

МИНОБРНАУКИ РОССИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра морфологии и экологии животных

**НОВЫЕ ПОДХОДЫ К РЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ,  
ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПЕСТИЦИДОМ «ГЕЗАГАРД»**

АВТОРЕФЕРАТ

студентки 4 курса 423 группы

Направления подготовки бакалавриата


06.03.01 - Биология

Биологического факультета

Мамедовой Айтэн Джанполад кызы

Научный руководитель

Доцент кафедры морфологии  
и экологии животных, к.б.н.



Т. В. Перевозникова

Зав. кафедрой морфологии  
и экологии животных,  
д. б.н., профессор



Г. В. Шляхтин

Саратов-2018

## ВВЕДЕНИЕ

Ремедиация - это комплекс мероприятий направленных на очистку от загрязнений (деконтаминацию) и восстановление структуры природных сред, в том числе почв, грунтов и донных отложений. Способы ремедиации, связанные с использованием биотехнологий и живых организмов, получили название биоремедиации. В почвах загрязняющие вещества претерпевают различные трансформации, в результате которых они могут накапливаться, переходить из одной среды в другую, распадаться, минерализоваться в абиотических и биотических процессах, полимеризоваться с образованием связанных остатков. Целью ремедиационных технологий являются контроль за процессами трансформации загрязнителей в почвах и их удаление и обезвреживание.

В настоящее время не теряет актуальности разработка и подбор новых методов биоремедиации почв, загрязненных различными группами поллютантов, среди которых самыми распространенными являются пестициды. В нашей стране с 1986 г. было применено этих ядохимикатов в среднем около 2 кг на 1 га (примерно на 87% пашни) или около 1,4 кг на душу населения. Вместе с интенсификацией сельского хозяйства в Российской Федерации ежегодно увеличивается применение пестицидов (при общем годовом объеме их производства – 100 тыс. т, 1500 наименований препаратов с 200 видами ДВ пестицидов), в том числе гербицидов, и, в частности, таких как «Гезагард». В Саратовской области «Гезагард» – это один самых «популярных» гербицидов. Пестициды представляют широкий спектр веществ с разной степенью токсичности, и «Гезагард» относится к пестицидам сим-триазинового ряда (класс токсичности – III, умеренно опасные химические вещества). В результате многолетнего повсеместного применения сим-триазинов и их высокой персистентности реальна опасность стойкого загрязнения ими почв региона. Особенно сильному разрушающему влиянию подвергаются почвы вследствие интенсивного применения гербицидов сим-триазинового ряда с нарушением норм и правил их использования, что приводит к их значительному накоплению

в почвах. Особую опасность представляют полигоны хранения и захоронения неиспользованных пестицидов. Имеются многочисленные, часто противоречивые, сведения о негативном влиянии триазиновых пестицидов на микробиоценозы почв, растения, животных и человека.

Поскольку сим-триазины на сегодняшний день продолжают оставаться незаменимой частью сельскохозяйственных технологий, то возникает актуальный вопрос о выборе оптимальных стратегий трансформации и удаления этих гербицидов из окружающей среды. Перспективным подходом к ремедиации загрязненных ими почв является применение биопрепаратов на основе микроорганизмов - деструкторов сим-триазинов, участвующих в их деградации в почвах. В ряде современных публикаций показано, что наиболее эффективными деструкторами сим-триазинов являются бактерии из рода *Pseudomonas*. При этом наиболее эффективными препаратами для борьбы с загрязнением почв этими пестицидами являются их капсулированные формы со штаммом *Pseudomonas putida* П2.

В то же время важно помнить, что современный принцип биоремедиации почв сводится к поиску и применению не только одного ведущего метода, а целого комплекса методов, эффективно сочетающихся друг с другом и дающих наибольший эффект в деконтаминации загрязненных пестицидами почв. Среди биотехнологий, которые успешно применяются в сочетании с использованием микробиологических препаратов, являются вермитехнологии. Дождевые черви – ключевая группа педобионтов, определяющая плодородие и естественное функционирование почв. В настоящее время в России существует более сотни вермихозяйств, которые развивают промышленные вермитехнологии.

Кроме того, люмбрициды – ключевая группа животных мезофауны, которая активно используется для биоиндикации и биотестирования состояния почв, в том числе загрязненных пестицидами. Существует также актуальность изучения дождевых червей региональной фауны в экстремальных условиях существования при загрязнении пестицидами и в связи с возможностью

использования отдельных продуктивных и устойчивых к загрязнению видов люмбрицид в биоремедиации почв.

Учитывая высокую актуальность и многогранность выше сказанного, целью данной работы стал анализ новых подходов к ремедиации почв, загрязненных пестицидом «Гезагард».

