

УДК 574.24 : 582.547.21

UDC 574.24 : 582.547.21

ОЦЕНКА ФИТОТОКСИЧНОСТИ ПОЧВЫ НА ПОСЕВАХ ПОДСОЛНЕЧНИКА С ПОМОЩЬЮ БИОТЕСТА РЯСКИ МАЛОЙ (*Lemna minor* L.)

ESTIMATE OF SOIL PHYTOTOXICITY OF SUNFLOWER CROPS WITH LEMNA-TEST (*Lemna minor* L.)

Цаценко Людмила Владимировна
д. биол. н., профессор
Кубанский Государственный Аграрный Университет, Краснодар, Россия

Tsatsenko Ludmila Vladimirovna
Dr.Sci. Biol., Professor
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Перстенёва Анастасия Александровна
к. биол. н.

Perstenyeva Anastasia Aleksandrovna
Cand. Biol. Sci.

Гусев Владимир Георгиевич
м.н.с.
Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур им. В.С. Пустовойта, Краснодар, Россия

Gusev Vladimir Georgievich
y.r.
All-Russia Research Institute of Oil Crops of V.S. Pustovoit (VNIIMK), Krasnodar, Russia

В статье рассмотрены подходы к биотестированию почв, подвергшихся воздействию гербицидов. Обсуждаются параметры, которые могут служить для обнаружения токсиканта в почве, анализируются разные тест-системы

Soil bioassay and soil herbicide contamination are reviewed in this paper. The parameters for toxicity detection in soil and different test-systems are discussed

Ключевые слова: БИОТЕСТИРОВАНИЕ, ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ, ТЕСТ-СИСТЕМА, LEMNA MINOR, ГЕРБИЦИД

Keywords: BIOASSAY, RESPONSE-REACTION, TEST-SYSTEM, LEMNA MINOR, HERBICIDE

Введение. Подсолнечник является пропашной культурой. Видовой состав сорной растительности гораздо больший, чем у культур сплошного высева, и прорастают они практически в течение всего периода вегетации. Именно поэтому проблема распространения сорной растительности на посевах этой культуры стоит достаточно остро и заслуживает особого внимания.

Традиционно для борьбы с сорняками используются агротехнические приёмы, но этими мероприятиями не всегда удаётся сдержать рост сорных растений, поэтому применение гербицидов является обязательным. Однако при увеличивающихся объёмах использования гербицидов возрастает необходимость экологической обоснованности их применения. Приходится считаться с фактом высокой биологической активности отдельных препаратов, опасностью их воздействия на элементы агрофитоценоза и окружающую среду в целом.

В настоящее время к гербицидам, разрешённым к применению в России, предъявляются высокие требования. Эти требования включают: высокую биологическую (гербицидную) активность по отношению к сорным растениям и избирательность к культурным; экономическую

эффективность; минимальную опасность отрицательного воздействия на окружающую среду, человека, а также полезную фауну и флору.

Для оценки почвенной среды государственные службы мониторинга и контроля качества почвы используют различные методы, которые можно условно разделить на химические и биологические. Химические методы позволяют количественно оценить интенсивность антропогенного воздействия конкретного загрязняющего вещества на почвенный или водный объект. Однако, наиболее перспективным исследованием фитотоксичности почвы, а также тестированием загрязнения воды пестицидами является биотестирование. Биотестирование – процедура установления токсичности среды с помощью тест-объектов, сигнализирующих об опасности независимо от того, какие вещества и в каком сочетании вызывают изменения жизненно важных функций у тест-объектов. Биологические тест-системы показывают общий индекс токсичности образца и позволяют в короткие сроки ответить на вопрос: присутствуют или нет в среде токсические агенты в опасной для живого организма концентрации. Связь между химической структурой гербицидов и их фитотоксичностью интенсивно изучается уже много лет. Однако каждый раз при исследованиях фитотоксичности почвы или ингибирующего действия химического препарата на рост и развитие растений приходится тщательно подбирать тестирующую систему, поскольку каждый биологический объект имеет индивидуальный отклик. Традиционно в нашей стране для оценки фитотоксичности почвы используется тест на проростках пшеницы, горчицы белой, редиса с красным носиком. Тест на проростках имеет быстрый отклик, анализ ведётся по количеству проросших и непроросших семян. Недостаток теста для биотестирования в том, что на первых этапах онтогенеза развитие организма происходит за счет белков эндосперма, поэтому уловить токсичный эффект анализируемых гербицидов не всегда удаётся.

