



На правах рукописи

**Шувалова Наталья Евгеньевна**

**Биотехнологические аспекты определения  
токсичности пестицидов на клеточных и  
организменных тест-системах**

1.5.6 Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва 2022

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственный технический университет».

Научный руководитель: Прутенская Екатерина Анатольевна  
кандидат биологических наук, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственный технический университет»

Официальные оппоненты: Виноходов Дмитрий Олегович  
доктор биологических наук, заведующий кафедрой молекулярной биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)»

Титова Вера Ивановна  
доктор сельскохозяйственных наук, заведующая кафедрой агрохимии и агроэкологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тульский государственный университет»

Защита состоится "26" апреля 2022 года в 11 часов 00 минут на заседании диссертационного совета 99.0.027.03 в Российском химико-технологическом университете им. Д.И. Менделеева (125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9) в конференц-зале (ауд.443).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ имени Д.И. Менделеева, а также на официальном сайте <http://diss/muctr.ru/>

Автореферат диссертации разослан " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 99.0.027.03,  
кандидат технических наук, доцент



И.В. Шакир

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Современное сельское хозяйство сложно представить без применения средств химической защиты. Гербициды нашли широкое применение при возделывании различных сельскохозяйственных культур, в том числе, в качестве десиканта в предуборочный период. Однако такое использование способствует увеличению содержания токсичных веществ в объектах окружающей среды, кормах и продуктах питания. Так, например, в Канаде в зерне овса глифосат обнаружен на уровне 0,70 - 4,6 мг/кг, а в Великобритании остаточные количества гербицида идентифицированы на уровне 0,9 - 14 мг/кг. При воспроизводстве сельскохозяйственной культуры сорго в США уровни количества глифосата обнаружены в пределах от 1,1 до 33,0 мг/кг. Как результат, остаточные количества токсиканта обнаруживаются в тканях животных и биоматериале людей.

Химические методы анализа позволяют определить количественное содержание некоторых химических веществ, но не дают возможность сделать вывод об их токсичном воздействии на объекты окружающей среды, теплокровных животных и человека. С этой точки зрения, биотестирование, позволяет понять опасность химических веществ на клеточном и организменном уровнях.

Присутствие гербицидов в объектах окружающей среды и в остаточных количествах в продуктах питания и кормах объясняет актуальность биотестирования на различных тест-системах.

**Цели и задачи исследований.** Цель работы – изучение токсичности гербицидов на *Stylonychia mytilus* и оценка воздействия глифосата, содержащегося в различных объектах окружающей среды, на клеточном и организменном уровне.

Для реализации данной цели были поставлены следующие задачи:

1) Изучить подходы биотестирования гербицидов с помощью различных биологических тест-объектов на основании литературных источников.

2) Определить оптимальное количество простейших для проведения биотестирования (клопиралид, 2,4-Д, глифосат).

3) Определить чувствительность культуры *Stylonychia mytilus* к гербицидам на примере клопиралида, 2,4-Д, глифосата.

4) На основе полученных данных оценить возможность использования культуры *Stylonychia mytilus* как тест-объекта для контроля безопасности водной и почвенной среды. Провести биотестирование почвы различного гранулометрического состава с помощью *Stylonychia mytilus*.

5) Определить токсичность глифосата на микробиоту почвы.

6) Провести эксперимент на лабораторных мышах по изучению хронической токсичности глифосата на жизнедеятельность животных и их репродуктивную функцию.

7) Оценить токсичность гербицида глифосата на патоморфологические изменения в организме лабораторных животных.

8) Изучить влияние длительной интоксикации животных глифосатом на биохимические показатели крови.

**Научная новизна работы.** Определена оптимальная численность инфузорий при биотестировании и установлена возможность использования простейших *Stylonychia mytilus* как тест-объектов при исследовании токсического действия гербицидов. Экспериментальным путем определена минимальная концентрация гербицидов, не подавляющая рост клеток стилонихий.

Впервые проведено биотестирование почвы с использованием *Stylonychia mytilus*, с содержанием глифосата, фактически применяемом при обработки сельскохозяйственных культур.

При биотестировании было установлено, что в качестве ответной реакции на гербицидное загрязнение происходят отклонения на клеточном уровне в виде изменения морфологических параметров клетки *Stylonychia mytilus*.