В ходе работы были поставлены и решались следующие задачи:

1 Проанализировать передовой опыт биотехнологий ремедиации почв с использованием деструктора прометрина *Pseudomonas putida* П2 и дождевых червей в биотестировании и ремедиации почв, загрязненных пестицидами, в том числе гербицидом «Гезагард»;

2 Подобрать методы и условия вермикультивирования в лаборатории для адаптации лабораторных животных к биотестированию;

3 Провести биотестирование - эксперимент по оценке токсичности почвы, загрязненной гербицидом «Гезагард», для дождевых червей гибридной линии *Eisenia foetida andrei*, культивирующихся на разных субстратах, в том числе с интродуцированными деструкторами «Гезагарда» *Pseudomonas putida* П2;

4 Проанализировать отклик лабораторных животных при изменении условий вермикультивирования – смертность и выживаемость, а также поведенческие реакции и наличие коконов на поверхности субстрата;

5 На основе анализа литературы и результатов биотестирования разработать рекомендации по биоремедиации почв, загрязненных пестицидом «Гезагард», включающие совместное использование дождевых червей и *Pseudomonas putida* П2.

Данная бакалаврская работа выполнена на кафедре морфологии и экологии животных в тесном сотрудничестве с доцентом кафедры микробиологии и физиологии растений СГУ им. Н.Г. Чернышевского – к.б.н. О.Ю. Ксенофонтовой.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

В основной части работы рассматриваются биологические основы применения технологий биоремедиации почв, дается эколого-токсикологическая характеристика пестицидам – ключевым загрязнителям почв, в том числе гербицидам сим-триозинового ряда и препарату «Гезагард». Анализируются методы ремедиации почв, загрязненных пестицидами, в том числе с помощью микроорганизмов-деструкторов. Дается характеристика штамма *Pseudomonas putida* П2 и его использование в биоремедиации почв, загрязненных прометрином (препаратом «Гезагард»). Рассказывается об использовании люмбрицид в технологиях биоремедиации почв. Характеризуется фоновое состояние и качественный состав люмбрицид региональной фауны для реализации целей биоремедиации почв. Дождевые черви рассматриваются как организмы, необходимые в биоиндикации и биотестировании почв. Проводится анализ материалов исследования влияния модельного загрязнителя почвы пестицидом «Гезагард» на дождевых червей в лабораторных условиях.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Было проведено исследование, позволяющее оценить характер влияния на люмбрицид загрязненных гезагардом почвенных субстратов, а также субстратов с интродуцированными деструкторами гезагарда *Pseudomonas putida* П2. Оценку токсичности почвы на дождевых червях проводили по методу, основанному на исследовании их выживаемости при воздействии токсичных веществ (Международный стандарт..., 1998). В эксперименте участвовали тест-организмы - адаптированные к лабораторным условиям линии красного калифорнийского навозного червя *Eisenia foetida andrei* («Старатель») – гибридной формы, которая в настоящее время широко используется в биотехнологической вермикультуре. Эти компостные черви, впервые полученные в лабораторных условиях профессором А.М. Игониным путем скрещивания особей двух пространственно отдаленных популяций (местной российской и киргизской популяции) навозных червей *Eisenia*

*foetida* (Патент РФ №2058737). Черви «Старатель» элитной промышленной линии были любезно предоставлены ОАО «Агрофирма Грин-ПИКЪ», (г. Ковров, Владимирская обл.). Преимущество их использования заключалось в применении особей генетически однородной популяции, адаптированной к лабораторным условиям, что повышало достоверность результатов биотестирования.

С помощью люмбрицид тестировались следующие субстраты:

- субстраты, загрязненные гезагардом (0,1 мл (г) гезагарда на 1кг почвы, что соответствовало 50 мг/кг действующего вещества прометрина (100 ПДК/кг);
- субстраты, обогащенные деструкторами *Pseudomonas putida* П2;
- субстраты, обогащенные деструкторами *Pseudomonas putida* П2 с двухдневной экспозицией;
- субстраты, обогащенные деструкторами *Pseudomonas putida* П2 с семидневной экспозицией;
- субстраты, обогащенные деструкторами *Pseudomonas putida* П2 с тридцатидневной экспозицией;
- субстраты, загрязненные гезагардом в присутствии биодеструктора *Pseudomonas putida* П2 с двухдневной экспозицией;
- субстраты, загрязненные гезагардом в присутствии биодеструктора *Pseudomonas putida* П2 с семидневной экспозицией;
- субстраты, загрязненные гезагардом в присутствии биодеструктора *Pseudomonas putida* П2 с тридцатидневной экспозицией.

Препарат, используемый в биотестировании с коммерческим названием «Гезагард»: это пестицид сим-триазинового ряда, содержащий Прометрин  $C_{10}H_{19}N_5S$ , 2-метилтио-4,6-бис-(изопропиламино)-симм-триазин – производное циануровой кислоты (1,3,5-тригидрокси-симм-триазин). Для проведения экспериментов использовали водный раствор гербицида. Концентрация рабочего раствора Прометрина составляла 500 мкг/мл. Подготовка пестицида к исследованию: приготовление

концентрации, содержащей 100 доз ПДК. Пестицид предварительно разводили в растворителе (дистиллированной воде). Приготавливали разведение пестицида, которое соответствовало 100 (50 мг/кг) доз ПДК. Расчет концентрации осуществляли исходя из данных ГОСТ 17.4.1.02-83, по которым 1 ПДК Прометрина равна 0,5 мг на 1 кг почвы. Внесение пестицида в почву производили с помощью распылителя, а затем тщательно перемешивали.

