почве. — Химия в сельск. хозяйстве, 1976, № 7, с. 53—55. — 4. Круглов Ю. В., Пароменская Л. Н. Детоксикация симазина микроскопическими водорослями. — Микробиология, 1970, № 1, с. 157—160. — 5. Самгин П. А. Инактивация и передвижение триазиновых гербицидов в почве. Обзор. М.: ВНИИТЭИСХ, 1975. — 6. Масленникова В. Г., Круглов Ю. В. Разложение симазина (^{14}C) в культуре *Aspergillus fumigatus*.

Бюл. ВНИИСХ, 1970, № 14, вып. 4, с. 32—34. — 7. Теппер Е. З. Микроорганизмы рода *Nocardia* и разложение гумуса. М.: Наука, 1976. — 8. Теппер Е. З., Шильникова В. К., Переображенова Г. И. Практикум по микробиологии. М.: Колос, 1972, 1979. — 9. Kaufman D. D., Wake J. — Soil Biol. a. Bioch., 1970, vol. 2, N 2, p. 73—80. — 10. Kaufman D. D., Kearney P. C. — J. Residue Rev., 1970, vol. 32, p. 235—265.

Статья поступила 3 мая 1982 г.

SUMMARY

Experiment on composting soddy-podzolic soil with simazine and atrazine in different doses showed that microflora counted on MPA and SAA was suppressed under the influence of these herbicides with the increasing of herbicides' concentration the relative content of microorganism groups counted on nitrate agar: *Arthrobacter*, *Nocardia* and *Microomonospora* also increased.

Microbe analyses of views on gel plates in which triazines served as the only source of carbon and nitrogen confirmed the high ability of these microorganisms' groups as well as the group *Bactoderma* to assimilate simazine and atrazine in the soil.