

объектов по уничтожению химического оружия: сб. ст. Всеросс. науч.-прак. конф., Пенза, май 2007 г. С. 123-129.

13. Ильин В.Ю., Золина Н.Ф., Курмаева Н.М. Млекопитающие зоны защитных мероприятий объекта по уничтожению химического оружия в Пензенской области // Мониторинг природных экосистем в зонах защитных мероприятий объектов по уничтожению химического оружия: сб.ст. Всеросс. науч.-прак. конф., Пенза, май 2007 г. Пенза, 2007. С. 69-71.

14. Гилева Э.А., Косарева Н.Л., Любашевский Н.М., Бахтиярова М.Ф. Изменчивость частоты хромосомных нарушений, индуцированных антропо-

генными поллютантами, у домовых мыши из Гиссарской долины // Экология, №1, 1993. С. 62-70.

15. Дмитриев С.Г. Цитогенетическая нестабильность у трёх видов грызунов в районе химического предприятия на севере России // Экология, №6, 1997. С. 447-451.

16. Графодатский А.С. Раджабли С.И. Хромосомы сельскохозяйственных и лабораторных млекопитающих // Атлас. Новосибирск, Наука, 1988. 128 с.

17. Боряев, Г.И. Методика определения влияния загрязнения окружающей среды на иммунобиологический статус животных // Экологические проблемы наследия «холодной войны» и пути их преодоления. Мат-лы междунар. конф., Пенза, июнь 2003 г. Пенза, 2004. С. 16-20.

УДК 631.466.3:631.453

Метилфосфоновая кислота как регулятор биологических процессов в экологических системах: действие на микроорганизмы, ферментативную активность и высшие растения

© 2007. Т.Я. Ашихмина, Л.В. Кондакова, Л.И. Домрачева, С.Ю. Огородникова
Институт биологии Коми НЦ УрО РАН

Показано, что под влиянием метилфосфоновой кислоты (МФК) происходит изменение в численности, видовом и групповом составе фототрофных микробных комплексов почвы, а также изменяется популяционная и видовая плотность природных биоплёнок *Nostoc commune*. Обсуждается возможность использования цианобактерий для биотестирования на содержание МФК с помощью тетразольно-топографического метода. Доказана неоднозначность действия МФК на всхожесть и линейные размеры проростков различных сельскохозяйственных культур.

It is shown that under the influence of methylphosphonic acid (MPA) there take place some changes in the quantity, species and group composition of phototrophic microbe soil complexes as well as in the population and species density of natural *Nostoc commune* bio-films. The possibility of using cyanobacteria in bio-testing of MPA content using tetrasole-topographic method is discussed. The ambiguity of MPA influence on germination and linear size of the seedlings of different agricultures is proved

Проблема безопасного для окружающей среды уничтожения химического оружия сохраняет свою актуальность в течение всего периода эксплуатации объектов уничтожения химического оружия. В связи с этим на каждом этапе эксплуатации объекта и уничтожения различных специфических отравляющих веществ возрастает необходимость проведения исследований по изучению воздействия их на живые организмы и разработке и внедрению новых методов мониторинга природной среды. Этим целям подчинены исследования, проводимые в лаборатории биомониторинга Института биологии Коми НЦ УрО РАН и ВятГГУ, созданной в 1990 г. Лаборатория, в частности, специализируется на

разработке методов мониторинга природной среды и объектов, в том числе выполняются научно-исследовательские работы по изучению воздействия поллютантов (ТМ, мышьяка, метилфосфоновой кислоты, пиррофосфатов) на различные компоненты природной среды. Используя диапазоны концентраций этих соединений в природной среде и модельных опытах (*in vivo* и *in vitro*), определяют порог толерантности к ним организмов разной систематической принадлежности. В данной работе исследования проводились с метилфосфоновой кислотой (МФК), которая является конечным продуктом гидролиза и универсальным маркером фосфорорганических отравляющих веществ. Это кристалли-

ческое вещество с температурой плавления 104-106°C. По химическим свойствам – кислота средней силы, хорошо растворимая в воде [1]. МФК устойчива в природных условиях и сохраняется в почве десятилетиями [2]. Установлено, что при попадании в окружающую среду МФК уже в низких концентрациях оказывает влияние на жизнедеятельность растений [3]. Имеются сведения о том, какие эффекты может оказать МФК на почвенную микробиоту. Так, при изучении динамики численности микроорганизмов в южных чернозёмах под влиянием МФК выявлено, что разные виды почвенных микроорганизмов ведут себя неодинаково. Бактерии и их мицелиальные формы (актиномицеты) сначала резко подавляются МФК (на 60-70%), но к 30-му дню наблюдения увеличивают свою численность примерно в 1,5 раза [4]. Такое несколько парадоксальное действие МФК на численность микроорганизмов авторы объясняют тем, что при взаимодействии микробиоты с МФК в почве, возможно, происходит биотрансформация и биodeградация этого соединения. Действительно, выявлены микроорганизмы, которые гидролизуют связь С-Р [5, 6]. Ряд микроорганизмов использует метилфосфонаты в качестве единственного источника фосфора [7]. В лабораторных опытах выявлено, что бактерии *Bacillus sp.* и *Pseudomonas sp.* вызывают биodeградацию фосфорорганических загрязняющих веществ. Это свойство микроорганизмов лежит в основе биотехнологического подхода к утилизации токсичных соединений. Однако, кроме сапротрофов, почва обильно заселена фототрофными микроорганизмами – представителями различных отделов водорослей и цианобактерий. Являясь первичными продуцентами почвенных биоценозов, эти организмы играют значительную роль в протекании всех микробиологических процессов в почве. Многократно обсуждалась роль почвенных водорослей как одних из наиболее экспрессных и чувствительных индикаторов на химическое загрязнение почвы [8]. Между тем практически отсутствуют сведения о реакции водорослей на МФК, попадание которой в почву возможно при работе объектов по уничтожению химического оружия и/или при аварийных ситуациях.