Микробиологический препарат на основе штамма *Pseudomonas putida* П2, который использовался в качестве прометрин-деструктора, получен из коллекции кафедры микробиологии и физиологии растений ФГБОУ ВПО «СГУ им. Н.Г. Чернышевского».

Основу тестируемых субстратов составлял взятый из поверхностного слоя с участков землепользования в окрестностях населенного пункта «Станция Паницкая» (Красноармейский район Саратовской области) - легкоголинистый южный чернозем, содержащий до 2,55% гумуса и имеющий рН от 6,8 до 7,2. Для создания благоприятных условий для лабораторного содержания эпигейных (напочвенных) червей-биотестов, предпочитающих богатые гниющей органикой почвы дождевых червей *Eisenia foetida andrei* в него добавлялись ферментированный гранулированный конский навоз (из расчета 100 г/кг почвы, с повышением рН субстрата до 8,1). Выполнялись навески из перемешанного, механически измельченного и просеянного через сито субстрата весом 2 кг, которые помещались в пластиковые контейнеры (40x15x20 см). Путем внесения соломы создавались благоприятные напочвенные условия, с помощью донных отверстий в контейнерах и применения системы поддонов обеспечивались дренажные характеристики лабораторных вормикариев. В качестве контроля использовали почву с навозом, но без загрязнителей. Предварительное содержание в ней червей показало 95 %-ю выживаемость червей в течение 28 дней. Таким образом, исходный субстрат соответствовал требованиям методики и был пригоден для использования в экспериментах.

В течение всего биотестирования дозированным распылением отстоянной водопроводной воды поддерживалась влажность 60-65% от полной влагоемкости. Контейнеры сверху плотно фиксировали марлей, которая содержала небольшие отверстия для воздухообмена, и, в то же время, препятствовала высыханию почвы и случайному высвобождению из контейнеров тест-организмов. Эксперимент проводился в подвальном помещении при постоянной температуре воздуха 17-18<sup>0</sup>С. Контрольные и опытные инкубационные сосуды на протяжении всего опыта находились в одинаковом режиме температуры, освещения и увлажнения.

Использовались половозрелые поясковые особи (*adultus*) калифорнийского гибрида *Eisenia foetida andrei* одного возраста и размерно-весовых характеристик, адаптированные для жизни в созданных условиях (компостные черви «Старатель» содержались в виде маточного стада в маточных контейнерах в течение недели до начала эксперимента для целей адаптации лабораторных животных. При этом зарегистрированная убыль червей была зарегистрирована на уровне 1%, что соответствует требованиям стандарта ISO). Расчет посадки тест-объектов в контейнеры составлял 10 особей на 1 кг субстрата (по 20 особей на контейнер с 2 кг субстрата).

В эксперименте применялись 24 контейнера (контейнеры подписывались), включающие 3 повторности серий проб:

- 1 - контроль (субстрат без деструкторов и пестицида);
- 2 - пробы с гезагардом и концентрацией прометрина 100 ПДК/кг;
- 3-5 - с деструктором с 2-дневной; 14-дневной и 30-дневной экспозицией (готовились заранее до начала эксперимента);
- 6-8 - с гезагардом, с концентрацией прометрина 100 ПДК/кг и деструктором с 2-дневной; 14-дневной и 30-дневной экспозицией.

Внесение *Pseudomonas putida* П2 проводилось путем распыления на поверхности почвы взвеси, содержащей  $1,08 \times 10^9$  кл/мл некапсулированного штамма, полученного из почвенной аборигенной микрофлоры. Применялись



3 группы грунтов с интродуцированным штаммом *Pseudomonas putida* П2 с 2-дневной; 14-дневной и 30-дневной экспозицией.

Капельножидким способом также вносились в соответствующие пробы гезагарда с концентрацией прометрина 100 ПДК/кг, перемешивались и выдерживались в течение 30-50 минут для пропитывания инокулятом. Затем в пробы вносились черви из маточного стада.

У тест-объектов оценивались:

- характер поведенческих реакций;
- расположение червей в поверхностных и придонных слоях контейнера;
- смертность и выживаемость дождевых червей (в %);
- наличие коконов в напочвенном слое (качественный репродуктивный показатель – да/нет).

Наблюдения за червями проводились в конце первых – на вторые сутки (изучение острой токсичности субстрата), 7-е и 30 сутки (изучение хронического токсического воздействия на червей) эксперимента.

Показателем выживаемости служило среднее количество червей, выживших в тестируемой почве, по сравнению с контролем (незагрязненная почва). Критерием высокой токсичности является гибель 50% и более дождевых червей в тестируемой почве по сравнению с контролем. Кратковременное биотестирование в течение 2 сут. позволило выявить острое токсическое действие пестицида в концентрации 100 ПДК на дождевых червей. В ходе более длительного биотестирования (7 сут. экспозиции) оценивали субхроническое действие пестицида на дождевых червей.

Для организации и оценки результатов этого эксперимента использовались данные по выявлению LD50 и LD100 для *Eisenia foetida andrei*, полученные в предварительном опыте ранее другими авторами.

