

КОВАЛЬ ЕКАТЕРИНА ВИКТОРОВНА

**ВЛИЯНИЕ ЦИАНОБАКТЕРИЙ НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ЯЧМЕНЯ В
УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ МЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТОЙ**

03.02.08 – экология (биология)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Тюмень–2019

Работа выполнена на кафедре экологии и природопользования Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Вятский государственный университет».

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент
кафедры экологии и природопользования
ФГБОУ ВО «Вятский государственный
университет»
Огородникова Светлана Юрьевна

Официальные оппоненты:

Воронина Людмила Петровна,
доктор биологических наук, старший
научный сотрудник кафедры агрохимии и
биохимии растений ФГБОУ ВО
«Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова»

Егорова Ирина Николаевна,
кандидат биологических наук, старший
научный сотрудник Сибирского института
физиологии и биохимии растений СО РАН

Ведущая организация:

**ФГБОУ ВО «Башкирский
государственный педагогический
университет им. М. Акмуллы»**

Защита диссертации состоится 26 ноября 2019 года в 10-00 на заседании диссертационного совета Д 999.114.02 ВО «ГАУ Северного Зауралья» по адресу: 625003, г. Тюмень, ул. Республики, 7 Телефон/факс: 8(3452) 29-01-52, e-mail: dissgausz@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного аграрного университета Северного Зауралья и на сайте университета <http://www.tsaa.ru>.

Автореферат разослан «23» сентября 2019 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор с/х наук

Турсумбекова Галина Шалкаровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Серьезную опасность для биологических систем представляют фосфорорганические ксенобиотики, к которым относятся метилфосфоновая кислота (МФК) и ее производные – метилфосфонаты (МФН). Благодаря наличию в составе молекулы связи С–Р, устойчивой к разрушению, МФН характеризуются повышенной персистентностью. Источниками поступления МФН в окружающую среду служат объекты уничтожения фосфорсодержащих отравляющих веществ, а также применение пестицидов на основе алкилфосфонатов (глифосат). Известно, что метилфосфоновая кислота в малых концентрациях вызывает нарушение жизнедеятельности растений, животных, почвенной микробиоты (Огородникова, 2004; Плотникова, 2012; Кондакова и др., 2012).

В условиях загрязнения почв МФН перспективна разработка методов фиторекультивации, основанных на повышении устойчивости растений к действию поллютантов. Ряд прокариот и низших эукариот способны гидролизовать С–Р связь. Цианобактерии (ЦБ) могут приспосабливаться к различным неблагоприятным условиям благодаря особенностям строения и биохимическим процессам, позволяющим накапливать и обезвреживать различные поллютанты. Известны ЦБ устойчивые к фосфорорганическим токсикантам (Домрачева и др., 2008). Преимущества при выживании в неблагоприятных условиях имеют растительно-цианобактериальные ассоциации. Цианобактерии способствуют не только повышению устойчивости растений к действию загрязнителей, но и удалением поллютантов из среды их обитания. В сельском и лесном хозяйстве используются цианобактериальные препараты для повышения биомассы и иммунитета растений. Кроме того, ЦБ используются в качестве тест-объектов для оценки загрязнения окружающей среды (Фокина и др., 2017).

Цель исследований – оценка влияния цианобактерий и природных многовидовых биопленок на биохимические показатели и рост растений ячменя в условиях загрязнения среды метилфосфоновой кислотой.

Задачи исследований:

1. Изучить влияние метилфосфонатов (метилфосфоновой кислоты и глифосата) на жизнедеятельность цианобактерий *Nostoc muscorum* Ag., *N. paludosum* Kütz., *N. linckia* (Roth.) Born and Flah. и многовидовых биопленок с доминированием *N. Commune* Vaucher ex Bornet & Flahault, определить наиболее чувствительные биохимические показатели жизнедеятельности цианобактерий, перспективные в качестве тестов на действие метилфосфонатов.
2. Выявить наиболее устойчивые к действию метилфосфонатов виды цианобактерий на примере альгологически чистых культур *N. muscorum*, *N. paludosum*, *N. linckia* и природных биопленок с доминированием *N. commune*.
3. Изучить влияние цианобактериальной обработки семян культурами *N. muscorum*, *N. paludosum*, *N. linckia* и природными биопленками с доминированием *N. commune* на жизнедеятельность растений, выявить виды цианобактерий, повышающие устойчивость растений к действию метилфосфоновой кислоты.
4. Определить наиболее эффективный способ цианобактериальной обработки (внесение в субстрат выращивания, инокуляция семян при проращивании) для повышения

устойчивости растений в условиях загрязнения среды выращивания метилфосфоновой кислотой.

Научная новизна работы. Впервые выявлены эффекты влияния МФК и глифосата (ГЛ) на содержание хлорофилла *a* и интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в клетках ЦБ. Установлено, что более устойчивы к действию водных растворов МФН чистые культуры ЦБ, чем многовидовые биопленки с доминированием *N. commune* (БП). Отмечено, что обработка семян ячменя ЦБ ингибирует активность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в растительных клетках, стимулирует работу антиоксидантной системы (накопление антоцианов и каротиноидов), а также оказывает ростостимулирующее действие на растения ячменя в условиях загрязнения среды МФК. Доказано, что наиболее эффективным способом цианобактериальной интродукции для повышения устойчивости растений в загрязненной МФК среде, является инокуляция семян при проращивании. В опытах на водной культуре инокуляция семян многовидовыми БП наиболее эффективна, по сравнению с действием на растения альгологически чистых культур ЦБ. В опытах на песке, обработка семян ячменя культурами ЦБ оказывает защитное действие на растения в условиях загрязнения МФК.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты исследований являются перспективными для разработки микробиологических методов и биопрепарата для фиторекультивации почв, загрязненных МФН, основанных на повышении устойчивости растений к действию МФК (УМНИК, договор № 9858 ГУ2/2015).

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс при чтении курсов лекций «Техногенные системы и экологический риск» и «Экологически опасные факторы» при подготовке бакалавров и магистров в Вятском государственном университете (акт внедрения №1 от 2019 года).

Положения, выносимые на защиту:

1. По изменению биохимических показателей в клетках цианобактерий (содержание хлорофилла *a* и интенсивность процессов перекисного окисления липидов) наиболее устойчивыми к действию метилфосфоновой кислоты и глифосата являются альгологически чистые культуры цианобактерий, по сравнению с многовидовыми цианобактериальными биопленками. В ряду *N. linckia* – *N. muscorum* – *N. paludosum* устойчивость к метилфосфонатам снижается. Многовидовые биопленки цианобактерий с доминированием *N. commune* наиболее чувствительны к действию метилфосфонатов.
2. Цианобактерии обладают фитопротекторными свойствами, что проявляется в снижении токсических эффектов метилфосфонатов на растения ячменя.
3. Для снижения фитотоксичности метилфосфоновой кислоты наиболее эффективной является цианобактериальная инокуляция семян ячменя при проращивании.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены и обсуждены на конференциях: "II (X) Международная Ботаническая конференция молодых ученых" (Санкт-Петербург, 2012); "Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем" (Киров, 2012, 2014, 2016; 2018); "Молодежь и наука на Севере" (Сыктывкар, 2013); "Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий" (Калининград, 2014); "Экотоксикология-2014" (Тула, 2014); "Экологические проблемы промышленных городов" (Саратов, 2015); "Растения в условиях

глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий" (Петрозаводск, 2015); "Водоросли и цианобактерии в природных и сельскохозяйственных экосистемах" (Киров, 2015); "Механизмы устойчивости и адаптации биологических систем к природным и техногенным факторам" (Киров, 2015); "Актуальные проблемы биологии и экологии" (Сыктывкар, 2016); "Экология родного края: проблемы и пути решения" (Киров, 2016; 2017), «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды» (Иркутск, 2018).

