

УДК 631.46:58.051

Изучение реакций почвенных актиномицетов на отдельные продукты деструкции химического оружия

© 2014. Т. Я. Ашихмина¹, д.т.н., зав. лабораторией, Е. В. Товстик², аспирант,
С. Ю. Огородникова¹, к.б.н, с.н.с., И. Г. Широких^{1,2}, д.б.н., в.н.с.

¹Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН,

²Зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства

Северо-Востока им. Н. В. Рудницкого,

e-mail: irgenal@mail.ru

В ходе проведения мониторинговых исследований вблизи объекта хранения и уничтожения химического оружия «Марадьковский» из верхних горизонтов почв в чистую культуру было выделено более 100 штаммов стрептомицетов. С целью поиска толерантных к продуктам деструкции химического оружия штаммов проведено изучение отклика природных изолятов актиномицетов на действие пиррофосфата натрия, метилфосфоновую кислоту и мышьяк в градиенте концентраций. Для каждого поллютанта установлены дозы, стимулирующие и ингибирующие рост актиномицетов на стадии спор и вегетативного роста, проявление ими метаболической активности: продукцию антибиотиков, разложение целлюлозы. Выявлены культуры актиномицетов, перспективные для создания микробных биопрепаратов для ремедиации почв, импактных по мышьяку и фосфорсодержащим ксенобиотикам.

In the course of monitoring near the chemical weapons storage and destruction plant «Maradykovsky», more than 100 strains of *Streptomyces* were stated from the soil surfaces into the pure culture. In order to find the strains which are tolerant to chemical weapons degradation products, the response of natural isolates of actinomycetes to sodium pyrophosphate, methylphosphonic acid, and arsenic concentration gradient was studied. For each pollutant a special dose was set, which could stimulate and inhibit either the growth of actinomycetes at the stage of spores and at the stage of vegetative growth, or their metabolic activity consisting in production of antibiotics, or cellulose decomposition. Actinomycetes cultures were found, which are promising for creating microbial inoculants for remediation of soils impacted with arsenic and phosphorus xenobiotics.

Ключевые слова: химическое оружие, продукты деструкции, пиррофосфат натрия, метилфосфоновая кислота, мышьяк, почвенные актиномицеты, прорастание спор, скорость роста, биомасса, антагонисты, целлюлозолитическая активность.

Keywords: chemical weapons destruction products, sodium pyrophosphate, methylphosphonic acid, arsenic, soil actinomycetes, spore germination, growth rate, biomass, antagonists cellulolytic activity.

Введение

Объекты хранения и уничтожения химического оружия относятся к числу предприятий повышенной химической опасности для природных комплексов и экосистем [1]. При промышленном уничтожении химического оружия (ХО) среди продуктов деструкции отравляющих веществ мышьяк и техногенные формы фосфора выступают в качестве приоритетных загрязнителей почвенного покрова. В связи с этим особое значение приобретает поиск толерантных к данным загрязняющим веществам организмов, которые могли бы в дальнейшем использоваться для разработки биотехнологий ремедиации нарушенных вследствие уничтожения химического оружия почв и водных экосистем.

В силу большого разнообразия биохимических функций и высокой толерантности к изменяющимся условиям среды перспективными в этом плане представляются почвенные мицелиальные бактерии – актиномицеты [2, 3]. Актиномицеты играют важную роль в поддержании гомеостаза любой почвенной экосистемы, а также участвуют в процессах детоксикации и обеззараживания почв [4]. В предыдущих исследованиях были установлены количественные и качественные различия актиномицетных комплексов в ряду подзолистых и дерново-подзолистых почв лесных и луговых фитоценозов в зоне действия объекта хранения и уничтожения химического оружия (ОХУХО). Существенные отклонения в структуре комплексов почвенных актиномицетов, обусловленные воздействием совокуп-