Для статистической обработки количественных данных применялись простейшие методы описательной статистики и программа Excell.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследования были получены следующие результаты (табл. 1 и рис. 1, 2). В первые сутки эксперимента смертность червей в субстратах с деструктором с 1-; 7- и 30- дневной экспозицией не превышала 1,6% и достоверно не отличалась от этого показателя в контроле.

Однако в контейнерах с гезагардом, а также с гезагардом и деструктором с 1-; 7- и 30-дневной экспозицией показатель смертности колебался от 2,6 до 6% с наименьшими показателями для субстрата с семидневной экспозицией микропрепарата и гезагарда. Несмотря на то, что пятипроцентная смертность *Eisenia foetida andrei* в пробах с поллютантом в первые сутки культивирования превышала этот показатель в контроле в 2 и более раза, данный результат является свидетельством невысокой чувствительности и относительной устойчивости червей в ответ на воздействие внесенной дозы гезагарда 100 ПДК (0,1 г/кг) (отсутствие острой токсичности субстрата, т.к. о высокой токсичности почвы судят, как отмечалось ранее, по 50% гибели люмбрицид в первые сутки эксперимента (LD<sub>50</sub> для «Гезагарда» - 18,28 г/кг – 36 650 ПДК). Данный результат, возможно, объясняется тем, что гезагард, действующей основой которого является прометрин, не является инсектицидом и специфическим токсикантом для тест-организмов.

При этом в предварительном опыте, выполненном В.В. Воронцовым (2012), также было показано, что концентрация гезагарда до 1 г/кг не оказывает видимого токсического эффекта на показатель смертности калифорнийского гибрида. В то же время среднелетальная концентрация гезагарда (LD<sub>50</sub>) для дождевых червей составила 18,28 г/кг, а LD<sub>100</sub> – 48, 25 г/кг, а токсические эффекты воздействия на червей начали проявляться в первые сутки эксперимента и нарастали к 7 дню эксперимента.

Таблица 1 - Динамика смертности *Eisenia foetida andrei* на биотестируемых субстратах (среднее значение в трех повторностях (шт.) и доля погибших особей (%))

Сутки эксперимента	Контроль (культивационный грунт)	Грунт с деструктором 1 дневной экспозиции	Грунт с деструктором 7 дневной экспозиции	Грунт с деструктором 30- дневной экспозиции	Грунт с гезагардом (100 ПДК)	Грунт с гезагардом (100 ПДК) и деструктором 1 дневной экспозиции	Грунт с гезагардом (100 ПДК) и деструктором 7 дневной экспозиции	Грунт с гезагардом (100 ПДК) и деструктором 30- дневной экспозиции
1 сутки	0,3 ± 0,001 (0,5%)	0,6 ± 0,01 (1%)	1,0 ± 0,014 (1,4 %)	0,6 ± 0,01 (1 %)	3,3 ± 0,012 (5,5 %)	3,6 ± 0,01 (6 %)	1,6 ± 0,013 (2,6 %) *	2 ± 0,012 (3,3 %)
7 сутки	0,6 ± 0,012 (1%)	0,3 ± 0,01 (0,5%)	0,3 ± 0,01 (0,5 %)	0,3 ± 0,013 (0,5 %)	5 ± 0,01 (8,6 %)	2,0 ± 0,01 (3,3 %)	2,6 ± 0,01 (4,1 %)	3,0 ± 0,014 (5 %)
30 сутки	0,6 ± 0,013 (1%)	1,0 ± 0,013 (1,6%)	1,3 ± 0,01 (2.1 %)	1,6 ± 0,01 (2,6 %)	5,3 ± 0,01 (8,8 %)	2,3 ± 0,011 (3,8 %)	2,6 ± 0,014 (4,1 %)	3,3 ± 0,012 (5,5 %)
Всего за весь эксперимент	1,5 ± 0,01 (2,%)	1,9 ± 0,01 (3,1%)	2,6 ± 0,01 (4,2 %)	2,5 ± 0,01 (4,1 %)	13,6 ± 0,01 (22,9 %)	7,9 ± 0,01 (13,1 %)	6,8 ± 0,012 (10,8 %)	8,3 ± 0,012 (13,5 %)