Личное участие автора. Анализ литературных источников по теме исследования, планирование экспериментов, разработка методики отдельных опытов, выполнение анализов, обработка полученных результатов и формулировка выводов выполнены лично автором.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов и списка литературы. Работа содержит 147 страниц машинописного текста, включает 16 таблиц, 31 рисунок. Список цитируемой литературы включает 316 источников, в том числе 118 – на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Проблема химического загрязнения окружающей среды метилфосфонатами и их действие на живые организмы (обзор литературы)

Проанализированы работы по вопросам химического загрязнения окружающей среды специфическими поллютантами – МФК и ГЛ (Жемчужин, 1985; Федке, 1985; Ашихмина, 2002; Савельева и др., 2002; Кузнецова, Чмиль, 2010). Рассматривается их влияние на живые организмы и особенности их поведения в природе (Огородникова и др., 2004; Кондакова и др., 2005; Скоробогатова и др., 2005; Щербакова и др., 2005; Домрачева и др., 2008; Маслова и др., 2010; Плотникова, 2012; Аюшинова, 2015; Товстик, 2015). Освещены вопросы физиолого-биохимических ответных реакций фототрофных организмов – растений и ЦБ, а также растительно-микробных комплексов на действие поллютантов (Quinn, 1989; Quintelas, Tavares, 2002; Трефилова, 2008; Morin et al., 2006; Choudhary et al., 2007; Yilmazer, Saracoglu, 2009; Ye et al., 2010; Фокина и др., 2017).

Глава 2. Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали альгологически чистые культуры цианобактерий *N. linckia* (Roth) Born. et Flah., *N. muscorum* Ag., *N. paludosum* Kütz, многовидовые природные цианобактериальные пленки с доминированием *N. commune*. Культуры ЦБ предоставлены Вятской государственной сельскохозяйственной академией из коллекции фототрофных микроорганизмов. Природные биопленки с доминированием ЦБ *N. commune* – многовидовые сообщества фототрофных и сапротрофных микроорганизмов. Основой видового состава биопленки были: *Nostoc commune* (доминирующий вид), *N. punctiforme*, *Leptolyngbya foveolarum*, *Plectonema nostocorum* и другие (Домрачева и др., 2007).

В опытах по изучению ответных реакций растений на действие МФК и ЦБ использовали яровую ячмень сорта Новичок. Главное достоинство сорта в том, что это

первый в России устойчивый к ионам H^- и Al^{3+} на бедных дерново-подзолистых почвах (Головки и др., 2004; Родина и др., 2007).

Были проведены 2 серии опытов:

1) Изучение эффектов метилфосфоновой кислоты и глифосата на показатели жизнедеятельности ЦБ и многовидовых БП. Цианобактерии и БП гомогенизировали и инкубировали на растворах МФК и ГЛ в течение суток. Через 24 часа определяли содержание хлорофилла *a* и активность ПОЛ в клетках ЦБ. Контроль – дистиллированная вода. Титр культур ЦБ был в диапазоне от $1,5 \cdot 10^7$ – $1,9 \cdot 10^8$ кл./мл.

2) Изучение влияния различных способов цианобактериальной обработки растений (цианобактериальной интродукции в среду выращивания и предпосевной инокуляции семян ЦБ при проращивании) на жизнедеятельность растений ячменя, выращенного в условиях загрязнения МФК. Растения выращивали в водной и песчаной культуре.

А) Влияние цианобактериальной интродукции (добавление в среду выращивания) и метилфосфоновой кислоты на жизнедеятельность растений ячменя, выращенных в условиях водной культуры. Семена ячменя проращивали в чашках Петри на дистиллированной воде в течение 7 дней. В дальнейшем растения выращивали в водной культуре, для которой использовали классический питательный раствор Кнопа в следующих вариантах: питательный раствор Кнопа (контроль); раствор Кнопа с добавлением ЦБ или БП (К+ЦБ); растворы МФК, приготовленные на растворе Кнопа ($5 \cdot 10^{-4}$ и $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л); и аналогичные растворы МФК, на растворе Кнопа, с добавлением гомогенизированной суспензии культур ЦБ или БП. На 14-й день опыта определяли интенсивность процессов ПОЛ в листьях и корнях растений, содержание пластидных и антоциановых пигментов, показатели линейного роста. Титр ЦБ в опытах составлял $8,7 \cdot 10^4$ кл./мл и $1,4 \cdot 10^5$ кл./мл.

Б) Влияние цианобактериальной инокуляции семян на растения ячменя, выращенные в условиях загрязнения среды метилфосфоновой кислотой (водная культура). Семена ячменя проращивали в чашках Петри на дистиллированной воде в присутствии гомогенизированной суспензии ЦБ и БП и без них. Семидневные проростки ячменя пересаживали в сосуды в водную среду, в качестве которой использовали питательный раствор Кнопа (контроль), растворы МФК ($5 \cdot 10^{-4}$ и $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л), приготовленные на растворе Кнопа. На 14-й день определяли интенсивность процессов ПОЛ в листьях и корнях растений, содержание пластидных и антоциановых пигментов, показатели линейного роста. Титр культуры клеток ЦБ и суспензии БП в опытах был в диапазоне $4,6 \cdot 10^7$ – $1,6 \cdot 10^8$ кл./мл.

В) Влияние цианобактериальной инокуляции семян на растения ячменя, выращенные в условиях загрязнения среды метилфосфоновой кислотой (песчаная культура). Семена ячменя проращивали в чашках Петри на дистиллированной воде в присутствии гомогенизированной суспензии культур ЦБ, многовидовых БП с доминированием ЦБ и без них. Семидневные проростки ячменя пересаживали в сосуды в песчаный субстрат, увлажненный до 60 % от полной влагоемкости растворами токсикантов для опытных растений и раствором Кнопа – для контрольных растений, в дальнейшем увлажнение субстрата поддерживалось добавлением питательного раствора Кнопа. Для экспериментов на песке использовали раствор МФК большей концентрации, чем для опытов на водной культуре, что обусловлено поглотительной способностью песчаного

субстрата. Растворы МФК (0,01 и 0,05 моль/л), приготовленные на питательном растворе Кнопа, вносились однократно в субстрат. В дальнейшем полив растений осуществлялся питательным раствором Кнопа. На 14-й день определяли содержание пластидных пигментов и антоцианов в листьях, активность процессов ПОЛ в корнях и листьях, а также показатели линейного роста ячменя. Титр культуры клеток ЦБ и суспензии БП с доминированием ЦБ в опытах составлял $n \cdot 10^7$ кл./мл.

Титр клеток ЦБ и БП определяли с использованием камеры Горяева (Практикум по микробиологии..., 2005). Цианобактерии выбирали по возрасту и титру клеток в фазу экспоненциального роста. Возраст БП исчислялся с момента внесения сухой пленки в питательную среду Громова.

Содержание хлорофилла *a* в клетках ЦБ оценивали фотометрически при длинах волн 665 и 750 нм (Aminot, Rey, 2000). Интенсивность процессов ПОЛ в корнях, листьях растений и клетках ЦБ анализировали по цветной реакции тиобарбитуровой кислоты с малоновым диальдегидом, образующимся в процессе ПОЛ (Лукаткин, 2002). Количественное определение антоцианов в проростках ячменя проводили фотометрически при длинах волн 510 и 657 нм в соответствии с методикой (Муравьева, 1987). Содержание хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов определяли фотометрически в ацетоновой вытяжке при длинах волн 662, 644 нм (хлорофиллы) и 440,5 нм (каротиноиды) (Шлык, 1971). Для оценки воздействия МФК и ЦБ на ростовые процессы отбирали по 20 растений каждого варианта, разделяли по органам, измеряли длину корней и побегов (ГОСТ 12038-84). Полученные данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов (Лакин, 1973). На рисунках и в таблицах приведены средние арифметические величины со стандартным отклонением. При доверительной вероятности $P \geq 95\%$ находили t-критерий Стьюдента, указывающий на достоверность различий.