В Европе и в США для оценки токсичности гербицидов используют рясковый тест, т.е. в качестве тестирующего объекта выступают водные высшие растения семейства рясковых, которые характеризуются простотой строения, быстрой скоростью размножения и высокой чувствительностью.

Среди видов рясок для биотестирования используют ряску малую (*Lemna minor* L.), ряску горбатую (*Lemna gibba* L.), многокоренник обыкновенный (*Spirodella polyrrhiza* L.). При биологическом анализе загрязнения почв на основе водной вытяжки с помощью видов рясок используют многие показатели: количество листочков, наличие или отсутствие корней, а также их количество, сухая или сырая биомасса, длина корней, диаметр листочков, интенсивность фотосинтеза, содержание хлорофилла, интенсивность фототаксиса по изменению количества

хлоропластов в эпистрофном положении. Продолжительность тестирования от 3 до 14 суток. Однако за последние годы наметилась тенденция поиска новых, более информативных методов анализа на основе биологического объекта – видов ряски. В Германии создана компания Lemnates которая проводит анализ почвы на наличие токсикантов на основе *Lemna minor* с помощью прибора сканалайзера, регистрирующего отклонения в цвете с помощью алгоритма цветового образа. Наиболее полно представлена вся информация в области биотестирования на основе ряскового теста на сайте Дж. Кросса «Очарование рясковых» <http://www.motob.org/iwcross/duckweed/>

В данной работе была поставлена цель изучить фитотоксичность почвы с помощью индикаторного организма (*Lemna minor* L.) на токсичность в посевах подсолнечника, где применялись имидазолиноновые гербициды.

Материалы и методы. Образцы почвы были взяты с полей центральной экспериментальной базы ВНИИМК (Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур), г. Краснодар.

В экспериментах исследовалась почва с обработанных гербицидом Евро-Лайтнинг (группа имидазолинонов) участков спустя 2,5 месяца после опрыскивания рабочим раствором. В различных местах исследуемой территории отмерены пять участков размером 1 м² каждый. На этих участках с верхнего слоя (0-10 см глубины) бралась навеска почвы (около 100 г). Затем средняя проба с пяти участков исследовалась непосредственно в опытах по биотестированию. Аналогичная процедура проводилась на контрольных участках, не обработанных изучаемым имидазолиноновым гербицидом.

Также в работе изучали реакцию ряски, как тест-системы на гербициды Трефлан, Гранстар и Евро-Лайтнинг, которые применяются в различных технологиях выращивания подсолнечника.

Трефлан – основной почвенный гербицид против злаковых и многих широколистных сорняков, является основным гербицидом для применения на посевах подсолнечника, рапса, сои, томатов, лука и др. культур. Действующее вещество препарата – трифлуралин.

Гранстар – системный гербицид из группы сульфонилмочевин. Традиционно применяется на посевах пшеницы против одно- и многолетних двудольных сорняков. Однако, его применение возможно и на посевах подсолнечника, устойчивого к данной группе гербицидов. Действующее вещество препарата – трибенурон-метил.

Евро-Лайтнинг – системный гербицид, действующий на двудольные однолетние и некоторые многолетние злаковые сорняки, а также заразиху, амброзию и осоты. Этот гербицид допущен к использованию в Российской Федерации на посевах ИМИ-устойчивых генотипов подсолнечника с 2007 г. (технология возделывания подсолнечника CLEARFIELD). Действующие вещества препарата – имазамокс и имазапир из группы имидазолинонов.

Исследуемые гербициды были представлены в пяти концентрациях. За концентрацию 1X условно был принят самый насыщенный раствор гербицида, являющийся рабочим раствором препарата в полевых условиях в пересчёте на количество жидкости, используемой в лабораторном опыте.