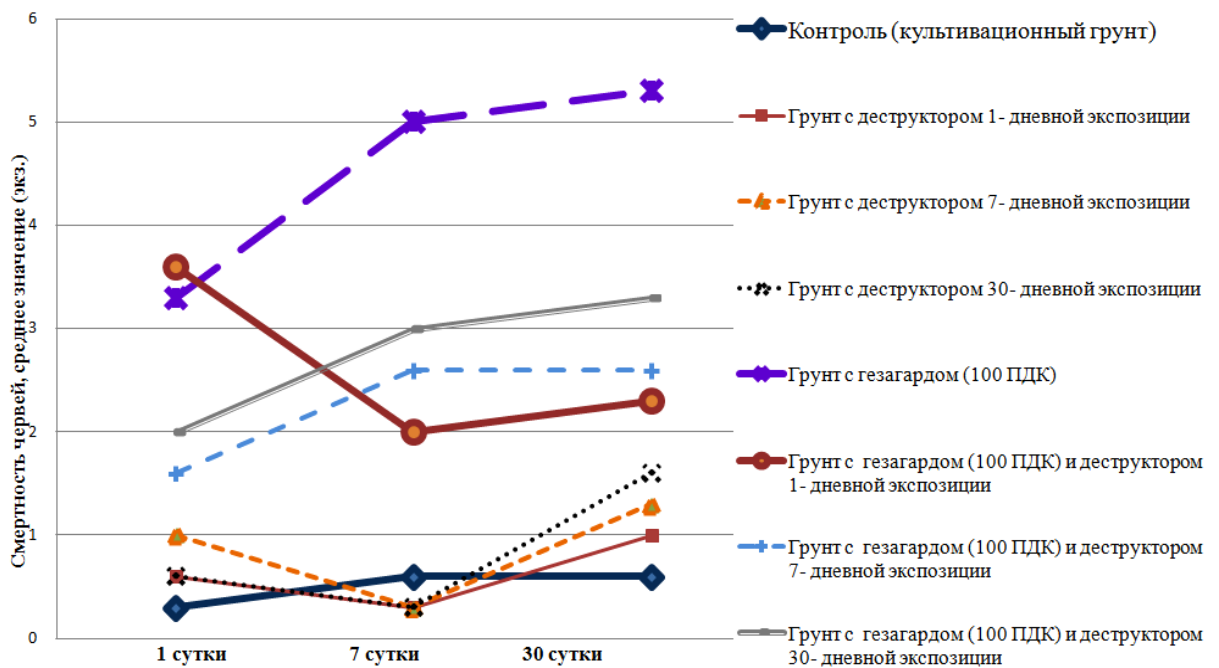


Рисунок 1 - Динамика смертности *Eisenia foetida andrei* на биотестируемых субстратах (среднее значение в трех повторностях (экз.))

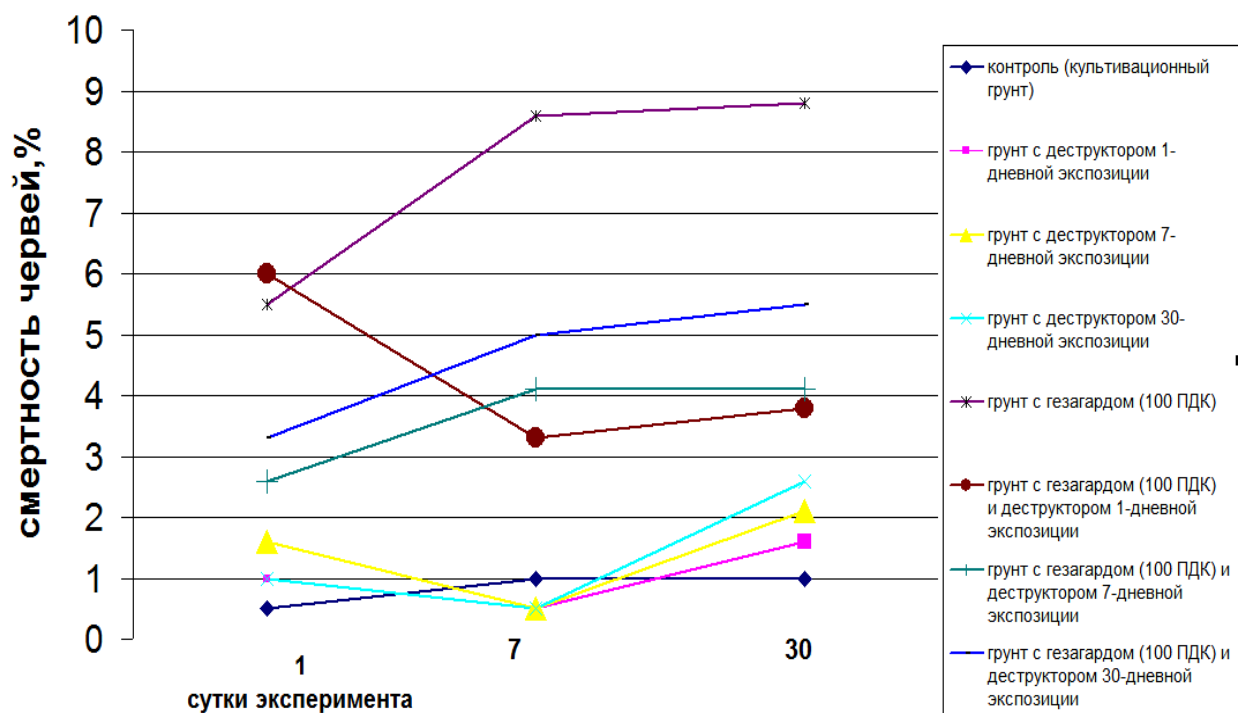


Рисунок 2 - Динамика смертности *Eisenia foetida andrei* на биотестируемых субстратах (%)

7-й день нашего эксперимента показал, что в пробах с гезагардом без деструктора смертность тест-объектов продолжала постепенно расти и составила 8,6%. Кроме снижения выживаемости, на 7-й день культивирования именно в этих контейнерах начали проявляться поведенческие реакции дождевых червей в