Экспериментально подтверждено, что содержание гербицида в зерне в остаточных количествах (7, 14, 28 мг/кг) вызывает угнетение функции репродуктивной системы опытных животных, негативно воздействует на жизнеспособность потомства. В результате исследований установлены патоморфологические признаки хронического отравления лабораторных животных. Обнаружены морфологические изменения в печени и отделах кишечника опытных животных. Впервые изучено воздействие остаточного количества глифосата, при длительной интоксикации, на качественные и количественные изменения форменных клеток периферической крови. Показано цитотоксическое воздействие на эритроциты крови.

**Практическая значимость.** В ходе проведенных исследований установлена чувствительность стилонихий к различному содержанию гербицидов в водных растворах. Полученные данные позволяют предложить *Stylonychia mytilus* в качестве тест-объекта при исследовании сточных вод к пестицидному загрязнению при производстве химических веществ.

Сформулированные в работе подходы по биотестированию почвы, позволяют применить полученные данные при определении токсичности почв, в случае применения глифосата при выращивании сельскохозяйственных культур.

Экспериментальные данные по определению хронической пестицидной интоксикации лабораторных животных при содержании глифосата в зерне в количестве 7, 14, 28 мг/кг позволяют получить более полную и объективную информацию о неблагоприятном воздействии глифосата. Данные о токсичности глифосата могут быть использованы в практических целях при установлении допустимого уровня загрязнения природных объектов.

Культура *Stylonychia mytilus* используется при проведении лабораторных занятий по дисциплине «Химическая и биологическая безопасность пищевых продуктов питания» специальности 19.03.01 «Биотехнология».

**На защиту выносятся:**

1) *Stylonychia mytilus* может быть использована в качестве тест-объекта для определения токсичности гербицидов в водных растворах.

2) Установлены концентрации исследуемых пестицидов, при которых отмечается достоверная гибель тест-культуры через 24 часа.

3) В ходе работы выявлены существенные изменения морфологических параметров тест-культуры при действии испытываемых веществ.

4) Относительная низкая токсичность почв на *Stylonychia mytilus* объясняется характером взаимодействия между фоновым приоритетным загрязнителем и частицами почвы.

5) В хроническом эксперименте наблюдается выраженный эффект подавления фертильности у мышей, морфологические изменения паренхиматозных органов, а также количественные и качественные изменения форменных клеток крови.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на научных конференциях и съездах, среди которых: VI Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, Россия, 2018); Всероссийская конференция с международным участием и элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология – 2018» (Тула, Россия, 2018); Научно-практическая конференция обучающихся «Теоретические исследования и экспериментальные разработки студентов и аспирантов ТвГТУ» (Тверь, Россия, 2019); VIII Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, Россия, 2020); IV Международная конференция «AGRITECH-IV-2020: Агробизнес, экологический инжиниринг и биотехнологии» (Красноярск, Россия, 2020); 20-я Международная научная Геоконференция SGEM 2020 (Албена, Болгария, 2020); Международная научная конференция «Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии» (Екатеринбург, Россия, 2020).

**Личный вклад автора.** Автор принимал личное участие на всех этапах исследования. Выполнены постановка цели и задач исследований, обобщены литературные данные. Проведено культивирование стилонихий, подобраны условия подготовки водных и почвенных объектов, проведен эксперимент по биотестированию на стилонихиях. Непосредственно автором был проведен эксперимент по изучению хронической интоксикации глифосатом на лабораторных животных. Осуществлены микроскопические исследования препаратов крови и гистологических препаратов печени. Выполнен анализ полученных экспериментальных данных. Подготовлены материалы конференций и статей.

**Публикации результатов исследований.** По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 2 работы в изданиях, входящих в международную реферативную базу данных Scopus, 2 работы в изданиях из рекомендованного перечня ВАК Минобрнауки РФ.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 137 страницах печатного текста, состоит из введения, трех глав, заключения и списка литературы. Работа содержит 22 таблицы, 26 рисунков и фотографий. Список использованной литературы включает 186 работ, в том числе 146 отечественных и 40 зарубежных авторов.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** обоснована актуальность исследования, цель и задачи работы, ее научная новизна и практическая значимость.

**В первой главе** представлен обзор научно-технической литературы, в которой показано практическое применение пестицидов, описаны свойства наиболее популярных гербицидов и механизм действия на растения, представлены данные об уровнях остатков пестицидов в объектах окружающей среды и возможных путях трансформации в естественных условиях. Анализ литературных данных показал, что наличие различных химических веществ в остаточных количествах привело к развитию биотестирования на клеточном и организменном уровнях с целью определения их токсического действия. Дано описание различных тест-объектов и их ответной реакции на действие пестицидов, представлены преимущества биологических тест-систем и требования к ним.