Целью работы было изучить реакцию микрофототрофов, как обитающих в почве, так и образующих наземные биоплёнки, на воздействие разных концентраций МФК, а

также сравнить чувствительность различных сельскохозяйственных растений к данному токсиканту. Разработать метод тестирования содержания МФК в окружающей среде с использованием цианобактерий.

Материалы и методы

Для изучения влияния МФК на фототрофный микробный комплекс использовали пахотную дерново-подзолистую средне-суглинистую почву, наиболее распространённую в Кировской области на территории строящегося объекта по уничтожению отравляющих веществ. Почву отбирали с глубины 0-10 см. Содержание органического углерода в ней составляло 3,46%, рН водной вытяжки – 5,04. Почву в 1-й серии опытов инкубировали с МФК в течение 5 дней, во 2-й серии – 20 дней. В контрольном варианте в почву вносили дистиллированную воду, в опытных вариантах – МФК в концентрациях $5 \cdot 10^{-3}$ и $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. После инкубации почвенные образцы помещали в чашки Петри, увлажняя до 70% от полной влагоёмкости. Поверхность почвы выравнивали и на гладкую поверхность раскладывали покровные стекла обрастания. В течение 3 месяцев определяли видовой состав альгофлоры. Количественный учёт различных групп водорослей проводили прямым микроскопическим методом на 6, 12, 20 и 41 сутки альгосукцессии. При количественном учёте просматривали 600 полей зрения на 4-х покровных стёклах. Обработку результатов проводили по стандартным статистическим программам.

Для изучения влияния МФК на природные биоплёнки использовали корочки *Nostoc commune*, собранные в октябре 2006 г. вдоль обочины шоссе на окраине г. Дзержинска Нижегородской области, который является одним из экологически неблагополучных городов России. Изучение альго-цианобактериальной микрофлоры проводили путём прямого микроскопирования в сочетании с методами чашечных и водных культур [9]. Численность микрофототрофов и длину грибного мицелия учитывали на мазках методом прямого микроскопирования [10].

Опыты по влиянию МФК на биоплёнки были проведены с использованием стерильного промытого речного песка, помещённого в чашки Петри (30 г). В каждую чашку вносили по 0,5 г воздушно сухих плёнок *N. commune*. В контрольном варианте песок в чашках увлажняли дистиллированной водой. В опытных ва-

риантах – МФК в концентрациях 10^{-4} и 10^{-3} моль/л. Через 4 месяца после постановки опыта изучали качественный и количественный состав фототрофных комплексов, которые развились на поверхности песка вследствие миграции микроорганизмов из биоплёнок.

При изучении влияния МФК на высшие растения тестируемыми культурами были яровая пшеница сорта Иргина, кормовой горох пелюшка сорта Надежда и горчица посевная. Опыт проводили в чашках Петри в 3-кратной повторности. Семена пшеницы и пелюшки отбирали в количестве 50 штук на повторность, горчицы – 100 штук. Семена концентрическими кругами раскладывали на фильтровальной бумаге, МФК вносили в чашки в виде растворов. В вариантах с *N. commune* по 0,5 г плёнок размачивали в воде в течение суток и вносили в чашки перед закладыванием семян.

В динамике в течение 3-х дней определяли всхожесть. Опыты снимали на третьи сутки, определяя длину корней и проростков.

Результаты и их обсуждение

Наиболее полное видовое обилие водорослей выявлено при предварительных длительных сроках инкубации почвы с МФК (рис. 1).

При этом МФК в малых дозах ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) стимулирует реализацию видового потенциала водорослей при любых сроках инкубации. По видовому разнообразию в исследованной

почве преобладают представители *Cyanophyta*. Особенно многочисленны представители родов *Phormidium* и *Leptolyngbya* (табл. 1).