этой серии проб. Изменения в поведении касались перемещения почвенно-подстилочного *Eisenia foetida andrei* в глубину, придонные слои лабораторного контейнера. При отсутствии загрязнения эти тест-организмы предпочитают питаться на поверхности почвы и располагаться в ее поверхностных слоях без проявлений признаков угнетения жизнедеятельности и активности. По данным Д.А. Криволицкого, в ненарушенных почвах в весенне-летний сезон черви концентрируются в поверхностном слое почвы на глубине 10–20 см. Также на 7 день эксперимента у объектов биотестирования отмечались реакции покидания (избегания) контейнера, что является проявлением двух таксисов – вертикального, при котором черви проходят загрязненный пестицидом слой почвы перпендикулярно границе просачивания до границы просачивания препарата, и горизонтального, когда люмбрициды начинают двигаться вдоль нее в поисках незагрязненных участков.

Увеличение показателя смертности *Eisenia foetida andrei* и нарастание дезадаптивных поведенческих реакций к 7-ому дню эксперимента в пробах, загрязненных гезагардом без деструктора при отсутствии выраженных острых токсических эффектов в первые сутки могут свидетельствовать о накоплении в тканях червей метаболитов гезагарда, который попадает внутрь с почвой через кишечник и при абсорбции через поверхность тела. Иными словами, в ходе эксперимента начиная с седьмого дня биотестирования в пробах с гезагардом без деструктора отмечены явления субхронического токсического воздействия субстрата. Одновременно смертность в контроле и в пробах с деструктором не превысила 1%, что допускается Международным стандартом (рис. 3).

Однако в пробах, загрязненных гезагардом и интродуцированных деструктором с 1-, 7- и 30-дневной экспозицией, смертность червей на 7 день эксперимента была в 2-3 ниже, чем в пробах с токсикантом без деструктора. Снижение показателя смертности в этом случае, вероятно, является следствием уменьшения концентрации гезагарда при его деструкции с участием *Pseudomonas putida* П2. Ранее было показано, что штамм *Pseudomonas putida* П2 обладает высокой деструкционной активностью по

отношению к прометрину, но его действие развивается не сразу. Как правило, в течение 7 дней происходит разрушение от 60 до 80% препарата, что снижает субхроническое воздействие гезагарда на дождевых червей. В целом, данный результат показывает, что штамм *Pseudomonas putida* П2 может быть рекомендован для создания комплексного препарата, предназначенного для очистки земель, загрязненных триазинами. Поведенческие реакции, связанные с покиданием контейнера не наблюдались, но доминировали реакции, связанные с образованием конгломератов из червей в какой-то одной точке глубокого слоя контейнера.



а



б



в



г

Рисунок 3 - Некоторые особенности ведения биотестирования:

а – Контейнеры с различными субстратами для вермикюльтивирования в лабораторных условиях; б - тест-объекты, адаптированные к лабораторным условиям линии красного калифорнийского навозного червя *Eisenia foetida andrei* («Старатель») элитной промышленной линии, полученной ОАО «Агрофирма Грин-ПИКЪ», (г. Ковров, Владимирская обл.); в - Погибшие дождевые черви в пробах с гезагардом без деструктора на 7 день эксперимента (показатель смертности); г – Конгломерат из люмбрицид на дне контейнера с загрязненным гезагардом субстратом

К 30-му дню эксперимента наблюдалась стабильно возрастающая динамика смертности червей во всех пробах с восьмикратным превышением данного показателя в пробах с гезагардом без деструктора (до 8,8%). В целом, за весь период исследования в данной серии проб погибло наибольшее количество червей – около 22,9% от принявших в исследовании тест-объектов. Возрастание смертности в пробах без гезагарда с деструктором и контроле могло быть связано с естественной убылью червей, культивируемых в лабораторных условиях. Для поддержания стабильного существования популяции в лабораторных условиях рекомендуется еженедельное внесение подкормки из овощных и плодовых отходов. Однако многократное превышение смертности люмбрицид в пробах с гезагардом свидетельствовало о нарастании хронической токсичности субстратов и кумулятивном эффекте гербицида. Поведенческие реакции избегания субстрата к 30 дню эксперимента практически не отмечались во всех пробах. Черви обнаруживались в разных зонах контейнеров, что свидетельствовало о продолжающейся адаптации к жизни в лабораторных условиях и субстратным условиям. Достоверных отличий в распределении животных в контейнерах не обнаружено. Результаты 30-го дня также свидетельствует об отсутствии среднелетальных эффектов у дождевых червей к концу эксперимента и отсутствии отрицательного влияния деструкторов в составе грунтов с 1-, 7- и 30- дневной экспозицией на показатели тест-объектов (при сравнении с контролем).