**Во второй главе** изложены материальная часть, объекты и методы исследования.

**В третьей главе** представлены результаты и их обсуждение. Для расчета фактически применяемых в сельском хозяйстве концентраций гербицидов использовали инструкции к применению препаратов. Расчет содержания гербицидов в почве проводился при условии обработки растений опрыскиванием. На основании литературных данных (Куликова Н.А., 2010) проникновение пестицидов в почву принимали равным 70% от общего объема рабочей жидкости гербицида, плотность почвы - 1,2 г/см<sup>3</sup>, глубина проникновения гербицидов равнялась глубине пахотного слоя - 20 см. Результаты расчета представлены в таблице 1.

С учетом расчетных концентраций первый этап биотестирования водных образцов на *Stylonychia mytilus* был проведен с содержанием гербицидов в лунке от 1 до 100 мг/л.

*Stylonychia mytilus* является естественным представителем почвенной биоты и удовлетворяет основным требованиям, предъявляемым к тест-объектам.

При выборе оптимальных условий пробоподготовки исследуемых пестицидов основывались на справочных данных о растворимости гербицидов в воде, в результате чего указанный эксперимент проводили с наименее растворимым препаратом – глифосатом. Растворение глифосата осуществляли при температурах 30 °С и 60 °С, с применением ультразвука (УЗ) и без УЗ. Полное растворение глифосата подтверждалось методом ВЭЖХ. Анализ экспериментальных данных позволил установить, что оптимальными условиями

растворения глифосата является использование ультразвука в течение 45 мин при температуре 60 °С. Эти условия пробоподготовки использовались и при применении других исследуемых гербицидов.

Таблица 1

Расчетные концентрации гербицидов

Наименование препарата	Наименование действующего вещества	Расчетная концентрация гербицидов в 1 кг почвы ( $C_{\min}$ , $C_{\max}$ ), мг/кг
«Торнадо 500, ВР»	Глифосат	$C_{\min} = 219$ ; $C_{\max} = 438$ (паровые поля) $C_{\min} = 438$ ; $C_{\max} = 583$ (поля под посев)
«Дикопур Ф, ВР»	2,4-Д	$C_{\min} = 175$ ; $C_{\max} = 280$
«Лорнет, ВР»	Клопиралид	$C_{\min} = 14$ ; $C_{\max} = 58$

Для изучения токсичности гербицидов, в качестве тест-объектов было выбрано биотестирование на суточной культуре стилонихий (*Stylonychia mytilus*). Культивирование стилонихий и подготовку суточной культуры осуществляли по ГОСТ 31674-2012 «Корма, комбикорма, кормовое сырье. Методы определения общей токсичности».

Для определения оптимального количества клеток простейших был проведен эксперимент с растворами глифосата в концентрациях 60, 70, 80 мг/л при времени воздействия 24 часа. Результаты опыта представлены в таблице 2.

Таблица 2

Численность клеток в зависимости от концентрации глифосата в растворе

Концентрация глифосата, мг/л	Количество клеток стилонихий в лунке микроаквариума						
	2	3	5	6	8	9	15
Исходное значение простейших	2	3	5	6	8	9	15
Контроль, через 24 часа	7	7	10	14	15	22	30
60	5	7	9	11	15	18	20
70	0	0	1	4	5	6	21
80	0	0	0	1	2	3	22

Опыт показал, что при концентрациях гербицида 70, 80 мг/л единичные клетки инфузорий погибали, при большом количестве (15 клеток) - увеличивался рост числа простейших практически в 1,5 раза. Полученные данные не давали однозначной интерпретации о токсичности гербицидов. При концентрации гербицида 60 мг/л ответная реакция стилонихий при различной численности была одинакова, в среднем рост клеток увеличился вдвое при времени экспозиции 24 часа.

Кроме того, большое количество инфузорий (более 20 клеток) в лунке затрудняло подсчет простейших, что делало его недостоверным в ходе дальнейшего исследования. Исходя из экспериментальных данных, оптимальное количество стилонихий в лунке для биомониторинга было взято от 6 до 9 клеток.

Для оценки воздействия гербицидов при биотестировании на простейшие учитывали следующую тест-реакцию: изменение количества инфузории (выживаемость, размножение). В зависимости от выживаемости стилонихий выделяли следующие критерии токсичности: «нетоксичный», «токсичный». При выживаемости инфузорий в количестве менее 50% и времени экспозиции 24 часа концентрация гербицидов считали «токсичной», при выживаемости инфузорий в количестве более 50% и суточной экспозиции - «нетоксичной».