ности техногенных факторов хранения ХО, строительства Объекта по его уничтожению, выявлены в почвах луговых и лесных фитоценозов внутри зоны, радиусом 8 км от Объекта. За период деятельности Объекта в режиме уничтожения ХО в почвах внутри зоны радиусом 2,7 км от ОХУХО произошли перестройки в структуре актиномицетных комплексов, свидетельствующие об их возвращении к состоянию, в большей степени, чем ранее, характерному для комплексов мицелиальных прокариот луговых и лесных фитоценозов гумидной зоны [5, 6]. В ходе проведения этих исследований из верхних горизонтов почв вблизи ОХУХО «Марадыковский» в чистую культуру было выделено более 100 штаммов стрептомицетов. Изучение ответных реакций некоторых природных изолятов на отдельные продукты деструкции химического оружия и явилось целью данной работы.

Объекты и методы

Для изучения отклика стрептомицетов на действие метилфосфоновой кислоты (МФК), пиродифосфата натрия и мышьяка в градиенте концентраций служили природные изоляты из почв, отобранных на территории ЗЗМ ОХУХО «Марадыковский» (табл. 1).

Исследуемые штаммы актиномицетов поддерживали методом периодического пересева на свежую овсяную среду с последующим культивированием при температуре 27°C в течение суток [7].

Исследования реакций актиномицетов проводили в модельных опытах. Изучали влияние МФК на динамику общей численности и численности представителей отдельных родов актиномицетов в ходе сукцессий, вызванных увлажнением почвы водой и растворами МФК в различных концентрациях.

Для опыта использовали образцы воздушно-сухой дерново-подзолистой супесчаной почвы (рН_{ккл} 5,3), которые помещали в чашки Петри и увлажняли растворами МФК до 60% от ПВ почвы. Использовали растворы, содержащие 0,00001; 0,0001; 0,001; 0,01, 0,1 моль/л МФК, что в пересчёте на почву составляло 0,4; 3,5; 3,5·10¹; 3,5·10²; 3,5·10³ мг/кг. Каждый вариант включал три повторности. Для разделения эффектов токсического действия МФК и подкисления МФК среды, использовали вариант с водным раствором метилфосфоновой кислоты, приготовленным на фосфатном буфере рН 6,86. В контроле для увлажнения почвы использовали дистиллированную воду (рН 5,0).

В момент закладки опыта и на 1; 7; 14; 21 сутки сукцессии производили отбор средней пробы почвы, подсушивали и прогревали почву при 70°C в течение четырёх часов для ограничения роста немцелиальных бактерий. Готовили почвенные суспензии и производили из них посев на среду с пропионатом натрия в трёхкратной повторности. Чашки с посевами инкубировали в термостате при 27°C в течение 10–12 суток и далее при комнатной температуре в течение трёх недель.

Таблица 1

Характеристика природных изолятов, использованных в модельных экспериментах

Источник выделения	Штамм	Секция и серия	Синтез меланоидов/антибиотиков [Гаузе, 1983]
Почва лугового фитоценоза	<i>Streptomyces albus</i> 141.15	Albus Albus	- / +
Почва пастбища	<i>Streptomyces bottropensis</i> 140.4	Cinereus Chromogenes	+ / +
Почва лугового фитоценоза	<i>Streptomyces plicatus</i> 103.9		- / +
	<i>Streptomyces chromofuscus</i> 140.6		+ / +
	<i>Streptomyces xantocidicus</i> 135.4		- / +
	<i>Streptomyces variabilis</i> 73.3		- / +
	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> 135.3		- / +
Почва лесного фитоценоза	<i>Streptomyces wedmorensis</i> 38.11	Cinereus Achromogenes	- / +
	<i>Streptomyces werraensis</i> 88.6		- / +
Почва лугового фитоценоза	<i>Streptomyces odorifer</i> 103.4	Helvolo-Flavus Helvolus	- / -
Почва лесного фитоценоза	<i>Streptomyces helvaticus</i> 42.35		- / -

Проводили дифференцированный подсчёт колоний, выделяя по морфологическим признакам четыре морфотипа, соответствующих родам *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptosporangium* и группе олигоспоровых актиномицетов [8].