Еще один результат проведенного биотестирования касается репродуктивных показателей у тест-объектов: в загрязненных гезагардом контейнерах, в отличие от контейнерной серии проб с деструкторами; деструкторами и гезагардом, - не было отмечено появления в поверхностном слое почвы коконов дождевых червей. Нарушение репродуктивной функции является чувствительным фактором уязвимости у *Eisenia foetida andrei* в условиях модельного загрязнения гезагардом в лабораторных условиях. Однако регистрация коконов на загрязненных гезагардом субстратах,

подвергшихся семидневному влиянию деструктора *Pseudomonas putida* П2, свидетельствует о снижении токсических эффектов пестицида у люмбрицид в этих пробах. К 30- дню эксперимента в контроле и во всех пробах, кроме контейнеров с гезагардом и без деструктора, наблюдалось устойчивое появление коконов, что являлось проявлением репродуктивной активности животных и признаком их адаптации к лабораторным условиям. В целом, несмотря на отсутствие среднелетальных эффектов гезагарда в концентрации 100 ПДК на выживаемость дождевых червей в пробах без деструктора, нарушение репродуктивной активности животных является маркером хронической токсичности тестируемой почвы и гезагарда.

Проведенное биотестирование с помощью дождевых червей «Старатель» показало низкое токсическое воздействие на тест-объекты гербицида «Гезагард» в концентрации 100 ПДК: зафиксирована 30% смертность и отсутствие 50% гибели (показатель острой, субхронической и хронической токсичности) в пробах загрязненных гезагардом не только на 1, но и на 7 и 30 дни эксперимента. Это также свидетельствует о некоторой толерантности дождевых червей к действию гезагарда в указанной концентрации. Эти результаты согласуются с данными исследователей, которые показали, что через 30 сут. после загрязнения пестицидами происходит снижение острой токсичности почвы, что может быть связано с процессами абиотической и биотической трансформации поллютанта. При этом биотест-объекты демонстрировали появление признаков субхронической и хронической токсичности почв, загрязненных гезагардом: поведенческие реакции (вертикальный и горизонтальный таксисы, образование конгломератов, напочвенная дезадаптация) и снижение репродуктивной активности (способности к образованию коконов). При этом внесение в загрязненные гезагардом субстраты с концентрацией прометрина 100 ПДК его деструктора *Pseudomonas putida* П2 на 7 и 30 день эксперимента отмечалось снижение токсических эффектов на люмбрицид, что проявлялось в повышении их выживаемости и репродуктивной активности тест-объектов. Наименьшие



показатели смертности *Eisenia foetida andrei* были отмечены в контейнерах с гезагардом и интродуцированным штаммом *Pseudomonas putida* П2 с семидневной экспозицией.

Полученные результаты биотестирования на люмбрицидах также свидетельствуют о деструкционной активности некапсулированного штамма *Pseudomonas putida* П2 по отношению к загрязненным гезагардом субстратам. Условия, созданные для жизнедеятельности *Eisenia foetida andrei* (внесение навоза при перемешивании в грунт, создание напочвенных условий с помощью соломы и марли) не снижали деструкционной активности *Pseudomonas putida* П2 в отношении гезагарда с концентрацией прометрина 100 ПДК. Микроорганизмы-деструкторы и дождевые черви не проявляли замеченного антагонизма.

Полученные результаты биотестирования с помощью компостных дождевых червей субстратов с модельным загрязнением гербицидом «Гезагард» и интродуцированных штаммом деструктора прометрина *Pseudomonas putida* П2 - позволили сделать практические рекомендации по биоремедиации почв.

Использование *Eisenia foetida andrei* в биоремедиации почв, загрязненных «Гезагардом» и препаратами на основе прометрина, может быть связано с тем, что вид проявил относительную устойчивость к гезагарду в концентрации 100 ПДК. При этом внесение в культивационный субстрат с гезагардом деструктора прометрина *Pseudomonas putida* П2 с 1-, 7- и 30-дневной экспозицией снижало проявление острых, субтоксических и токсических эффектов со стороны биотест-объекта. Это проявлялось в повышении выживаемости и репродуктивной активности дождевых червей. Иными словами, негативные эффекты гезагарда для люмбрицид нивелировались работой деструктора *Pseudomonas putida* П2, наиболее проявляющиеся в субстратах с семидневной экспозицией деструктора.

Учитывая данные биотестирования и передового опыта ремедиации почв, для биоремедиации почв, загрязненных гезагардом, можно предложить следующие рекомендации:

1. Субстраты, загрязненные пестицидами на основе прометрина в концентрации 0,01 до 0,1 г/кг (10 ПДК и 100 ПДК ДВ прометрина не оказывают выраженного токсического действия на дождевых червей, 50% гибель люмбрицид наступает при концентрации прометрина в 50 г/кг (50000 ПДК ДВ прометрина). Относительная устойчивость *Eisenia foetida andrei* к действию гербицида предполагает возможность использования данного вида беспозвоночных в целях биоремедиации загрязненных гезагардом почв.

2. Для ремедиации почв с помощью навозного червя можно использовать технологии вермикомпостирования, доказавшие свою эффективность в восстановлении структуры и биологических свойств почв, и связанные с созданием условий для жизнедеятельности и размножения *Eisenia foetida andrei*.