Индикаторный организм и его культивирование. В опытах по биотестированию почвы использовали стационарную культуру растений ряски малой, поддерживаемую на ростовой среде постоянного состава при определённом режиме температуры и освещённости. Минеральная среда представляла собой модификацию среды Штернберга и содержала (мг/л): KNO_3 – 175; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 148; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 45; KH_2PO_4 – 45; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 50; борной кислоты – 0,12; мелассы – 40. Маточную культуру ряски малой поддерживали на этой среде в термолюминостате (спроектирован и изготовлен в Кубанском ГАУ) при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$ и интенсивности света двух люминесцентных ламп (TLD30W 04-IV) 3000 люкс; период освещения растений составлял 10 ч в сутки. Раз в неделю растения пересаживали на свежеприготовленную среду, отбирая интенсивно зелёные и здоровые экземпляры.

Каждый из вариантов опытных образцов, а также контрольные растворы готовили в четырёхкратной повторности. Для биотестирования использовали культуру ряски, пересаженную на свежеприготовленную среду за двое суток до постановки эксперимента. В каждую пробу помещали по 30 листочков, выбирая хорошо развитые группы растений с ярко-зелёной окраской. Все образцы инкубировали в термолюминостате в течение 7 суток; ёмкости накрывали прозрачной целлулоидной плёнкой для предотвращения испарения воды.

Общую токсичность тестируемых образцов оценивали по уровню роста растений *L. minor* в опытных вариантах (с разной концентрацией гербицидов) и в контрольных пробах на вторые, пятые и седьмые сутки теста. Подсчитывали число листочков и определяли коэффициент мгновенного роста ряски малой (r), вычисляемый по формуле:

$$r = (\ln N_t - \ln N_0) / t, \quad (1)$$

где N_0 – исходная численность листочков ряски; N_t – среднее значение числа листочков в вариантах проб через время инкубации t (в сутках).

В числе морфологических признаков листецов ряски малой в опытных и контрольных пробах отмечали сохранение либо изменение их окраски: пожелтение или побледнение (хлороз) в первые дни опыта, полное обесцвечивание (некроз). Отмечали сохранение групп растений ряски (состоящих из 4-6 листецов, связанных гиалиновыми нитями) либо их распад, частичный или полный, до обособленных листецов.

Кроме ряски малой в качестве тест-культур использовались редис красный с белым кончиком и кресс-салат.

В чашки Петри с почвенной вытяжкой помещалось для проращивания 30 семян. Повторность опыта четырёхкратная. Подсчёт длины корешков и количества непроросших семян осуществлялся через 72 часа после начала тестирования.

Результаты и обсуждение. Опыт с тест-культурой *Lemna minor* проводился 15 и 23 октября 2009 года на базе Кубанского Государственного Аграрного Университета (КубГАУ). В каждом сосуде для исследований исходное количество листецов ряски составило 20 штук. Подсчёт прироста листецов проводился регулярно в течение всего периода проведения опыта. По завершению исследования почвы был рассчитан коэффициент мгновенного роста (табл. 1).

Таблица 1 – Рост тест-культуры *Lemna minor* на различных вариантах опыта, КубГАУ, Краснодар, 2009 г.

Вариант	Среднее количество листецов ряски, шт.			Коэффициент мгновенного роста
	1-е сутки	3-е сутки	7-е сутки	
<i>Опыт 15-21 октября</i>				
Контроль	20,1	30,5	34,5	0,078
1-й вариант	24,7	40,7	47,7	0,125
2-й вариант	23,7	39,7	52,0	0,137
<i>Опыт 23-29 октября</i>				
Контроль	21,5	33,0	43,0	0,110
1-й вариант	32,5	45,2	45,5	0,053
2-й вариант	32,2	44,5	51,2	0,065

Примечание: в качестве контроля – вода, 1-й вариант – почва с гербицидом трефлан, 2-й вариант – почва с гербицидом Евро-Лайтнинг.

Результаты анализа указывают на изменение динамики роста тест-культуры. В первый срок отбора прирост был выше в исследуемых вариантах, чем на контроле, во второй срок отбора, прирост на вариантах снижается почти в два раза по сравнению с контролем. Можно предположить, что в первом случае в почвенных пробах находились остатки гербицида, которые вызвали стимулирующее действие.

Кроме ряски малой в качестве тест-культур использовались редис красный с белым кончиком и кресс-салат, поскольку при проведении биотестирования в анализ включается 2-3 тестирующие системы (табл. 2 и 3).

Таблица 2 –Длина корешков у проростков редиса красного с белым кончиком, КубГАУ, Краснодар, 2009 г.