Наибольшее видовое разнообразие *Cyanophyta* характерно для варианта МФК $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л (инкубация 20 дней). Для *Bacillariophyta* характерны типичные представители родов *Navicula*, *Hantzschia*, *Pinnularia*. Среди *Chlorophyta* преобладают роды *Chlamydomonas* и *Coccomyxa*. Совсем не встречаются представители отдела *Xanthophyta*. Согласно литературным данным [8] и нашим наблюдениям, жёлтозелёные водоросли наиболее чувствительны к загрязнению, их отсутствие указывает на токсичность почвы.

При прямом микроскопическом учёте развитие водорослей на поверхности почвы впервые удалось зафиксировать на 6-е сутки сукцессии. Поверхностная альгофлора была представлена только одноклеточными зелёными водорослями, численность которых была очень невелика и колебалась от 6 до 87 клеток/см². На 12-е сутки сукцессии численность клеток одноклеточных *Chlorophyta* возрастает до 40-94 на 1 см², в контрольном варианте появляются единичные клетки диатомей. Инкубирование почвы с МФК стимулирует размножение безгетероцистных форм *Cyanophyta*, а длительное предварительное инкубирование почвы с МФК в обеих концентрациях стимулирует размножение гетероцистных форм *Cyanophyta* (125 клеток/см² при концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ и 1294 клетки/см² при $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л МФК).

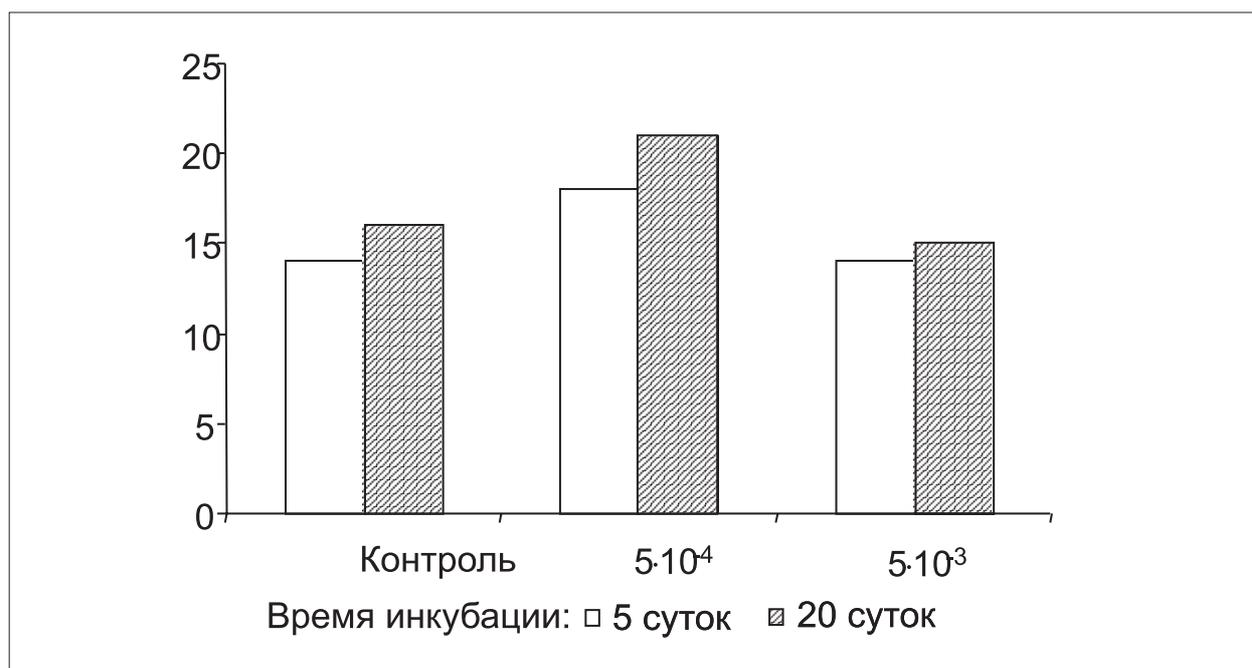


Рис. 1. Влияние метилфосфоновой кислоты на количество видов в альгогруппировках. (По оси абсцисс – концентрация (моль/л) МФК, по оси ординат – количество видов)

Таблица 1

Влияние МФК (моль/л) на видовой состав водорослей дерново-подзолистой почвы на завершающей стадии сукцессии