Глава 3. Влияние метилфосфоновой кислоты и глифосата на показатели жизнедеятельности цианобактерий и многовидовых биопленок

3.1. Действие метилфосфоновой кислоты на альгологически чистые культуры цианобактерий и многовидовые биопленки с доминированием *Nostoc commune*

Метилфосфоновая кислота в концентрациях $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л и более оказывает летальное действие на клетки ЦБ. В опытах на альгологически чистых культурах ЦБ выявлено, что МФК в диапазоне концентраций ($1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) в большинстве вариантов, вызывала повышение содержания в клетках хлорофилла *a*. При этом линейной зависимости доза – реакция не установлено (рис. 1). Среди альгологически чистых культур ЦБ наиболее чувствителен к действию МФК вид *N. paludosum*, что проявилось в значительном изменении содержания хлорофилла *a* и накоплении продукта ПОЛ (при действии МФК самой высокой концентрации).

В опыте с природными многовидовыми биопленками с доминированием ЦБ, с ростом концентрации токсиканта отмечали значительное уменьшение накопления хлорофилла *a* (рис. 1 Г).

Снижение содержания хлорофилла *a* в большинстве опытов сопровождалось повышением накопления продуктов ПОЛ в клетках ЦБ, что свидетельствует об окислительной деструкции молекул пигмента.

На основании проведенных опытов определены наиболее устойчивые к действию МФК ЦБ. В ряду *N. linckia* – *N. muscorum* – *N. paludosum* – БП с доминированием *N. commune* устойчивость ЦБ к действию МФК снижается.

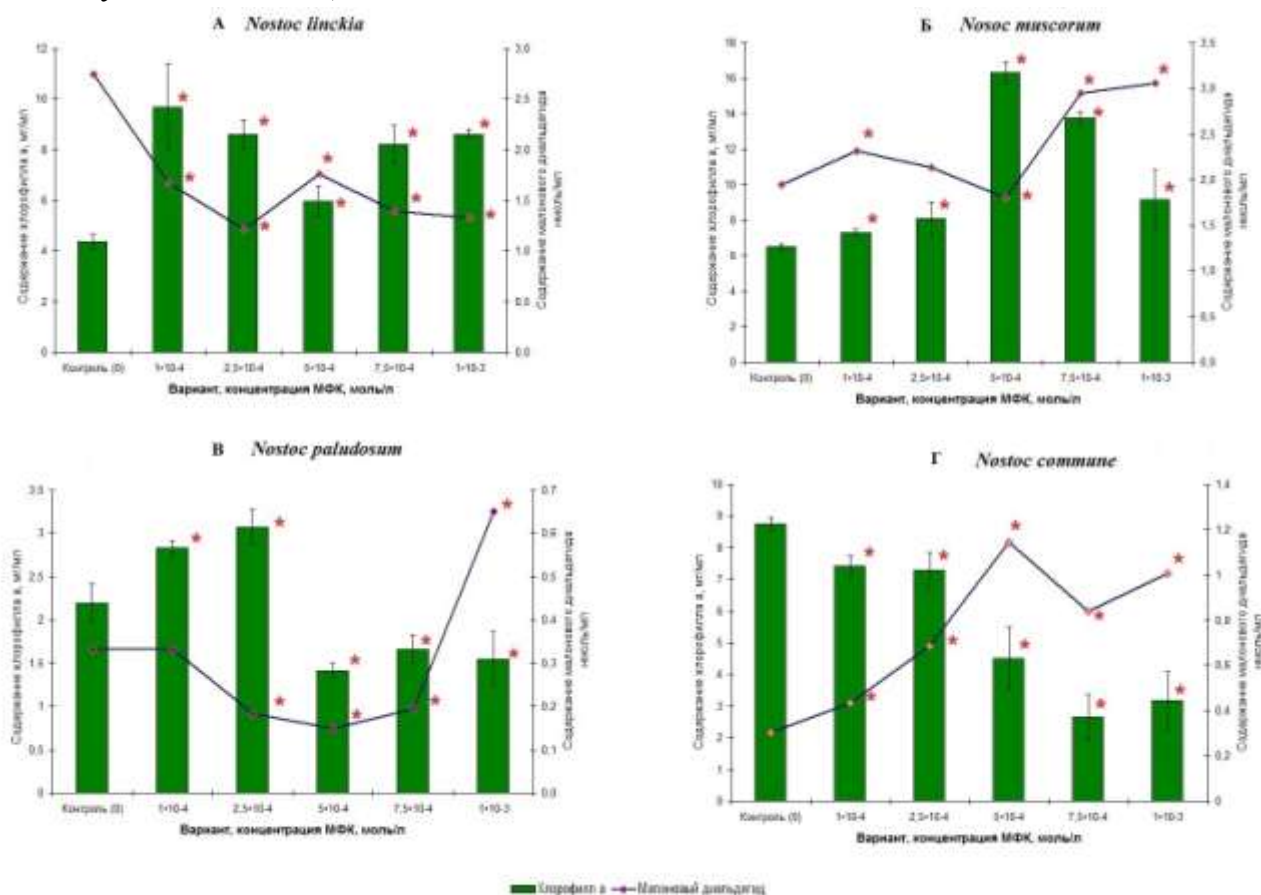


Рис. 1. Содержание хлорофилла *a* и малонового диальдегида в клетках цианобактерий и природных многокомпонентных биопленок через сутки после инкубации на растворах метилфосфоновой кислоты: А – *N. linckia*; Б – *N. muscorum*; В – *N. paludosum*; Г – биопленки ЦБ с доминированием *N. commune*.

Примечание: здесь далее * – различия достоверны при $p \leq 0,05$.

3.2. Влияние глифосата на альгологически чистые культуры цианобактерий и многовидовые биопленки с доминированием *Nostoc commune*

Глифосат в концентрации $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л вызывал разрушение хлорофилла *a* и гибель клеток ЦБ. Установлено, что многовидовые БП с доминированием ЦБ более чувствительны к действию ГЛ, чем альгологически чистые культуры ЦБ, что проявилось в значительном снижении содержания хлорофилла *a* и активации процессов ПОЛ в клетках (рис. 2). Как и в опытах с МФК, среди альгологически чистых культур ЦБ *N. paludosum* отличалась повышенной чувствительностью. МФК вызывала снижение накопления хлорофилла *a* на 40% от уровня контроля и активацию процессов ПОЛ в клетках ЦБ.

Выявлена зависимость между показателями содержания хлорофилла *a* и уровнем МДА. Отличительной особенностью действия ГЛ на ЦБ было снижение количества хлорофилла *a*, тогда как в опытах с МФК отмечали рост содержания зеленого пигмента. Изменение содержания хлорофилла *a* было более чувствительно к действию метилфосфонатов, чем интенсивность процессов ПОЛ.

Как и в опытах с МФК в ряду *N. linckia* – *N. muscorum* – *N. paludosum* – БП с доминированием *N. commune* устойчивость ЦБ к действию ГЛ снижается.