Вариант	Средняя длина корешков проростков в каждой из повторностей, см				Средняя длина корешков проростков по всем повторностям, см
	1	2	3	4	
Без гербицида	0,5	1,1	1,2	1,1	1,0
С гербицидом	0,9	0,8	1,4	1,2	1,1
Δ	0,4*	0,3	0,2*	0,1	0,1
НСР ₀₅	0,3	0,4	0,2	0,5	0,2

Примечание: Δ - разница длины корешков между вариантами опыта;

* - различия достоверны, $p < 0,05$

Таким образом, при использовании редиса красного с белым кончиком в качестве тест-культуры, в двух повторностях из четырёх было обнаружено достоверное влияние почвы с гербицидом на проростки. Причём в варианте почвы с гербицидом длина корешков была больше, чем в контроле, т.е. наблюдался ростостимулирующий эффект имидазолинонового гербицида на корешки проростков редиса красного. Однако, расчёт наименьшей существенной разности (НСР₀₅) по всем четырём повторностям не показал достоверного влияния этого фактора (табл. 2).

Более интенсивный рост корешков проростков у редиса красного на варианте с гербицидом можно объяснить следующим образом. В основе механизма действия гербицидов лежит их многостороннее влияние на рост и развитие целого растения, отдельных его органов, тканей и клеток, на органеллы клетки, физиологические и биохимические процессы. Так же, как в случае стимуляторов роста растений, различные концентрации гербицида могут оказывать на растение противоположное действие: стимулировать рост при одних концентрациях и, угнетать его при других. Весьма интересен и мало изучен вопрос о биохимической сущности действия на растение стимуляторов роста и гербицидов. Очевидно, что эти соединения оказывают на растение определённое физиологическое действие путём влияния на то или иное звено в обмене веществ. Возможно, что имазапир и имазамокс – действующие вещества изучаемого гербицида Евро-Лайтнинг, являются такого рода химическими

соединениями. Полученные результаты и специфическая реакция редиса красного на присутствие в почве имидазолинового гербицида требует дальнейшего изучения.

Таблица 3 – Длина корешков у проростков кресс-салата, КубГАУ, Краснодар, 2009 г.

Вариант	Средняя длина корешков проростков в каждой из повторностей, см				Средняя длина корешков проростков по всем повторностям, см
	1	2	3	4	
Без гербицида	0,3	0,4	0,5	1,1	0,6
С гербицидом	0,3	0,4	0,1	0,1	0,2
Δ	0,0	0,0	0,4*	1,0*	0,4*
НСР ₀₅	0,2	0,3	0,2	0,3	0,1

Примечание: Δ - разница длины корешков между вариантами опыта;

* - различия достоверны, $p < 0,05$

Кресс-салат как тест-культура оказался более чувствителен к присутствию в почве имидазолинов и показал достоверное токсическое влияние гербицида на рост корешков проростков (табл. 3). Их длина была существенно меньше нежели в контрольных вариантах опыта.

Также было проведено исследование реакции ряски малой на различные концентрации трёх гербицидов: Трефлан, Гранстар и Евро-Лайтнинг. Вышеперечисленные гербициды представляют интерес, так как применяются в различных технологиях выращивания подсолнечника. В работе с этими препаратами важным представлялся вопрос о поиске качественных реакций на данные гербициды.

Следует отметить, что данный опыт по выявлению специфических реакций на различных концентрациях гербицидов, является рекогносцировочным, т.е. предварительным. Поэтому были взяты заведомо высокие дозы гербицидов с последующим их многократным разведением для выявления нужного диапазона концентраций, необходимых для дальнейших исследований.

Во время проведения опыта ежедневно фотографировались сосуды с различными концентрациями гербицидов, а также проводился учёт морфологических отклонений у культуры (оценка окраски листочков, наличие хлорозов, некрозов и состояние корней). По окончании эксперимента было подсчитано количество листочков в каждом сосуде, и вычислен коэффициент мгновенного роста (табл. 4).

Таблица 4 – Реакция тест-организма ряски малой на различные дозы гербицидов, ВНИИМК, Краснодар, 2010 г.