Вид	Варианты опыта					
	5 дней предварительной инкубации			20 дней предварительной инкубации		
	Кон-троль	МФК $5 \cdot 10^{-4}$	МФК $5 \cdot 10^{-3}$	Кон-троль	МФК $5 \cdot 10^{-4}$	МФК $5 \cdot 10^{-3}$
Суанопхита						
<i>Anabaena cylindrica</i> Lemm.					+	
<i>A. sphaerica</i> Born. et Flah. f. <i>conoidea</i> Elenk.					+	+
<i>Calothrix brevissima</i> G. S. West	+	+	+			
<i>C. elenkii</i> Kossinsk.	+	+	+	+	+	+
<i>Cylindrospermum muscicola</i> Kütz.	+			+		
<i>Leptolyngbya foveolarum</i> [Rabenh. ex Gom.] Anagn. et Kom.	+	+	+	+	+	+
<i>L. fragilis</i> [Gom.] Anagn. et Kom.					+	+
<i>Nostoc. linckia</i> [Roth] Born. et Flah. f. <i>muscorum</i> [Ag.] Elenk.	+	+	+	+	+	+
<i>N. linckia</i> [Roth] Born. et Flah.		+	+		+	+
<i>N. punctiforme</i> [Kütz.] Hariot	+	+	+	+	+	+
<i>N. paludosum</i> Kütz.	+	+	+	+	+	+
<i>Phormidium autumnale</i> [Ag.] Trevisan ex gom.		+				
<i>P. henningsii</i> Lemm.	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudanabaena papillaterminata</i> [Kissel.] Kuk						+
<i>P. catenata</i> Laut.		+	+		+	
<i>Trichromus variabilis</i> [Kütz. ex Born. et Flah.] Kom. et Anagn.	+	+		+		
Bacillariophyta						
<i>Hantzschia amphioxys</i> [Ehr.] Grun.	+	+	+	+	+	+
<i>Luticola mutica</i> [Kütz.] Mann	+		+	+	+	
<i>Navicula mutica</i> Kütz. var. <i>binodis</i> Hust.					+	
<i>N. pelliculosa</i> [Bre`b.] Hilse	+	+	+	+	+	+
<i>Stauroneis anceps</i> Ehr.					+	
<i>Pinnularia borealis</i> Ehr.				+	+	
Chlorophyta						
<i>Chlamydomonas atactogama</i> Korsch.		+				
<i>Ch. gloeogama</i> Korsch.	+	+	+	+	+	+
<i>Ch. oblongella</i> Lund		+				
<i>Coccomyxa confluens</i> [Kütz.] Fott	+	+	+	+	+	+
<i>Chlorococcum sp</i>		+		+	+	+
<i>Scotiellopsis oocystiformis</i> [Lund] Punc. et Kalina				+	+	
Итого	14	18	14	16	21	15

На 20-е сутки сукцессии полностью реализуется групповое разнообразие микрорототрофов, развиваются представители всех отделов *Chlorophyta*, *Bacillariophyta*, безгетероцистные и гетероцистные (азотфиксирующие) *Суанопхита*. При этом из одинакового первоначального фонда клеток формируются сообщества, различающиеся как по количественному обилию клеток водорослей, так и по структуре популяций (табл. 2).

Как видно из таблицы 2, высокие концентрации МФК при любом сроке предварительной инкубации почвы с данным соединением выступают как фактор, инициирующий размножения водорослей. При этом увеличение плотности клеток в наземных альгоценозах происходит за счёт появления в структуре популяций *Суанопхита* (свыше 80% от общей численности фототрофов). В контрольных вариантах (без внесения МФК) абсолютное доминирование в фото-

Таблица 2

Влияние МФК на численность водорослей и структуру альгоценозов дерново-подзолистой почвы (модельный опыт, 20-е сутки сукцессии)

Вариант МФК, моль/л	Численность клеток/см ²	<i>Chlorophyta</i> , %	<i>Bacillaryophyta</i> , %	Безгетероцистные <i>Cyanophyta</i>	Гетероцистные <i>Cyanophyta</i>
5 дней инкубации					
Контроль	381	94,75	5,25	0	0
5·10 ⁻⁴	350	94,77	5,43	0	0
5·10 ⁻³	1800	9,72	2,44	61,11	26,72
20 дней инкубации					
Контроль	275	93,09	6,91	0	0
5·10 ⁻⁴	975	33,33	1,95	55,08	9,64
5·10 ⁻³	2843	18,25	1,55	4,57	75,62

трофном микросообществе принадлежит одноклеточным зелёным водорослям с незначительной плотностью клеток. Тенденция стимулирующего эффекта МФК на развитие синезелёных водорослей (цианобактерий, ЦБ) усиливается в ходе аутогенной сукцессии. Так, в последний срок количественного учёта водорослей (41-е сутки) развитие водорослей на поверхности почвы достигло уровня «цветения». Максимальные показатели численности клеток по-прежнему отмечаются в варианте с МФК 5·10⁻³ моль/л (табл. 3).

Анализируя результаты таблицы 2 и 3, можно видеть, что повышенные концентрации МФК и удлиненные сроки инкубации её в почве стимулируют размножение водорослей, в первую очередь, такую своеобразную группу, как *Cyanophyta* (*Cyanobacteria*). Являясь древнейшими организмами планеты, синезелёные

водоросли (цианобактерии) способны выживать в самых экстремальных условиях среды. Высочайший уровень адаптации этих организмов к прессингу факторов, угнетающих другие группы водорослей, обусловлен пластичностью и многообразием путей их метаболизма [11–13]. Способность к оксигенному фотосинтезу, азотфиксации, синтез широкого круга физиологически активных веществ, наличие слизистых чехлов, мутуалистическое сожительство с разнообразными группами споровых и неспоровых грамположительных и грамотрицательных бактерий обеспечивает ЦБ доминирование в определённые периоды в тех экологических нишах, которые оказываются не пригодными для других эукариотических водорослей. При этом высокая степень адаптации к ксенобиотикам обеспечивается не только за счёт собственного метаболизма, но во многом опреде-