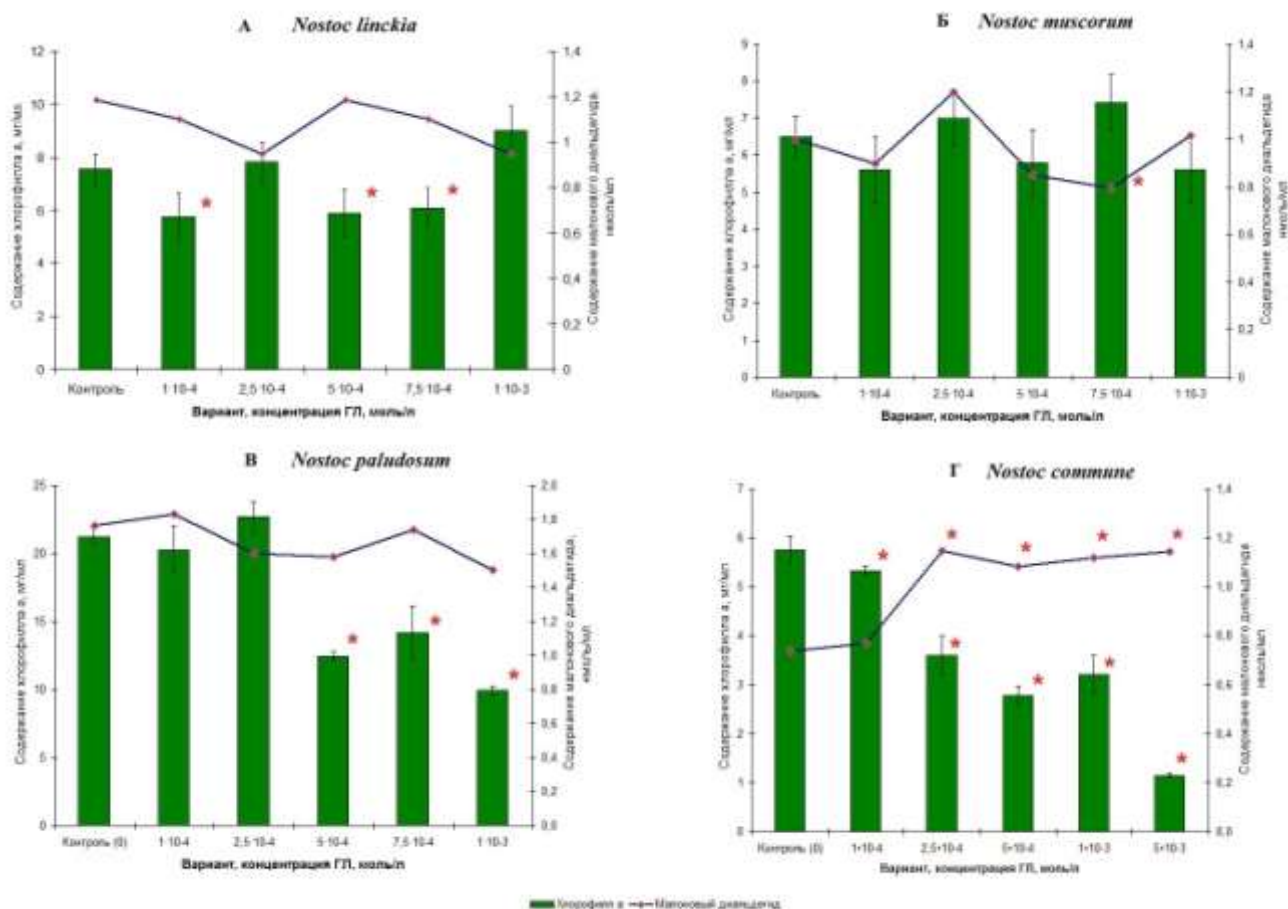


Рис. 2. Содержание хлорофилла *a* и малонового диальдегида в клетках цианобактерий и природных многовидовых биопленок через сутки после инкубации на растворах глифосата: А – *N. linckia*; Б – *N. muscorum*; В – *N. paludosum*; Г – многокомпонентные биопленки с доминированием *N. commune*.

В опытах по изучению токсичности водных растворов метилфосфонатов установлено, что альгологически чистые культуры цианобактерий наиболее устойчивы к их действию. Устойчивость цианобактерий к метилфосфонатам в ряду *N. linckia* – *N. muscorum* – *N. paludosum* снижается. Наиболее чувствительны к метилфосфонатам природные многокомпонентные биопленки с доминированием *N. commune*, вероятно, утратившие природные механизмы устойчивости в результате использования их в водной среде и гомогенизации.

Глава 4. Изучение эффективности различных способов цианобактериальной обработки растений, выращенных в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой (водная культура)

4.1. Влияние метилфосфоновой кислоты и цианобактерий, присутствующих в среде выращивания, на жизнедеятельность растений ячменя

В среду выращивания (вода) вносили МФК и альгологически чистые культуры ЦБ, которые по результатам предыдущих опытов были наиболее устойчивы к действию МФК (*N. linckia* и *N. muscorum*).

Метилфосфоновая кислота и *N. linckia* вызывали активацию процессов ПОЛ в корнях и листьях ячменя (рис. 3 А). Наряду с накоплением МДА в клетках опытных растений происходило снижение уровня пластидных пигментов – хлорофиллов и каротиноидов (табл. 1).

Цианобактериальная обработка *N. linckia* способствовала активации антиоксидантной защиты в клетках только в варианте с действием МФК в низкой концентрации ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л). В варианте с совместным действием ЦБ и МФК ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) отмечали накопление в листьях веществ с антиоксидантными свойствами – антоцианов и каротиноидов, а также возрастание уровня хлорофиллов, по сравнению с МФК ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) (рис. 3 А., табл. 1).

Таким образом, присутствие ЦБ *N. linckia* в среде выращивания не оказывало выраженного защитного эффекта на растения ячменя при загрязнении МФК в условиях водной культуры.

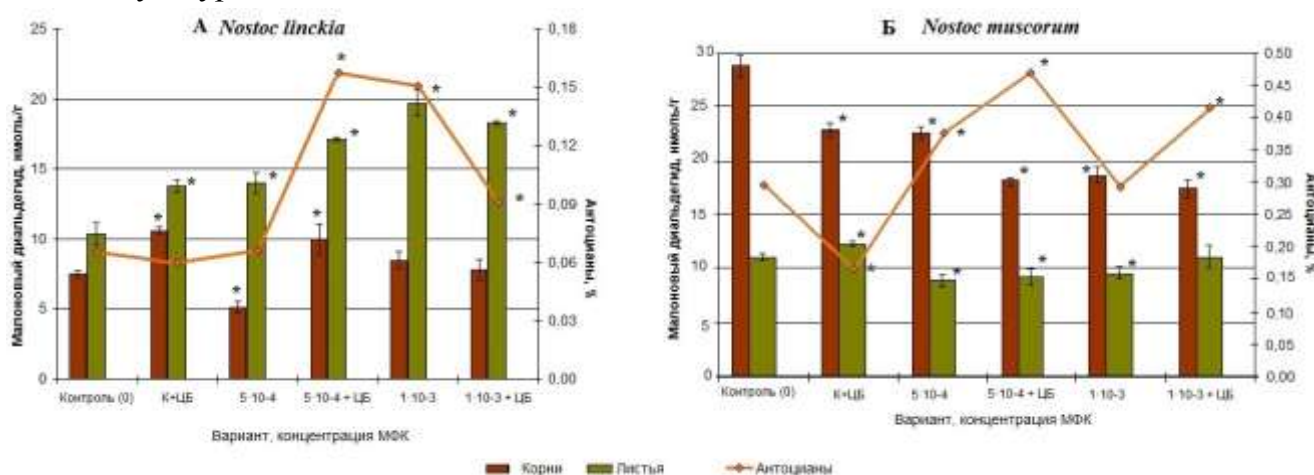


Рис. 3. Влияние метилфосфоновой кислоты и цианобактерий на интенсивность процессов перекисного окисления липидов в корнях и листьях ячменя и количество антоцианов: А – *N. linckia*; Б – *N. muscorum*

Присутствие в водной среде выращивания ЦБ *N. muscorum* в большей степени оказывало протекторный эффект на растения ячменя при загрязнении МФК. Отмечали снижение интенсивности процессов ПОЛ в корнях ячменя во всех вариантах опыта (рис. 3 Б). Добавка в среду, загрязненную МФК ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л), ЦБ *N. muscorum* приводила к снижению содержания МДА в корнях растений больше, чем в опыте с МФК без ЦБ. Интенсивность процессов ПОЛ в листьях опытных вариантов не изменялась и была близка к контролю.

При совместном действии ЦБ и МФК отмечали повышенное накопление антоцианов в листьях, выполняющих защитную функцию в растениях (рис. 3 Б).