Для биотестирования готовили модельные растворы гербицидов (глифосат, 2,4-Д, клопиралид) с концентрациями от 2 до 200 мг/л, с учетом двукратного разбавления, концентрации в лунках при биотестировании составляли от 1 до 100 мг/л. Изменение количества простейших учитывали через 2, 6, 24, 72 часа относительно начала опыта.

Глифосат при концентрации 90, 100 мг/л показывал высокую токсичность по отношению к инфузориям, происходила полная гибель клеток. Ингибирующие концентрации - 70, 80 мг/л: при времени экспозиции 24 часа, выживаемость инфузорий составляла 66, 25 % соответственно. Таким образом, концентрацию глифосата 70 мг/л интерпретировали «нетоксичной», прирост клеток через 72 часа увеличивался в 1,5 раза. Концентрация гербицида, которая не подавляла рост клеток, 60 мг/л. При концентрациях глифосата от 10 до 60 мг/л и времени экспозиции 24, 72 часа наблюдался интенсивный рост клеток.

При тестировании растворов гербицида 2,4-Д зафиксированы летальные концентрации от 60 до 100 мг/л. Содержание гербицида 2,4-Д в количестве 50 мг/л являлось токсичным, так как выживаемость стилонихий составляла 42,8%. Ингибирующая концентрация, при которой происходила частичная гибель инфузорий - 40 мг/л. Данная концентрация все же не являлась токсичной, поскольку численность клеток при суточной экспозиции увеличивалась в 1,3 раза. Концентрация гербицида, которая не подавляла рост клеток - 30 мг/л. При концентрациях от 1 до 30 мг/л и времени экспозиции 24 часа численность стилонихий увеличивалась в 2 раза.

Растворы с содержанием клопиралида в количестве от 60 до 100 мг/л вызвали полную гибель клеток. Концентрации, подавляющие рост клеток, составляли 40, 50 мг/л. Выживаемость простейших при концентрации 50 мг/л и суточной экспозиции - 86 %, при содержании клопиралида в количестве 40 мг/л и времени экспозиции 24 часа наблюдалось увеличение количества инфузорий в 1,4 раза. При концентрациях от 1 до 30 мг/л и суточной экспозиции увеличение количества стилонихий составляло более чем в 1,6 раза. Из опытных данных можно



сделать вывод, что клопиралид при концентрациях 50 мг/л и менее, при времени выдержки в течении 24 часов не являлся токсичным для *Stylonychia mytilus*.

Результаты исследования показали, что ответная реакция простейших *Stylonychia mytilus* наблюдалась на пестициды различной структуры и в концентрациях от 1 до 100 мг/л. Следовательно, инфузории можно использовать в качестве тест-объекта для оценки воздействия на клеточный организм токсичных веществ в различных концентрациях.

Присутствие гербицидов в водных растворах вызывало изменение размеров стилонихий. При подсчете количества клеток с выдержкой 72 часа в лунках микроаквариума наблюдалось большое количество особей стилонихий, в 10-15 раз меньше материнских. Изменение размера клеток инфузорий происходило при добавлении всех гербицидов (глифосата, 2,4-Д, клопиралида) при концентрации, не подавляющей рост инфузорий, и до 1 мг/л, рисунок 1.

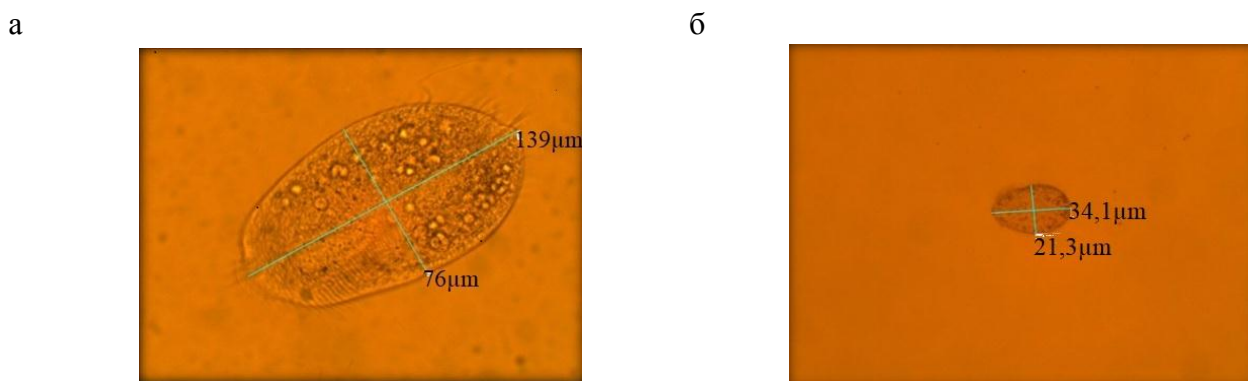


Рис. 1. – Форма и размер клетки инфузории: а - в начале опыта; б - при концентрации глифосата 40 мг/л, время экспозиции 72 часа

Апробация *Stylonychia mytilus* в качестве тест-объекта проводилась при оценке токсичности почвы, зараженной гербицидом.