3. Совместное использование в биоремедиации методов, основанных на применении *Pseudomonas putida* П2 и *Eisenia foetida andrei* будет иметь наибольшую эффективность, т.к. применение деструктора прометрина *Pseudomonas putida* П2 в биоремедиации загрязненных гезагардом почв, улучшает условия для жизнедеятельности и размножения дождевых червей

4. Перед заселением дождевого червя необходимо внесение в загрязненный гезагардом субстрат *Pseudomonas putida* П2, как минимум за 1 - 7 дней. Возможно дробное внесение деструктора за 1 и за 7 дней перед заселением компостных дождевых червей. Иными словами, биоремедиация в этом случае должна быть двухэтапной: на первом этапе должен применяться микробиологический препарат, снижающий возможные токсичные эффекты гезагарда, на втором – внесение дождевых червей, улучшающие структуру и биологическую активность почв.

5. Использование микробиологического препарата на основе микрокапсул, инокулированных *Pseudomonas putida* П2, повышает деструкцию пестицидов на основе прометрина, в том числе и «Гезагарда», поэтому их использование в комплексной биоремедиации наиболее предпочтительно.

6. Использование *Pseudomonas putida* П2 и *Eisenia foetida* должно дополняться технологическими подходами ремедиации on situ и ex situ (off site), требующие снятия верхнего загрязненного пестицидом слоя почвы с последующим вермикомпостированием.

7. Использование дождевых червей в технологиях биоремедиации загрязненных пестицидом почв in situ может сопровождаться миграционной активностью люмбрицид вследствие проявления ими горизонтального таксиса. Приемы поверхностной механической обработки в данном случае также губительны для дождевых червей.

8. Для предупреждения миграции дождевых червей из загрязненного пестицидом грунта должны применяться изоляционные вокруг грунта мероприятия, а также специальные линии компостных червей с низкой миграционной активностью, например, гибридной линии навозного червя – ККЧ «Старатель».

9. После биоремедиации дождевых червей либо оставляют в почве с целью повышения ее плодородия, либо собирают на специальные приманки.

Безусловно, представленные в данной работе рекомендации по биоремедиации загрязненных гезагардом почв с сочетанным использованием *Pseudomonas putida* П2 и *Eisenia foetida* требуют практической апробации на специальных экспериментальных площадках для уточнения и детализации технологических подходов.

## **ВЫВОДЫ**

В ходе выполнения данной работы было проведено биотестирование с использованием дождевых червей субстратов с модельным загрязнением гербицидом «Гезагард» и интродуцированными деструктором прометрина

*Pseudomonas putida* П2. В результате исследования были получены результаты, которые в краткой форме могут быть изложены в виде следующих выводов:

1 Анализ передового опыта ремедиации почв показал, что в биоремедиации загрязненных гербицидом «Гезагард» (с ДВ прометрин) почв используется деструктор прометрина *Pseudomonas putida* П2, наибольший деструкционный эффект имеет применение микробиологического препарата с микрокапсулами, инокулированными этими микроорганизмами. Дождевые черви в биоремедиации почв, загрязненных «Гезагардом», применяются в технологиях вермикомпостирования, которые могут быть наиболее эффективны в сочетании с микробиологическими препаратами. Люмбрициды – единственные педобионты, используемые в биотестировании для выявления интегральной токсичности почв на основе разработанных международных стандартов ISO.

2 При организации биотестирования с использованием люмбрицид были подобраны условия вермикультивирования в лаборатории (субстрат, температура, влажность), а также были адаптированы к лабораторным условиям дождевые черви гибридной линии навозного червя *Eisenia foetida andrei* («Старатель»).

3 Биотестирование по оценке токсичности почвы, загрязненной гербицидом «Гезагард» в концентрации прометрина 100 ПДК, для дождевых червей гибридной линии *Eisenia foetida andrei*, показал, что показатели наибольшей (30%) смертности вместе дезадаптивными поведенческими реакциями (вертикальный и горизонтальный таксисы) и отсутствием коконов зарегистрированы на субстратах, загрязненных гезагардом. Здесь отмечались признаки не только острой, но и субхронической и хронической токсичности биотестируемого субстрата, что свидетельствовало о кумулятивном эффекте гербицида. Однако в пробах с модельным загрязнением «Гезагардом» вместе с интродуцированными деструкторами «Гезагарда» *Pseudomonas putida* П2 семидневной экспозиции субхронические и хронические эффекты гербицида были выражены слабее, что проявлялось снижением показателя смертности на

7 и 30 день эксперимента, угасанием отрицательных поведенческих проявлений и появлением коконов к 30 дню эксперимента со стороны тест-объектов.

5 На основе анализа литературы и результатов биотестирования были разработаны рекомендации по биоремедиации почв, загрязненных пестицидом «Гезагард», включающие совместное использование дождевых червей и *Pseudomonas putida* П2. Сохранение репродуктивной функции у *Eisenia fetida andrei*, отсутствие среднететальных эффектов при внесении концентрации прометрина 100 ПДК в присутствии биодеструктора, отсутствие антагонизма между деструктором и червями свидетельствует о возможности использования навозного червя гибридной линии «Старатель» в комплексе с *Pseudomonas putida* П2 для заселения загрязненных прометрином субстратов и борьбы с негативными эффектами накопления пестицидов в почвах с помощью вермикомпостирования.