В листьях опытных растений, по сравнению с контролем, происходило накопление каротиноидов (табл. 1). Самое высокое содержание жёлтых пигментов отмечали в листьях растений, выращенных в присутствии ЦБ и в вариантах с действием МФК в низкой концентрации ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Количество хлорофиллов в листьях ячменя во всех вариантах было выше, чем в контроле (табл. 1). В вариантах с совместным действием ЦБ и МФК количество зеленых пигментов в листьях было ниже, по сравнению с вариантами с

отдельным действием ЦБ и МФК. Показатели линейного роста опытных растений были близки к контролю.

Таким образом, присутствующие в среде выращивания *N. muscorum* и *N. linckia* вызвали биохимические изменения в клетках ячменя, способствовали активации антиоксидантной защиты, но не снижали фитотоксическое действие МФК в условиях водной культуры. Альгологически чистые культуры ЦБ, проявившие устойчивость к действию МФК, были малоэффективны для повышения жизнеспособности растений при данном способе интродукции.

Таблица 1

Влияние метилфосфоновой кислоты и цианобактериальной интродукции в среду выращивания на накопление пигментов в листьях ячменя

Вариант, МФК моль/л	<i>N. linckia</i>		<i>N. muscorum</i>	
	хлорофилл ($a+b$)	каротиноиды	хлорофилл ($a+b$)	каротиноиды
	содержание, % к контролю			
ЦБ	69*	50*	160*	137*
$5 \cdot 10^{-4}$	78*	49*	186*	174*
$5 \cdot 10^{-4}$ +ЦБ	97	72*	135*	126*
$1 \cdot 10^{-3}$	76*	74*	134*	119
$1 \cdot 10^{-3}$ +ЦБ	80*	78*	120	111

Примечание: здесь и далее * – различия достоверны при $p \leq 0,05$.

4.2. Влияние цианобактериальной инокуляции семян при проращивании на жизнедеятельность растений, выращенных в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой

Семена ячменя проращивали в присутствии альгологически чистых культур ЦБ *N. muscorum*, *N. linckia* и природных многокомпонентных биопленок с доминированием *N. commune*. Растения ячменя выращивали в водной культуре.

Инокуляция семян альгологически чистыми культурами ЦБ *N. muscorum* и *N. linckia* вызывала изменение биохимических процессов в клетках ячменя. Отмечали снижение интенсивности процессов ПОЛ в листьях растений, обработанных при проращивании ЦБ *N. muscorum*, и корнях всех опытных растений (рис. 4). Происходило накопление каротиноидов, выполняющих защитную функцию (табл. 2). Содержание вакуолярных пигментов – антиоксидантов, напротив, снижалось.

Инокуляция семян ЦБ *N. muscorum* и *N. linckia* не оказывала выраженного протекторного действия на растения, выращенные в присутствии МФК. Отмечали активацию окислительных процессов в листьях растений в варианте с действием МФК ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) и *N. linckia* (рис. 4 А), которая проявилась в накоплении продуктов ПОЛ. Однако, в корнях, при совместном действии *N. linckia* и МФК интенсивность процессов ПОЛ была ниже (рис. 4 А). В вариантах с МФК инокуляция семян ЦБ *N. muscorum* приводила к снижению количества МДА в корнях ячменя (рис. 3 Б). На фоне роста активности процессов ПОЛ в листьях в варианте с МФК ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) и ЦБ *N. linckia*

отмечали накопление антоцианов (табл. 2). Инокуляция семян *N. muscorum*, напротив, стимулировала накопление каротиноидов в листьях в присутствии МФК.

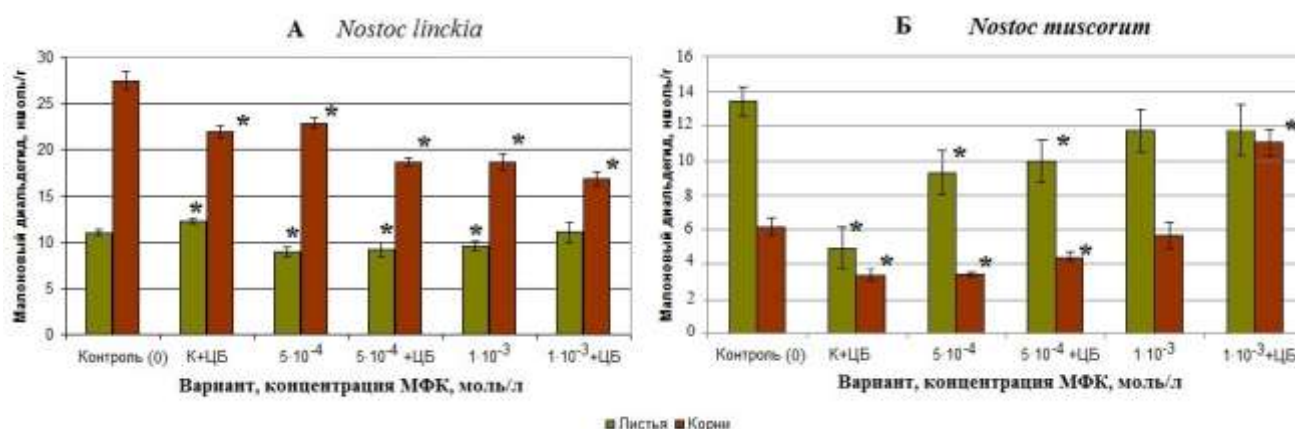


Рис. 4. Влияние метилфосфоновой кислоты и инокуляции семян цианобактериями на интенсивность процессов перекисного окисления липидов в корнях и листьях ячменя:

А – *N. linckia*; Б – *N. muscorum*.

Таблица 2

Влияние метилфосфоновой кислоты и цианобактериальной инокуляции семян при проращивании на накопление пигментов в листьях ячменя

Вариант, МФК моль/л	<i>N. muscorum</i>		<i>N. linckia</i>	
	каротиноиды	антоцианы	каротиноиды	антоцианы
	содержание, % к контролю			
ЦБ	230*	72*	114	57*
5·10 ⁻⁴	214*	208*	158*	127*
5·10 ⁻⁴ +ЦБ	223*	111	106	159*
1·10 ⁻³	146*	332*	101	99
1·10 ⁻³ +ЦБ	169*	361*	101	141*

Биохимические изменения в клетках направлены на адаптацию растений к стрессовым условиям. Результатом метаболических перестроек в клетках является рост и развитие растений. Установлено, что в большей степени оказывает ростостимулирующее действие на растения ЦБ *N. muscorum*, по сравнению с *N. linckia*. В условиях загрязнения МФК цианобактериальная обработка семян не снижала фитотоксического действия МФК на растения, было отмечено ингибирование линейного роста проростков (рис. 5).

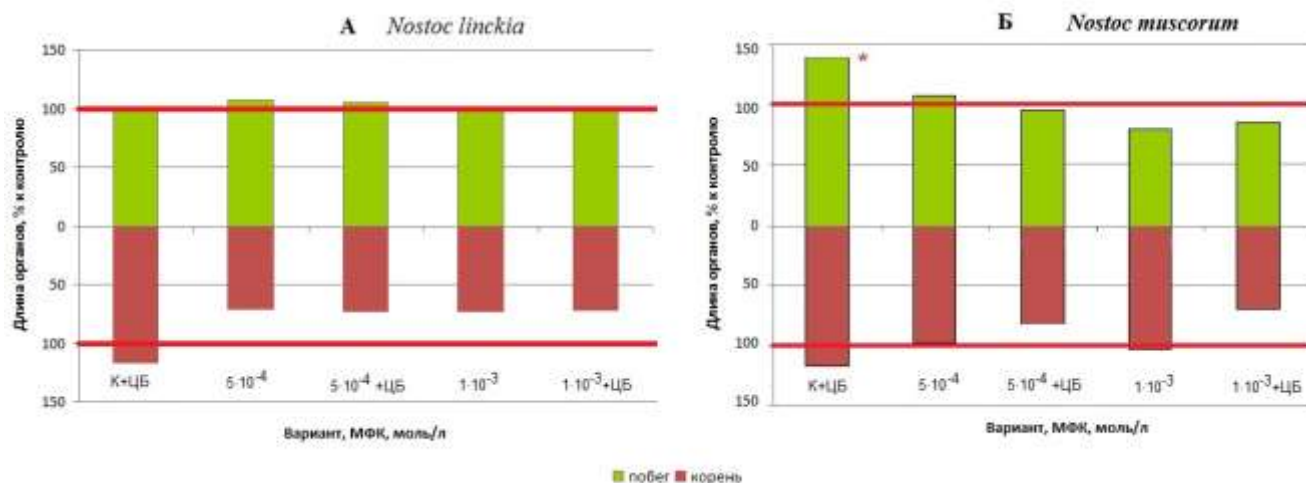


Рис. 5. Влияние метилфосфоновой кислоты и инокуляции семян цианобактериями на показатели линейного роста ячменя (водная культура):
А – *N. linckia*; Б – *N. muscorum*