Таблица 3

Влияние МФК на количественные показатели наземных альгоценозов (модельный опыт, 41-е сутки сукцессии)

Вариант МФК, моль/л	Численность водорослей, кл./см ²			
	<i>Chlorohyta</i> + <i>Bacillariophyta</i>	<i>Cyanophyta</i>		Общая численность
		бгц	гц	
5 дней предварительной инкубации пробы				
Контроль	4863	0	150	5013
5·10 ⁻⁴	3081	1981	356	5418
5·10 ⁻³	6569	2094	200	8863
20 дней предварительной инкубации почвы				
Контроль	2837	16400	7787	27024
5·10 ⁻⁴	20820	30600	6490	57910
5·10 ⁻³	18387	9125	45750	73262

Примечание: бгц – безгетероцистные, не фиксирующие азот виды, гц – гетероцистные виды-азотфиксаторы

ляется деятельностью бактерий-спутников, среди которых отмечены целлюлозоразрушающие, метаногенные, аммонификаторы, деструкторы нефти и др. В зависимости от характера субстрата, на котором развиваются цианобактерии, меняются доминирующие группы бактерий-спутников. Видимо, и в данном опыте стремительное размножение ЦБ при повышенных концентрациях МФК связано с деятельностью почвенных бактерий, производящих гидролиз связи С-Р с выделением неорганического фосфора. Цианобактерии, особенно их азотфиксирующие формы, являясь независимыми в своём развитии от наличия минерального азота, особенно требовательны к обеспечению фосфором. Поэтому велика вероятность того, что возрастание численности ЦБ в варианте с МФК $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л связано с повышением содержания доступного неорганического фосфора.

Таким образом, изучение действия МФК на фототрофный микробный комплекс почвы показало, что МФК как продукт конечной деградации фосфорорганических отравляющих веществ является регулятором развития в почве различных групп микрорфототрофов. Сила воздействия МФК на водоросли зависит от её концентрации и сроков пребывания в почве: чем выше концентрация и длительнее инкубация, тем больше интенсивность размножения водорослей. Воздействие МФК на почвенные альгоценозы приводит к увеличению реализации видового потенциала. Наивысший стимулирующий эффект МФК оказывает на представителей *Cyanophyta*, которые можно рассматривать в качестве потенциальных биоагентов ремедиации почв от продуктов разложения фосфорорганических отравляющих веществ. В связи с этим большой интерес представляет изучение природных плёнок ЦБ, развивающихся в загрязнённых местообитаниях.

Биоплёнки *Nostoc commune* – природные микробные многовидовые сообщества, включающие представителей всех трофических

групп. Флористический анализ используемых нами биоплёнок выявил 23 вида цианобактерий и водорослей, входящих в фототрофный блок природный биоплёнок *N. commune*, в том числе 14 видов цианобактерий (ЦБ), 7 видов зелёных водорослей и 2 вида – жёлтозелёных [14].

В результате миграции микроорганизмов из плёнок на стерильный песок в чашках Петри происходит постепенное его зарастание. Визуальный просмотр чашек показывает, что на поверхности песка появились разрастания, имеющие различную площадь покрытия. МФК в данном случае выступила как стимулятор экспансии фототрофов из плёнок *N. commune*. Так, в контроле этот показатель достигает 25%, а при действии МФК – 75-80%. Прямой микроскопический учёт численности популяций фототрофов, входящих в состав поверхностных разрастаний вследствие эмиграции из биоплёнок *N. commune*, показал существенные различия в плотности и составе фототрофных микробных комплексов (табл. 4, 5).

Внесение МФК в субстрат привело к активизации размножения цианобактерий, практически не повлияв на активность микроводорослей. Численность фототрофов в сообществах на загрязнённом песке в 4,4–5,8 раза выше, чем в контрольном варианте. При этом поведение разных групп цианобактерий различно. Слабая концентрация МФК незначительно стимулирует размножение главного доминанта природной плёнки – *N. commune*. При повышенной дозе МФК происходит его угнетение. В то же время остальные группы цианобактерий стремительно размножаются при любых концентрациях МФК (табл. 5).

Как видно из результатов, приведённых в таблице 5, под влиянием возрастающих концентраций МФК происходит практически линейное возрастание в структуре популяций доли прокариотных фототрофов, резкое увеличение вклада безгетероцистных цианобак-

Таблица 4

Влияние МФК на численность фототрофов в поверхностных разрастаниях при миграции из биопленок *Nostoc commune* (млн.кл./см²)

Концентрация МФК, моль/л	Водоросли	<i>N. commune</i>	Другие ГЦ*	БГЦ**	Всего
0	0,30±0,037	5,9±0,144	0,80±0,019	0,63±0,015	7,63
10 ⁻⁴	0,44±0,072	7,6±1,190	4,70±0,580	21,0±1,740	33,74
10 ⁻³	0,37±0,04	0,07±0,010	5,33±0,980	38,67±4,160	44,44

Примечание: * – гетероцистные цианобактерии; ** – безгетероцистные цианобактерии.