Скорость роста колоний актиномицетов определяли по увеличению диаметра колоний за определённый промежуток времени, используя для расчёта формулу (1) [9].

$$K_r = \frac{d_2 - d_1}{t_2 - t_1}, \quad (1)$$

где K_r – радиальная скорость роста, мм/час; d_1 и d_2 – диаметр колоний, мм; t_1 и t_2 – начальный и конечный моменты времени измерения соответственно, час.

Накопление биомассы культурами актиномицетов определяли гравиметрически [10].

Наблюдения за интенсивностью прорастания спор актиномицетов проводили с использованием микроскопа «Leica DM2000», Германия.

Антибиотическую активность актиномицетов изучали методом агаровых блочков [11].

Определение целлюлозолитической активности осуществляли на среде Гетчинсона с карбометилцеллюлозой [12].

Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами дисперсионного анализа [13] с использованием программ EXCEL 7 и STATGRAFICS.

Результаты и обсуждение

Действие метилфосфоновой кислоты на расписание появления колоний актиномицетов. Исследование сукцессионной динамики общей численности актиномицетов в почве с добавлением МФК в градиенте концентраций от 0,00001 до 0,1 моль/л выявило её отличия от динамики численности в контрольном варианте. В ходе сукцессии отмечали уве-

личение (от 10^4 до 10^5 КОЕ/г) общей численности актиномицетов во всех вариантах опыта, независимо от присутствия в почве МФК. Однако степень этого увеличения, в контрольном варианте и вариантах с МФК на разных этапах сукцессии была различной. На начальном этапе сукцессии (1-е сутки) под воздействием МФК в низкой концентрации отмечали увеличение численности в пределах одного порядка (10^4 КОЕ/г), а в присутствии самой высокой в опыте концентрации (0,1 моль/л) – на порядок (от 10^4 до 10^5 КОЕ/г), по сравнению с контрольным вариантом. На завершающем этапе сукцессии (21 сутки) общая численность актиномицетов в почвах, испытывающих воздействие МФК (0,0001–0,1 моль/л), оставалась стабильной, тогда как в контрольном варианте к этому сроку наблюдений общая численность актиномицетов уже существенно снижалась. Добавление МФК в почву, таким образом, способствовало увеличению продолжительности сукцессии актиномицетов. Сопоставляя полученные результаты с данными литературы, необходимо отметить, что экспериментальное внесение МФК в дерново-подзолистую пахотную почву стимулировало размножение в ней водорослей и цианобактерий [14, 15]. Авторы связывают данный эффект с микробной деструкцией метилфосфоновой кислоты, сопровождающейся высвобождением фосфат-иона, который мог быть использован в качестве источника минерального питания.

Действие метилфосфоновой кислоты на прорастание спор стрептомицетов. При изучении динамики прорастания спор *S. xantocidicus* 135.4 в присутствии возрастающих доз МФК, установлено угнетающее действие МФК в отношении споровой части популяции стрептомицета во всём градиенте исследованных концентраций (0,001–0,1 моль/л) и в течение всего периода наблюдений (120 ч) (рис. 1).