Инокуляция семян биопленками с доминированием *N. commune* оказывала выраженное протекторное действие на растения ячменя в условиях загрязнения МФК. В опытах с действием МФК инокуляция семян БП вызывала снижение до контрольного уровня интенсивности процессов ПОЛ в листьях и корнях ячменя, по сравнению с растениями, которые не подвергались обработке многовидовыми БП (рис. 6).

Наибольшую эффективность инокуляции семян природными БП с доминированием ЦБ *N. commune* отмечали в опытах с действием на растения МФК высокой концентрации ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л). Происходило снижение интенсивности процессов ПОЛ в листьях и накопление каротиноидов на 27% от контроля, что свидетельствует об активации антиоксидантной защиты.

Инокуляция семян биопленками с доминированием *N. commune* стимулировала линейный рост ячменя (рис. 7). Обработка семян биопленками с доминированием *N. commune* снижала фитотоксическое действие МФК. Высота растений и длина корней в опытах с действием МФК и БП была выше, чем в вариантах без обработки семян БП.

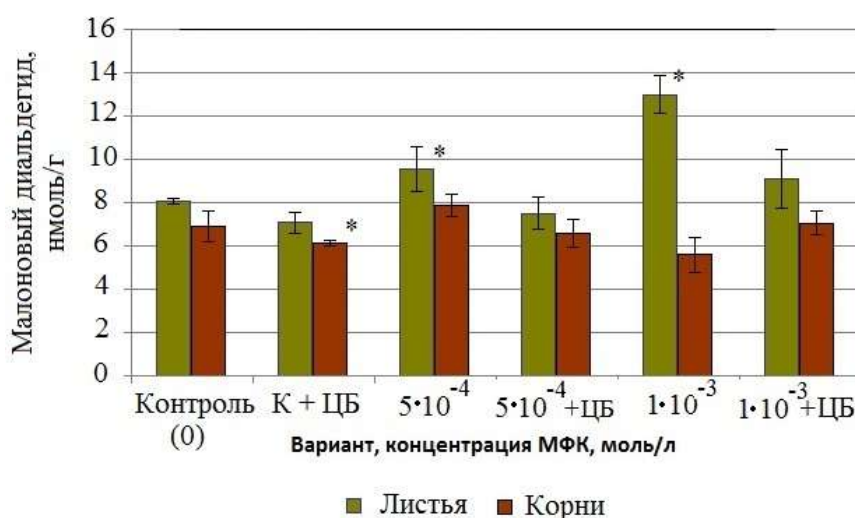


Рис. 6. Влияние инокуляции семян природными многовидовыми биопленками с доминированием *N. commune* и метилфосфоновой кислоты в водной среде выращивания на интенсивность процессов ПОЛ

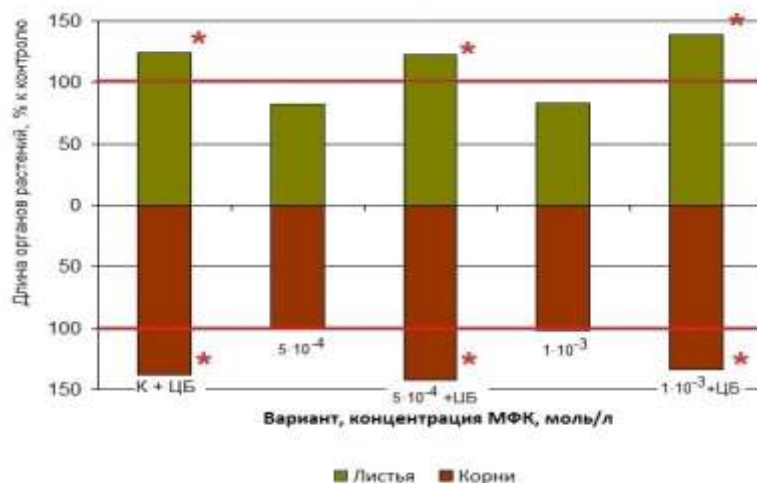


Рис. 7. Влияние инокуляции семян природными многовидовыми биопленками с доминированием *N. commune* и метилфосфоновой кислоты в водной среде выращивания на ростовые показатели ячменя

В опытах на водной культуре установлено, что инокуляция семян при проращивании является наиболее эффективным способом цианобактериальной интродукции для повышения устойчивости растений в условиях загрязнения МФК. Инокуляция семян многовидовыми биопленками с доминированием *N. commune* в большей степени снижает фитотоксическое действие МФК, по сравнению с действием альгологически чистых культур ЦБ.

Глава 5. Влияние цианобактериальной инокуляции семян при проращивании на жизнедеятельность растений, выращенных в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой (песчаная культура)

Семена ячменя при проращивании инокулировали альгологически чистыми культурами ЦБ *N. muscorum*, *N. linckia*, *N. paludosum* и природными биопленками с доминированием *N. commune*. В среду выращивания вносили МФК в виде раствора с концентрацией на порядок выше, чем в опытах на водной культуре, что обусловлено большей поглощающей способностью песчаного субстрата.

Инокуляция семян ЦБ *N. linckia* приводила к снижению интенсивности процессов ПОЛ в листьях (рис. 8 А). Обработка семян ЦБ *N. paludosum* вызывала снижение накопления МДА в корнях ячменя (рис. 8 В). Инокуляция семян альгологически чистыми культурами ЦБ оказывала протекторное действие на растения, которые выращивали в условиях загрязнения песка МФК. В опытах с действием МФК, отмечали снижение интенсивности процессов ПОЛ в листьях ячменя, по сравнению с растениями, которые не обрабатывали ЦБ. Инокуляция семян ЦБ *N. paludosum* в большей степени способствовала снижению количества МДА в клетках растений, выращенных в присутствии с МФК (рис. 8 В). Наиболее чувствительны к ЦБ инокуляции были листья, накопление в них МДА было ниже, чем в варианте с МФК.