Таблица 5

Изменение структуры поверхностных фототрофных микробных комплексов под влиянием МФК

Концентрация МФК, моль/л	Структура популяций, %		
	прокариоты/эукариоты	бгц/гц	<i>N. commune</i> /другие цб
0	96,10/3,90	8,6/91,4	77,3/22,7
10 ⁻⁴	98,69/1,31	63,1/26,9	22,8/77,2
10 ⁻³	99,17/0,83	87,75/12,25	0,16/99,84

Примечание: бгц – безгетероцистные цианобактерии, гц – гетероцистные цианобактерии, цб – цианобактерии.

терий (как показывает флористический анализ, в первую очередь за счет видов *p. Phormidium*) и прогрессирующее снижение роли *N. commune*. Однако видовое разнообразие фототрофов при этом уменьшается (табл. 6).

Возможно, решающую роль в этом процессе принадлежит сапротрофным бактериям-спутникам, способным к гидролитическому разложению МФК. В лабораторных опытах выявлено, что бактерии *Vacillus sp.* и *Pseudomonas sp.* вызывают биодеградацию фосфорорганических загрязняющих веществ [7]. Вследствие этого среда обогаща-

ется минеральными фосфатами. Известно, что именно наличие минерального фосфора, в первую очередь, необходимо для развития цианобактерий. А среди бактерий-спутников, населяющих биоплёнку *N. commune*, доминантами как раз и являются представители вышеперечисленных родов (выявлено нами по результатам посева на среду МПА).

Существенный вклад в формирование плёнок «цветения» вносят микромицеты (табл. 7).

Суммарная длина мицелия колеблется от 187 до 384 м на 1 см² поверхности плёнки

Таблица 6

Изменение видового разнообразия фототрофов в наземных разрастаниях под влиянием метилфосфоновой кислоты (МФК)

Группы фототрофов	Виды	Варианты	Контроль	МФК	МФК
				10 ⁻⁴ моль/л	10 ⁻³ моль/л
Гетероцистные цианобактерии (ГЦ)	1. <i>Nostoc commune</i>		+	+	+
	2. <i>Nostoc punctiforme</i>		+	+	
Безгетероцистные цианобактерии (БГЦ)	3. <i>Phormidium autemnale</i>			+	
	4. <i>Phormidium formosum</i>		+	+	+
	5. <i>Phormidium boryanum</i>		+	+	+
	6. <i>Plectonema boryanum</i>		+	+	+
	7. <i>Leptolyngbya faveolarum</i>		+	+	+
Диатомовые водоросли	8. <i>Hantzschia amphioxys</i>		+	+	
	9. <i>Luticola mutica</i>		+		
Одноклеточные зелёные водоросли	10. <i>Chlorella vulgaris</i>		+	+	+
	11. <i>Scotiellopsis levicostata</i>		+		
Нитчатые зелёные водоросли	12. <i>Stichococcus bacillaris</i>		+		
	13. <i>Klebsormidium flaccidum</i>		+		
Жёлтозелёные водоросли	14. <i>Eustigmatos magnus</i>		+		
	Всего видов		14	9	6

Таблица 7

Изменение структуры популяций микромицетов под влиянием МФК

Концентрация МФК, моль/л	Длина мицелия, м/см ²	Численность спор, млн. клеток/см ²	Удельная продукция спор*, тыс./м
0	214,4±4,5	5,47±60,0	25,5
10 ⁻⁴	384,0±35,4	36,4±4,3	95,2
10 ⁻³	187,8±15,7	26,0±3,5	138,4

Примечание: * – численность спор, образованных на 1 м мицелия.

«цветения», т. е. разница по вариантам не столь существенна, как в изменении численности цианобактерий. Однако количество образованных спор и особенно показатель удельной продукции спор свидетельствуют о том, что увеличение концентрации МФК стимулирует процесс спорообразования и, следовательно, возрастание потенциальных возможностей микромицетов к освоению и заселению загрязнённых субстратов.

Таким образом, биоплёнки *Nostoc commune* – многовидовые структурированные сообщества с большой плотностью клеток организмов различных систематических уровней. Связь организмов обеспечивается высоким уровнем физических контактов за счёт выделяемой слизи, а также агрегацией вследствие наличия нитчатых (цианобактерии, зелёные водоросли) и мицелиальных (актиномицеты, микромицеты) форм. Среди партнёров подобного консорциума существуют виды, устойчивые к различным неблагоприятным воздействиям. Причины устойчивости имеют разнообразие механизмы, которые обсуждались нами ранее [15, 16]. Совокупность предполагаемых механизмов устойчивости микроорганизмов, входящих в состав биоплёнок *Nostoc commune*, делает эти уникальные природные комплексы перспективным объектом в разработке методов и технологий биоремедиации техногенно загрязнённых почв.