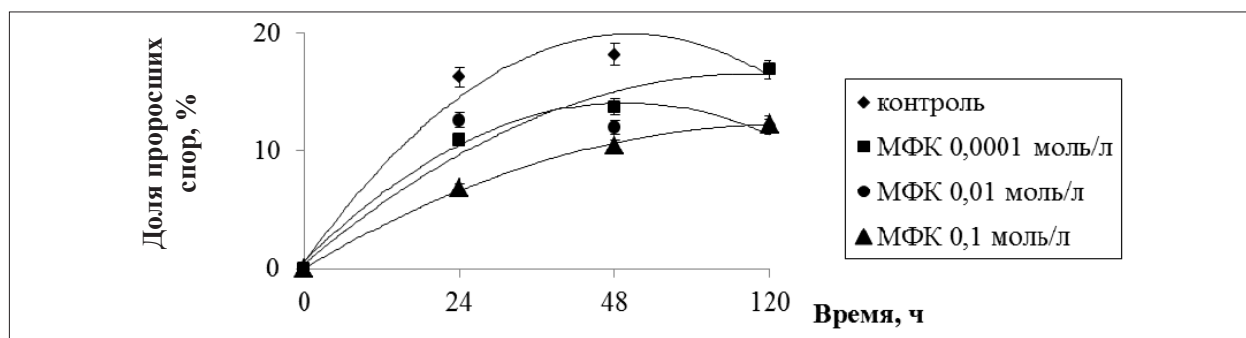


Рис. 1. Динамика интенсивности прорастания спор *Streptomyces xantocidicus* 135.4 при различных концентрациях МФК в почве.

Показано, что максимальное ингибирующее действие МФК (0,0001–0,1 моль/л) на интенсивность прорастания спор имело место на первом этапе сукцессии и с течением времени ослаблялось (в 2 раза), однако не устранялось полностью. К моменту окончания опыта (120 ч), на фоне увеличения доли проросших спор во всех вариантах, ингибирующее действие МФК сохранилось только для более высоких концентраций (0,01 и 0,1 моль/л). Действие МФК в концентрации 0,0001 моль/л на интенсивность прорастания спор к моменту завершения эксперимента (120 ч) в эксперименте не выявлено.

Действие пирофосфата натрия на кинетику роста и физиологические свойства стрептомицетов. При изучении действия возрастающих доз ПФН на радиальную скорость роста культур *Streptomyces rectus* 73.3, *S. werraensis* 88.6, *S. wedmorensis* 38.11, *S. helveticus* 42.35, *S. chromofuscus* 140.6 на агаровой среде с добавлением $1 \cdot 10^{-2}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л ПФН, выявлены их кинетические различия в отношении этого загрязнителя (рис. 2).

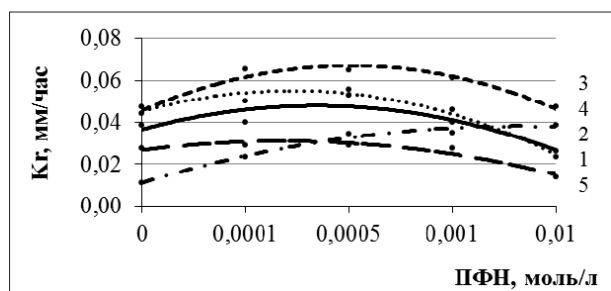


Рис. 2. Скорость роста *Streptomyces rectus* 73.3 (1), *S. chromofuscus* 140.6 (2), *S. helveticus* 42.35 (3), *S. werraensis* 88.6 (4), *S. wedmorensis* 38.11(5) в зависимости от концентрации ПФН.

Так, у штаммов 42.35 и 73.3 скорость роста существенно возрастала (до 0,055–0,065 мм/час) при действии $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л ПФН и уменьшалась в случае более высоких концентраций ПФН, тогда как для штамма 88.6 она возрастала во всём диапазоне исследуемых концентраций ПФН. Таким образом, ингибирующие мицелиальный рост концентрации ПФН для стрептомицетов видоспецифичны и составляют не менее 0,0005 моль/л. При меньших концентрациях, напротив, наблюдалось стимулирующее вегетативный рост действие ПФН на актиномицеты.

Накопление сухой биомассы *S. wedmorensis* 38.11 при выращивании в жидкой среде с добавлением ПФН снижалось пропорционально увеличению концентрации ПФН, начиная с 7-и суток культивирования (рис. 3).

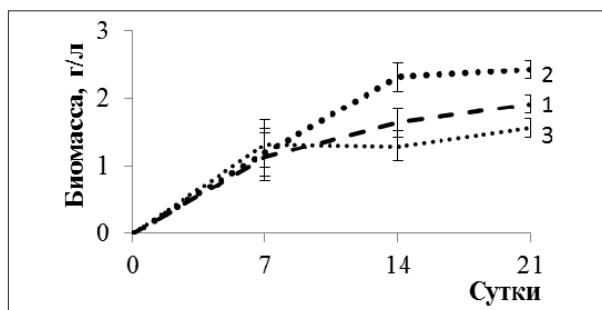


Рис. 3. Динамика накопления биомассы штаммом *Streptomyces wedmorensis* 38.11 в среде с 0,0001 (2); 0,001 (1); 0,01 (3) моль/л ПФН.