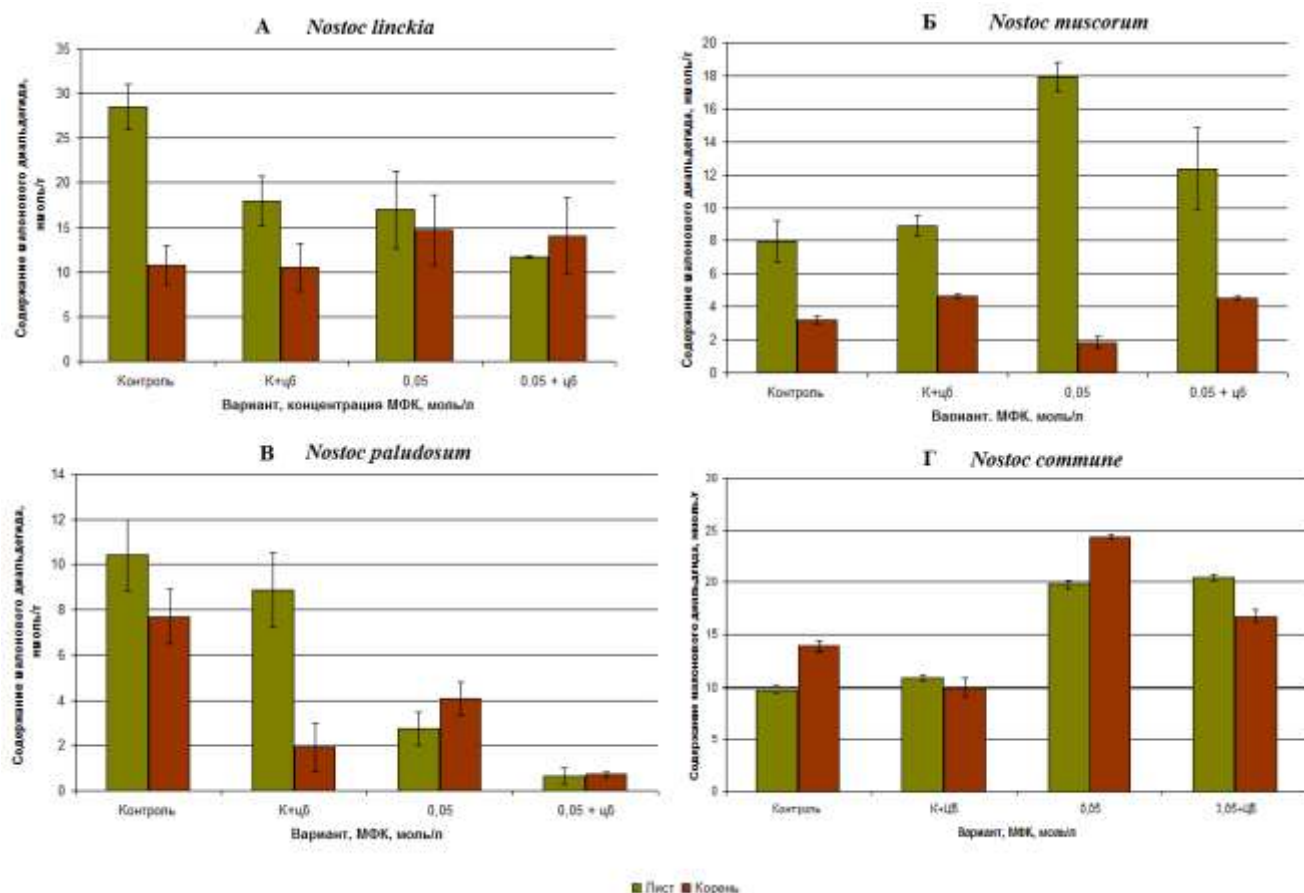


Рис. 8. Влияние метилфосфоновой кислоты и инокуляции семян цианобактериями и природными биопленками на интенсивность процессов перекисного окисления липидов в корнях и листьях ячменя: А – *N. linckia*; Б – *N. muscorum*; В – *N. paludosum*; Г – многокомпонентные биопленки с доминированием *N. commune*.

Снижение интенсивности процессов ПОЛ, возможно, происходило в результате активации антиоксидантной защиты в клетках растений. В условиях загрязнения МФК, ЦБ инокуляция растений вызвала накопление пластидных пигментов – хлорофиллов и каротиноидов, что согласуется с низким уровнем МДА в листьях (табл. 4).

Таблица 4

Влияние метилфосфоновой кислоты и цианобактериальной инокуляции на накопление пластидных пигментов в листьях ячменя

Вариант	<i>N. linckia</i>		<i>N. muscorum</i>		<i>N. paludosum</i>		Биопленки с доминированием <i>N. commune</i>	
	каротиоиды	хлорофиллы (a+b)	каротин оиды	хлорофиллы (a+b)	каротин оиды	хлорофиллы (a+b)	каротин оиды	хлорофиллы (a+b)
	содержание, % к контролю							
ЦБ	95	113	156*	169*	410*	174*	151*	143*
МФК	112	128*	109	112	461*	179*	61*	62*
МФК+ЦБ	115	148*	128*	136*	418*	152*	60*	58*

Инокуляция семян природными биопленками с доминированием *N. commune*, в целом, положительно сказалась на жизнедеятельности растений ячменя. Отмечали снижение интенсивности процессов ПОЛ в корнях опытных растений (рис. 8 Г), возрастание

накопления хлорофиллов и каротиноидов (табл. 4). Однако, обработка семян биопленками с доминированием *N. commune* не снижала фитотоксического действия МФК. В вариантах с действием МФК в листьях и корнях растений была отмечена повышенная интенсивность процессов ПОЛ. Инокуляция семян БП снижала активность процессов ПОЛ только в корнях ячменя. Содержание пластидных пигментов в листьях опытных растений было на 40% ниже по сравнению с контролем. Обработка семян биопленками с доминированием *N. commune* не снижала негативного действия МФК на пигментный комплекс, отмечали образование некрозов на листьях.

Инокуляция семян ЦБ положительно сказывалась на росте органов растений (рис. 9). Цианобактериальная обработка семян альгологически чистыми культурами снижала фитотоксическое действие МФК на рост корней (рис. 9 А, Б, В). Длина корней ячменя, в опытах с предварительной инокуляцией семян ЦБ и действием МФК была выше на 10 – 15%, по сравнению с растениями, которые выращивали на загрязненном МФК субстрате. Обработка семян многовидовыми биопленками с доминированием *N. commune* не снижала ингибирующего действия МФК на рост корней. Эти данные согласуются с биохимическими изменениями в клетках, вызванными обработкой растений природными БП с доминированием *N. commune*, в условиях загрязнения среды МФК.