Актуальна проблема не только биоремедиации техногенно загрязнённых территорий. В последние годы производится интенсивный поиск методов биотестирования, которые бы позволяли оперативно выявлять признаки начинающегося неблагополучия экосистем. С этой целью в лаборатории био-

мониторинга разрабатывается метод оценки жизнеспособности различных биообъектов с использованием трифенилтетразолий хлорида (ТТХ) при действии данного препарата и на зародыши высших растений, и на клетки цианобактерий. Жизнеспособными признаются такие клетки, в которых под влиянием ТТХ образуются кристаллы формаза, имеющие малиновую окраску. В частности, данный метод был опробован на нескольких альгологических чистых культурах цианобактерий из коллекции фототрофных микроорганизмов кафедры ботаники, физиологии растений и микробиологии Вятской ГСХА [16].

Так, опыты, проведённые с *Nostoc paludosum*, выявили, что, при экспозиции клеток с токсикантом в среде Громова и дистиллированной воде жизнеспособность клеток существенно выше с использованием питательной среды, в которой они культивировались, и, наоборот, повышается процент нежизнеспособных клеток при их экспозиции с токсикантом в воде (табл. 8).

На выживаемость клеток в растворе МФК оказывает влияние и титр клеток: устойчивость популяции понижается с понижением плотности клеток (табл. 9).

Влияние МФК на жизнеспособность различных видов цианобактерий

Следующая серия опытов была связана с выявлением наиболее чувствительных видов цианобактерий к такому токсиканту, как МФК. Результаты тетразолюльно-топографического метода определения жизнеспособности клеток приведены в таблице 10.

Исходя из полученных результатов, шкала толерантности испытанных видов колеб-

Таблица 8
Влияние МФК на гибель клеток *Nostoc paludosum* (%) при экспозиции в среде Громова и воде

Вариант (МФК, моль/л)	Среда Громова	Дистиллированная вода
Контроль	0,96	24,8
10^{-4}	1,61	30,6
10^{-3}	90,03	97,6
10^{-2}	100	100

Таблица 9
Влияние титра *Nostoc paludosum* на выживаемость (%) популяции в растворе МФК с концентрацией $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л

Титр <i>N. paludosum</i> , кл./мл	Жизнеспособные клетки	Нежизнеспособные клетки
$2,21 \cdot 10^8$	98,39±1,29	1,61
$2,21 \cdot 10^7$	91,7±2,14	7,15
$4,42 \cdot 10^6$	88,41±3,17	11,59
$2,21 \cdot 10^6$	70,04±16,4	29,96

Таблица 10

Влияние МФК ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) на жизнеспособность (%) клеток различных видов цианобактерий

Вид цианобактерий	Клетки с кристаллами	Клетки без кристаллов
<i>Nostoc paludosum</i>	91,56±2,07	8,44
<i>Nostoc linckia</i>	79,27±2,54	20,73
<i>Nostoc muscorum</i>	78,65±12,4	21,35
<i>Microchaete tenera</i>	70,5±6,0	29,50

лется в пределах 20% выживаемости. Для МФК наиболее чувствительным видом оказалась *M. tenera*, а наиболее стойким – *N. paludosum*. Два других вида ностока занимают место между этими полюсами и обладают практически одинаковой стойкостью к МФК.

Таким образом, любой из 4-х штаммов ЦБ можно использовать в биотестировании с применением тетраэдрально-топографического метода.

Влияние МФК на высшие растения

Влияние МФК в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л изучали при проращивании семян пшеницы, кормового гороха пелюшки и горчицы посевной. Данное соединение очень незначительно снижало всхожесть пшеницы и стимулировало всхожесть пелюшки и горчицы (табл. 11)

Действие МФК проявляется также в иницировании линейного роста проростков данных культур (табл. 12)

Как следует из таблицы 11, наиболее выраженное ростактивирующее действие метилфосфоновая кислота оказывает на развитие пелюшки и горчицы. Так, длина проростков пелюшки, выращенных на растворе МФК, была больше контрольных в

1,6 раза. В присутствии МФК длина проростков и корней горчицы была выше контроля на 29% и 23% соответственно.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что МФК при концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л не подавляет начальные этапы развития таких сельскохозяйственных культур, как пшеница, пелюшка и горчица.

На примере пелюшки мы изучали уровень окислительного стресса по активности антиоксидантного фермента пероксидазы. На четвёртый день после обработки пелюшки растворами МФК ($1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-1}$ моль/л) активацию пероксидазы в листьях вызывали все испытываемые концентрации МФК (табл. 13). Можно полагать, что такие изменения активности пероксидазы носят адаптивный характер и направлены на снятие окислительного стресса.

В настоящее время в лаборатории изучается действие МФК на сапротрофную бактериальную микрофлору и ферментативную активность почвы.