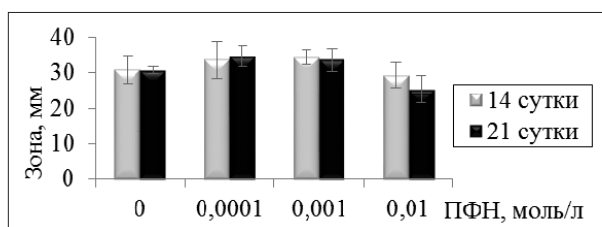


Рис. 4. Средние значения зон угнетения роста *Fusarium oxysporum* U1, *F. culmorum* T8, *F. avenaceum* 7/2 водорастворимыми метаболитами *Streptomyces wedmorensis* 38.11 при разных концентрациях ПФН.

Добавление 0,01 моль/л ПФН в среду для выращивания *S. wedmorensis* 38.11 угнетало антагонистическую активность стрептомицета в отношении грибов рода *Fusarium* (рис. 4).

В меньших концентрациях (0,0001; 0,001 моль/л) ПФН не оказала существенного влияния на способность культуры стрептомицета синтезировать антибиотики.

Реакция стрептомицетов на мышьяк.

Поскольку актиномицеты – организмы со сложным циклом развития, включающим вегетативную и споровую стадии, представляло интерес изучить влияние мышьяка на споры. Методом люминесцентной микроскопии оценивали прорастание спор *S. odorifer* 103.4, зафиксированных на стёклах и интродуцированных в почву с внесением различных концентраций As (от $3 \cdot 10^{-3}$ до $1 \cdot 10^{-1}$ моль/л). Интенсивность прорастания спор (доля проросших спор от числа внесённых в почву, %) зависела от концентрации ток-

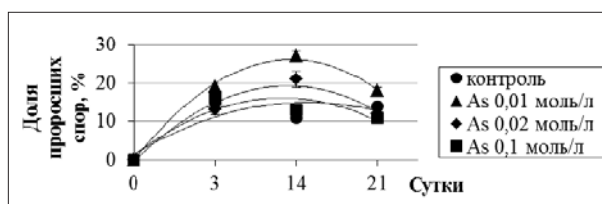


Рис. 5. Динамика интенсивности прорастания спор *Streptomyces odorifer* 103.4 при различных концентрациях мышьяка в почве.

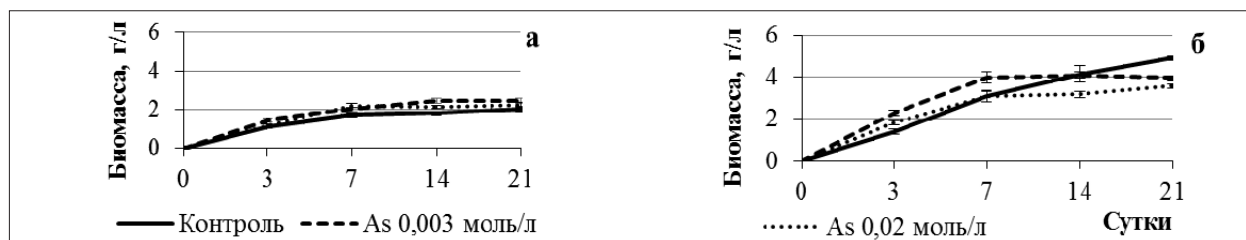


Рис. 6. Динамика накопления биомассы *Streptomyces wedmorensis* 38.11 (а) и *S. bottropensis* 140.4 (б) в градиенте концентраций мышьяка.