Гербицид	Расчётная концентрация	Коэффициент мгновенного роста популяции (r)	Тестовые реакции	
			окраска листецов	специфические реакции листецов
Трефлан	1x - 1/2x	0,33	бледно-коричневая	некроз, бурые корни
	1/4x – 1/8x	роста нет	жёлтая	увядание, бурые корни
	1/16x-1/32x	0,01	жёлтая	бурые корни
	1/128x	роста нет	зелёная	бурые корни
Гранстар	1x-1/2x	0,022	ярко-зелёная	нет
	1/4x-1/8x	0,033	ярко-зелёная	нет
	1/16x	0,005	ярко-зелёная	нет
Евро-Лайтнинг	1x	0,005	зелёная	нет
	1/2x	роста нет	зелёная	нет
	1/4x-1/16x	0,017	ярко-зелёная	нет
	1/8	роста нет	ярко-зелёная	нет
Контроль	-	0,082	ярко-зелёная	нет

- - ряд концентраций объединены, т.к. отмечались сходные реакции

Анализ результатов, представленных в таблице, позволяет заключить, что обнаружение гербицида в почве с помощью ряскового теста можно проводить по изменению окраски листецов и скорости их роста. Видимо специфические реакции не проявляются, т.к. они более характерны при тестировании водных солей тяжелых металлов. Однако, для гербицидов, как было установлено ранее, можно использовать изменение окраски листецов такие как пожелтение листецов (смена зелёной окраски жёлтой), побурение и сохранение неизменной окраски тест-объекта при всех концентрациях например, как у гербицида Евро-Лайтнинг.

Таким образом, на основании полученных результатов, возможно сделать следующие **выводы**:

1. В качестве тест-систем для анализа токсичного действия гербицидов на посевах подсолнечника можно рекомендовать ряску малую и кресс-салат, как чувствительные и информативные организмы-индикаторы.

2. При изучении растворов с различными концентрациями гербицида Трефлан, выявилось сильное токсическое действие гербицида на тест-культуру. На высоких дозах (1х и 1/2х) растения ряски погибли спустя 1-2 суток после начала эксперимента. На всех вариантах с гербицидом Трефлан наблюдалось изменение цвета корней. При дозе гербицида 1/128х прироста особей не наблюдалось, однако окраска листочков была зелёной, а окраска корней – бурой.

3. При изучении вариантов опыта с различными концентрациями гербицида Гранстар изменения окраски листочков и каких-либо морфологических отклонений не наблюдалось. Однако был зафиксирован факт большего прироста особей на более высоких концентрациях, что отличается от реакции ряски на другие гербициды, где отмечалась отрицательная корреляция этих показателей. Количество образовавшихся на листочках дочерних растений в среднем по вариантам опыта было около шести, но их окраска была светлее, чем окраска взрослых листочков. Возможно, такая реакция объясняется действием гербицида Гранстар на клеточном уровне. Являясь ALS-ингибитором, Гранстар блокирует синтез ряда аминокислот и, как следствие, синтез белка, что могло сказаться на физиологическом состоянии вновь образующихся почек листочков.

4. При изучении реакции тест-культуры на различные концентрации гербицида Евро-Лайтнинг в качестве специфической реакции на действующие вещества препарата можно использовать неизменную зеленую окраску растений.

Литература:

1. Цаценко Л.В., Малюга Н.Г. Рясковые – биоиндикаторы агроценоза.-Краснодар, КубГАУ, 2000. - 76с.
2. Цаценко Л.В. Биотестирование загрязнения воды с помощью ряски малой (*Lemna minor* L.) в кн.« Биологический контроль окружающей среды. Биоиндикация и биотестирование. Учеб.пособие. М.:Издательский центр «Академия», 2008. – с. 188-199.
3. Методика биотестирования по проращиванию семян. ,Санитарные правила и нормы САНПиН 2.1.7.573-96 «Гигиенические требования к использованию сточных вод и их осадков для орошения и удобрения». 1996.
4. Fairchild J.F., Ruessler D.S., Heverland P.S. and Carlson A.R. Comparative sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to Sixteen Herbicides. //Arch.Environ.Contam.Toxicol.,1997.N32,p.353-357.
5. Michel A., Jonhson R.D., Duke S.O.,Scheffler B. Dose-response relationships between herbicides with different modes of action and growth of *Lemna paucicostata*: an improved ecotoxicological method //Environmental toxicology and Chemistry, 2004,V.24.N.4. p.546-553.