Таким образом, проведённые исследования показали отсутствие ингибирующего действия МФК в изученных концентрациях на фототрофные и сапротрофные микроорганизмы и на высшие растения.

Таблица 11

Влияние МФК ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) на всхожесть семян различных сельскохозяйственных культур

Вариант	Всхожесть, %		
	Пшеница	Пелюшка	Горчица
Контроль	90,0	86,7	65,0
МФК	88,0	91,3	79,3

Таблица 12

Действие МФК на линейный рост проростков разных сельскохозяйственных культур

Культура	Длина, см	
	проростков	корней
Пшеница	<u>0,33 ± 0,02</u>	<u>3,40 ± 0,23</u>
	0,38 ± 0,11	3,41 ± 0,71
Пелюшка	<u>0,56 ± 0,07</u>	<u>2,05 ± 0,11</u>
	0,90 ± 0,07	2,39 ± 0,10
Горчица	<u>0,79 ± 0,09</u>	<u>0,92 ± 0,11</u>
	1,02 ± 0,08	1,13 ± 0,12

Примечание: числитель – контроль, знаменатель – МФК ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)

Изменение активности пероксидазы (мл J₂/г сырой массы) в растениях пелюшки под действием разных концентраций МФК

Вариант МФК (моль/л)	Орган	
	лист	корень
Контроль	7,74 ± 1,05	33,08 ± 1,00
1·10 ⁻³	13,24 ± 0,67	37,38 ± 0,86
1·10 ⁻²	14,05 ± 0,55	33,88 ± 1,34
1·10 ⁻¹	17,08 ± 0,40	32,45 ± 0,26

Литература

1. Кирби А., Уоррен С. Органическая химия фосфора. М., 1971. 403 с.
2. Савельева Е.И., Зенкевич И.Г., Кузнецова Т. А., Радиллов А.С., Пшеничная Г.В. Исследование продуктов превращений фосфорорганических отравляющих веществ методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии // Российский химический журнал. 2002. Т. 46. № 6. С. 82-91.
3. Огородникова С.Ю., Головки Т.К., Ашихмина Т.Я. Реакции растений на фосфорорганический ксенобиотик – метилфосфоновую кислоту. Научные доклады /Коми научный центр УрО РАН. Вып. 464. Сыктывкар, 2004. 24 с.
4. Чикарев В.Н., Елисеев Ю.Ю., Тихомирова Е.И. Влияние продуктов дегазации химического оружия на рост и развитие почвенных микроорганизмов // 3-я Международная научно-практическая конференция «Экономика природопользования и природоохраны-2000». Пенза, 2000. С. 129-131.
5. Петров С.С., Корякин Ю.Н., Холстов В.И., Завьялова Н.В. Биотехнология в решении проблемы уничтожения химического оружия // Российский химический журнал. 1995. Т. 39. № 4. С. 18-20.
6. Харечко А.Т., Мягких В.И., Корякин Ю.Н. Оценка влияния микроорганизмов на динамику разложения зомана в почве // Российский химический журнал. 1995. Т. 39. № 4. С. 104-107.
7. Кононова С.В., Несмеянова М.А. Фосфонаты и их деградация микроорганизмами // Биохимия. 2002. Т. 67. № 2. С. 220-233.
8. Штина Э.А., Зенова Г.М., Манучарова Н.А. Альгологический мониторинг почв. // Почвоведение. 1998. № 12. С. 1449-1461.
9. Штина Э.А., Голлербах М.М. Экология почвенных водорослей. М.: Наука, 1976. 143 с.
10. Домрачева Л.И. «Цветение» почвы и закономерности его развития. Сыктывкар, 2005. 336 с.
11. Гапочка Л.Д. Популяционные аспекты устойчивости цианобактерий и микроводорослей к токсическому фактору: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук в форме научного доклада. М., 1999. 64 с.
12. Панкратова Е.М. Почвенные цианобактерии в прошлом Земли, их экологическая роль в настоящем и возможная в будущем // Экология и почвы. Пуццино, 2001. С. 39-48.
13. Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии. М., 2003. 348 с.
14. Домрачева Л.И., Кондакова Л.В., Пегушина О.А., Фокина А.И. Биоплёнки *Nostoc commune* – особая микробная сфера // Теоретическая и прикладная экология, 2007. №1. С. 15-19.
15. Домрачева Л.И., Дабах Е.В., Кондакова Л.В., Вараксина А.И. Альго-микологические и фитотоксические комплексы при химическом загрязнении почвы // Экология и почвы. Лекции и доклады 13 Всероссийской школы. Т. 5. Пуццино, 2006. С. 88-99.
16. Домрачева Л.И., Кондакова Л.В., Огородникова С.Ю., Фокина А.И., Пегушина О.А. Альго-цианобактериальные комплексы в диагностике состояния почвы, загрязнённой свинцом и метилфосфоновой кислотой // Современные проблемы загрязнения почв. Сб. материалов II Международной конференции. Т. 1. 2007. С. 341-343.