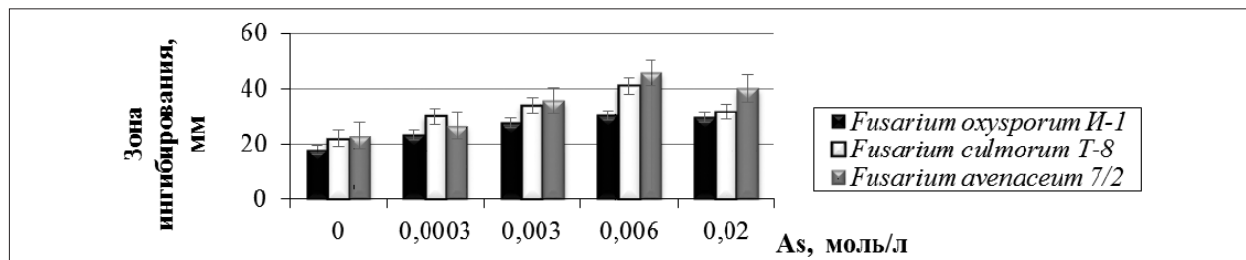


Рис. 7. Зоны угнетения роста грибов водорастворимыми метаболитами *Streptomyces wedmorensis* 38.11 в зависимости от концентрации мышьяка в культуральной среде.

сиканта. В малых концентрациях мышьяк способствовал увеличению интенсивности проростания спор, а в более высокой, напротив, ингибировал этот процесс по сравнению с контролем (рис. 5).

Стимулирующее влияние малой ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л As) концентрации мышьяка на споры прослеживалось на протяжении всего периода наблюдений, тогда как ингибирующее воздействие более высокой ($1 \cdot 10^{-1}$ моль/л As) концентрации достоверно проявилось лишь на заключительном этапе сукцессии – к 21 суткам.

В опыте по изучению накопления биомассы под действием мышьяка установили, что выделенный из импактной по мышьяку почвы штамм 38.11 характеризовался по сравнению со штаммом – 140.4, изолированным из фоновой почвы, большей устойчивостью к токсиканту (рис. 6). При этом действие мышьяка в высоких концентрациях (0,003–0,02 моль/л), как и в случае со спорами, ингибировало накопление биомассы стрептомицетом (рис. 6б).

В присутствии мышьяка менялась и антагонистическая активность стрептомицетных изолятов. Зоны ингибирования тест-культур водорастворимыми метаболитами штамма *S. wedmorensis* 38.11, выделенного из импактной почвы, увеличивались прямо пропорционально увеличению концентрации мышьяка в культуральной среде, на которой был выращен стрептомицет (рис. 7).

Увеличение антифунгальной активности, по сравнению с контролем, прослеживалось в градиенте концентраций мышьяка от $3 \cdot 10^{-4}$ до

$6 \cdot 10^{-3}$ моль/л, при более высокой концентрации ($2 \cdot 10^{-2}$ моль/л As) зоны ингибирования роста грибов существенно не отличались от тех, что имели место при $3 \cdot 10^{-3}$ моль/л As.

Таким образом, реакция природных изолятов стрептомицетов на мышьяк определялась концентрацией токсиканта, продолжительностью его воздействия, а также характером почвы, служившей источником выделения культуры.

Способность природных изолятов к синтезу биологически активных веществ. В ходе изучения структуры комплексов актиномицетов в верхних горизонтах почв вблизи ОХУХО «Марадыковский» в чистую культуру были изолированы более 100 штаммов стрептомицетов. Среди них были выделены культуры с антагонистической активностью в отношении грибных и бактериальных фитопатогенов. Наибольшее количество антагонистически активных штаммов обнаружено в почвах с повышенным содержанием мышьяка, а также в почвах пастбищ, отличающихся более высоким содержанием органического азота и углерода.

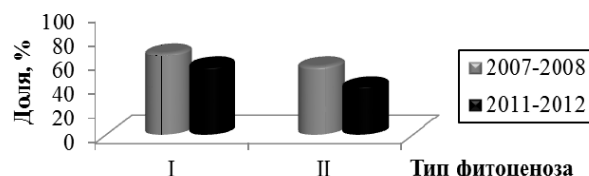


Рис. 8. Доля штаммов, обладающих целлюлозолитической активностью, от общего количества штаммов, выделенных в разные годы из почв луговых (I) и лесных (II) фитоценозов.