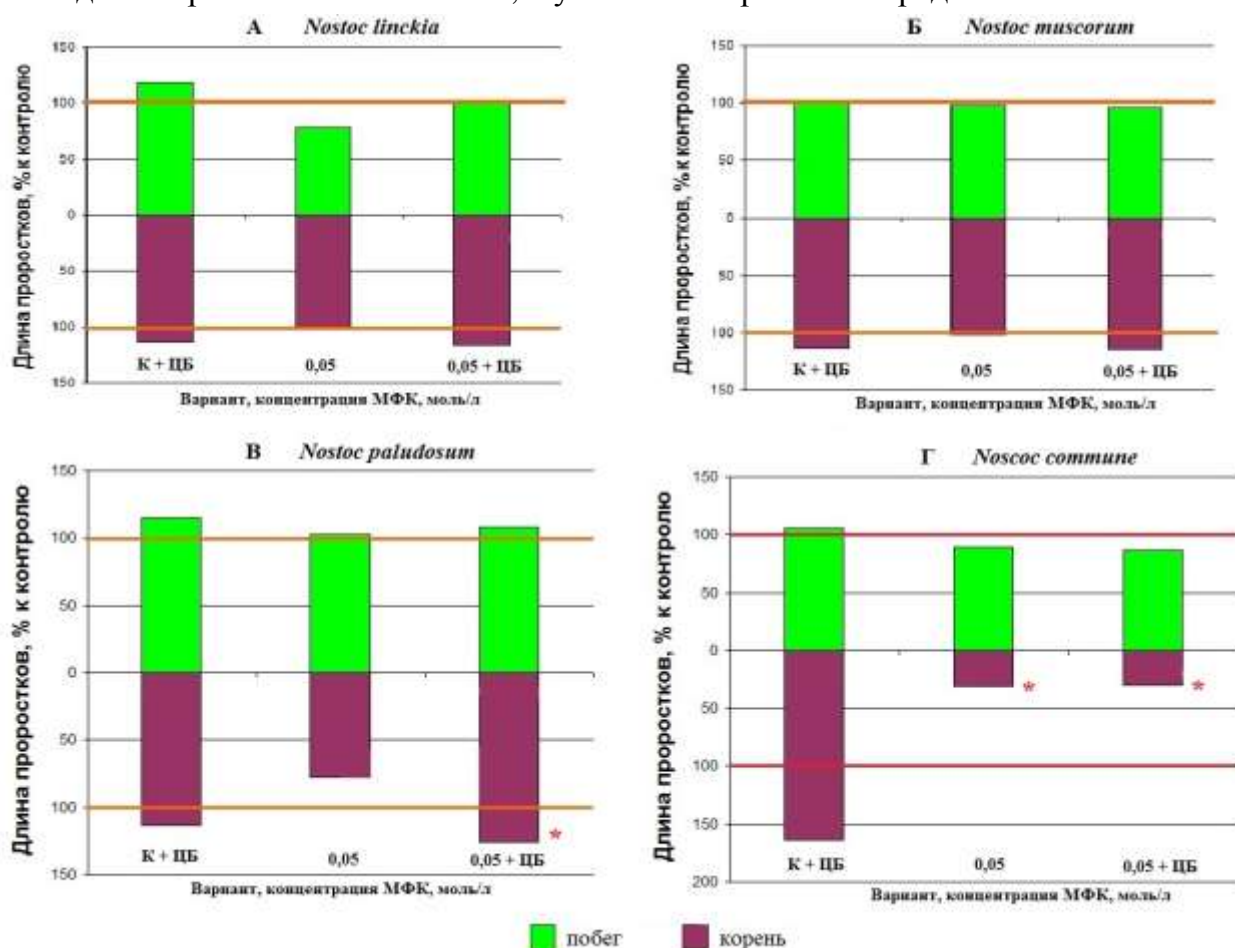


Рис. 9. Влияние метилфосфоновой кислоты и инокуляции семян цианобактериями на показатели линейного роста ячменя (песчаная культура): А – *N. linckia*; Б – *N. muscorum*; В – *N. paludosum*; Г – природные многокомпонентные биопленки с доминированием *N. commune*

В опытах на песчаной культуре выявлено, что обработка семян альгологически чистыми культурами цианобактерий *N. muscorum*, *N. linckia*, *N. paludosum* оказывала

протекторное действие на растения в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой. Инокуляция семян альгологически чистыми культурами ЦБ снижала интенсивность процессов ПОЛ в клетках, способствовала накоплению пластидных пигментов и оказывала ростостимулирующее действие на растения в присутствии МФК. Обработка семян многовидовыми биопленками с доминированием *N. commune* не снижала фитотоксического действия МФК на растения, что, по-видимому, обусловлено особенностями функционирования многовидового консорциума в условиях химического загрязнения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований была дана оценка степени чувствительности цианобактерий к действию метилфосфонатов, кроме того, выявлены положительные эффекты предпосевной обработки семян цианобактериями на рост и биохимические показатели ячменя, в том числе произрастающего в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой. В целом, по работе можно сделать следующие выводы:

1. Выявлено влияние метилфосфоновой кислоты и глифосата на содержание хлорофилла *a* и интенсивность процессов перекисного окисления липидов в клетках цианобактерий. Показатель содержания хлорофилла *a* в клетках цианобактерий наиболее чувствителен к действию метилфосфонатов и может быть использован при биотестировании.
2. В модельных опытах с водными культурами установлено, что альгологически чистые культуры цианобактерий наиболее устойчивы к действию метилфосфонатов. В ряду *Nostoc linckia* – *Nostoc muscorum* – *Nostoc paludosum* устойчивость цианобактерий к действию метилфосфоновой кислоты и глифосата снижается. Более чувствительны к действию метилфосфонатов природные многовидовые биопленки с доминированием *Nostoc commune*.
3. Цианобактериальная инокуляция семян оказывает положительное действие на биохимические показатели и рост растений ячменя. Отмечается снижение интенсивности процессов перекисного окисления липидов в растительных клетках, накопление веществ с антиоксидатными свойствами (антоцианов и каротиноидов) и ростостимулирующее действие цианобактерий на растения.
4. Инокуляция семян при проращивании является наиболее эффективным способом цианобактериальной обработки для повышения устойчивости растений в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой. Цианобактериальная инокуляция семян способствует улучшению биохимических характеристик и росту растений ячменя в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой.
5. Инокуляция семян многовидовыми биопленками с доминированием *Nostoc commune*, в опытах с водной культурой, в большей степени снижает фитотоксическое действие метилфосфоновой кислоты, по сравнению с альгологически чистыми культурами цианобактерий. В опытах с песчаной культурой, напротив, обработка семян альгологически чистыми культурами цианобактерий оказывает большее протекторное действие на растения в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой. Выявленные особенности могут послужить основой для разработки приемов фиторекультивации сред, загрязненных метилфосфоновой кислотой.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ:

1. Коваль Е.В., Свинолупова Л.С., Огородникова С.Ю. Оценка токсических эффектов метилфосфоновой кислоты по ответным биохимическим реакциям фототрофных организмов // Теоретическая и прикладная экология. – 2013. – № 1. – С. 89 – 93.
2. Коваль Е.В., Огородникова С.Ю. Влияние цианобактерии *Nostoc muscorum* на устойчивость растений ячменя к действию метилфосфоновой кислоты // Теоретическая и прикладная экология. – 2014. – № 2. – С. 61 – 66
3. Коваль Е.В., Огородникова С.Ю. Влияние цианобактерии *Nostoc linckia* на показатели жизнедеятельности растений ячменя, выращенных в модельных опытах в присутствии метилфосфоновой кислоты // Агрохимия. – 2014. – № 12. – С. 55 – 60.
4. Коваль Е.В., Огородникова С.Ю. Эффекты метилфосфоновой кислоты и цианобактерии *Nostoc linckia*, присутствующих в среде выращивания, на жизнедеятельность растений ячменя // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2016. – № 6(140). – С. 9 – 14.

Публикации в других изданиях:

5. Коваль Е.В., Огородникова С.Ю. Цианобактерии как потенциальные деструкторы метилфосфонатов // Молодые ученые в решении актуальных проблем науки: Сборник работ молодых ученых III междунар. науч.-практ. конф. в двух частях. Часть 2. – Владикавказ, 2012. – С. 7 – 9.
6. Коваль Е.В., Огородникова С.Ю. Влияние цианобактерий *Nostoc paludosum* на фитотоксичность метилфосфоновой кислоты // II (X) Международная Ботаническая конф. молодых ученых в Санкт-Петербурге: тезисы докладов. – Санкт-Петербург, 2012. – С. 64.
7. Коваль Е.В., Огородникова С.Ю. Изучение эффектов биопленок *Nostoc commune* на растения ячменя в условиях химического загрязнения (на примере метилфосфоновой кислоты) // Экотоксикология 2014: Матер. междунар. молодежной конф. – Тула, 2014. – С. 56.
8. Коваль Е.В., Огородникова С.Ю. Влияние биопленок *Nostoc commune* на жизнедеятельность растений в условиях загрязнения метилфосфоновой кислотой // Биотехнология – от науки к практике: Матер. всерос. конф. с междунар. участием. – Уфа, 2014. – С. 137 – 141.
9. Коваль Е.В., Огородникова С.Ю. Оценка протекторных свойств биопленок цианобактерий на растения ячменя при действии метилфосфоновой кислоты // Экологические проблемы промышленных городов: Матер. всерос. науч.-практ. конференции с междунар. участием. – Саратов, 2015. – С. 168 – 171.
10. Коваль Е.В. Эффекты метилфосфоновой кислоты на показатели жизнедеятельности цианобактерий // Актуальные проблемы биологии и экологии: Матер. XXIII всерос. молодежной науч. конф. (с элементами научной школы). – Сыктывкар, 2016. – С. 188 – 191.
11. Коваль Е.В., Чупрова Ю.В., Огородникова С.Ю. Действие метилфосфонатов и цианобактерии *Nostoc paludosum* на растения ячменя // Экология родного края: проблемы и пути их решения: Матер. XII всерос. науч.-практ. конф. – Киров, 2017. – С. 141 – 144.
12. Коваль Е.В., Чупрова Ю.В., Огородникова С.Ю. Влияние цианобактерий на растения, выращенные в условиях загрязнения метилфосфонатами // Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды: Труды всерос. конф. с междунар. участием. – Иркутск, 2018. – С. 936 – 940.