Более 50% стрептомицетов, выделенных из почв территории СЗЗ и ЗЗМ ОХУХО «Марадьковский», обладали целлюлозолитической активностью. При этом продуценты целлюлаз встречались как в почвах луговых, так и лесных фитоценозов, однако за шестилетний период производственной деятельности Объекта их доля от общего количества выделенных природных изолятов сократилась на 11 и 16% соответственно (рис. 8).

Заключение

Таким образом, изучение антагонистической и целлюлозолитической активности природных изолятов актиномицетов из почв, отобранных в СЗЗ и ЗЗМ объекта, показало, что почвенные стрептомицеты не утратили за период мониторинговых исследований свои функциональные свойства, что также косвенно свидетельствует в пользу их толерантности к загрязнению продуктами деструкции ХО и обосновывает целесообразность поиска, выявления и выделения среди них культур, пригодных для создания микробных биопрепаратов для ремедиации почв, импактных по мышьяку и фосфорсодержащим ксенобиотикам.

Литература

1. Конвенция о запрещении химического оружия. Проблемы ратификации // Химическое оружие и проблемы его уничтожения. 1996. № 2. С. 5–9.
2. Звягинцев Д. Г. Почва и микроорганизмы. М: Изд-во МГУ, 1987. 256 с.
3. Гузеев В.С., С.В. Левин. Перспективы эколого-микробиологической экспертизы состояния почв при антропогенных воздействиях // Почвоведение. 1991. № 9. С. 50–62.
4. Schütze E., Kothe E. Heavy Metal-Resistant *Streptomyces* in Soil // In: Bio-Geo Interactions in Metal-Contaminated Soils // Soil Biology. 2012. V. 31. P. 163–182.
5. Ашихмина Т.Я., Товстик Е.В., Огородникова С.Ю., Домнина Е.А., Широких И.Г. Численность и разнообразие почвенных актиномицетов вблизи объекта по уничтожению химического оружия «Марадьковский» // Теоретическая и прикладная экология. 2012. № 4. С. 67–72.
6. Товстик Е.В., Огородникова С.Ю., Домнина Е.А., Широких И.Г. Динамика актиномицетных комплексов в почвах лесных фитоценозов вблизи объектов по уничтожению химического оружия «Марадьковский» // Теоретическая и прикладная экология. 2013. № 4. С. 92–98.
7. Практикум по биологии почв: Учеб. пособие / Зенова Г.М., Степанов А.Л., Лихачева А.А., Манучарова Н. А. М.: Издательство МГУ, 2002. 120 с.
8. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т./ Ред. Дж. Хоулт, Н. Криг, П.Снит, Дж. Стейли, С. С Уилльямс. М.: Мир, 1997. Т. 2. 800 с.
9. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1991. 304 с.
10. Практикум по микробиологии / Под ред. А.И.Нетрусова. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.
11. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках: учебник. М.: Высш. шк, 1979. 455 с.
12. Teather R.M., Wood P.J. Use of congo-red polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria the bovine rumen // Appl. Environ Microbiol. 1982. V. 43. P. 777–780.
13. Дмитриев. Е. А. Математическая статистика в почвоведении. М.: Изд-во МГУ, 1972. 292 с.
14. Кондакова Л.В., Огородникова С.Ю., Домрачева Л.И., Ашихмина Т.Я. Влияние метилфосфоновой кислоты на развитие водорослей в почве // Ботанический журнал. 2008. Т. 94. № 1. С. 42–48.
15. Ашихмина. Т.Я., Домрачева Л. И., Огородникова С. Ю., Олькова А. С., Кантор Г. Я., Кондакова Л. В. Изучение воздействия фосфорсодержащих поллютантов на почвенные микроорганизмы // Российский химический журнал. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). 2010. Т. LIV. Т. № 4. С. 183–186.