Учитывая опубликованные данные ФГБУ «Россельхозцентр» о наиболее востребованных гербицидосодержащих препаратах в России в 2018 году, глифосатсодержащие препараты занимают ведущее место. Дальнейшее биотестирование почвы проводили с использованием глифосата.

Глифосат может связываться с частицами почвы, образуя комплексы. При этом важное значение имеет структура почвы. В частности, из песчаной почвы глифосат может быть достаточно быстро вымыт водой, а в почвах с высоким содержанием глины храниться годами.

Биотестирование проводили на почвах различного гранулометрического состава. В зависимости от содержания глины, образцы представляли собой три типа почв: легкосуглинистая, супесчаная, легкоглинистая. Биотестирование проводилось на образцах почвы, зараженной глифосатом с концентрацией 200 мг/кг. Экспериментальные данные показали, что водные вытяжки всех типов почв не являлись токсичными. Количество

стилонихий при суточной экспозиции в опытных образцах увеличилось в среднем в 1,6 раза, в контрольных - в 2 раза.

Для определения содержания глифосата в водных вытяжках были приготовлены образцы из всех типов почв, зараженных глифосатом с концентрацией 200 мг/кг, с выдержкой 1, 2, 3 часа при температуре 60 °С. Количественное определение гербицида в водных образцах проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Средние концентрации глифосата в водных вытяжках легкосуглинистой, супесчаной и легкоглинистой почв составили от 29,56 до 35,48 мг/л, таблица 3. В ходе опыта нами были получены результаты, которые наглядно демонстрировали, что почвы различного гранулометрического состава с концентрацией глифосата 200 мг/кг не являлись токсичными.

Таблица 3

Содержание глифосата в водных вытяжках

З	Время экспозиции при 60 °С, ч	Средняя концентрация глифосата в водной вытяжке, мг/л
Легкосуглинистая почва	1	34,80 ± 1,04
	2	33,54 ± 1,01
	3	34,53 ± 1,04
Супесчаная почва	1	33,83 ± 1,01
	2	33,90 ± 1,02
	3	35,48 ± 1,06
Легкоглинистая почва	1	29,56 ± 0,89
	2	31,08 ± 0,93
	3	32,03 ± 0,96

Учитывая, что расчетное содержание глифосата составляет от 200 до 600 мг на 1 кг почвы, для дальнейшего биотестирования были подготовлены пробы почвы различного гранулометрического состава с концентрациями глифосата 400, 600 мг/кг, время выдержки для приготовления водной вытяжки - 1 час при температуре 60 °С.

Водные вытяжки, полученные из почвы с содержанием глифосата 400 мг/кг, не являлись токсичными. При суточной экспозиции численность стиложихий увеличилась в среднем в 1,7 раз, в контрольных образцах – в 2 раза, при экспозиции 72 часа наблюдался активный рост инфузорий в опытных и контрольных образцах.

Ответная реакция *Stylonychia mytilus* наблюдалась при концентрации гербицида в почве от 600 мг/кг, которая выражалась в ингибирующем действии на размножение инфузорий. При биотестировании почвы с содержанием гербицида 600 мг/кг наблюдалось уменьшение

количества клеток в среднем до 81 % относительно начала опыта (0 часов), в контрольных опытах численность стилонихий увеличилась в среднем в 2,1 раза. Необходимо отметить, что при биотестировании почвы при различных концентрациях глифосата (200, 400, 600 мг/кг), также наблюдались морфологические изменения дочерних клеток инфузорий в сторону уменьшения размеров, что свидетельствует о негативном влиянии гербицида на клеточный организм.

В сельскохозяйственной практике гербициды используют многократно, что в разы увеличивает содержание пестицидов в почве. Вследствие этого, концентрации гербицидов в почве являются достаточными для получения ответной реакции инфузорий.

Для изучения влияния глифосата на микробное сообщество биотестирование проводили с помощью почвы и торфонавозной смеси, которые обрабатывали гербицидом в концентрациях 200, 400, 600 мг/кг. В качестве контрольных образцов использовали почву и смесь свободные от гербицида. Исследование торфонавозной смеси проводили с учетом видового разнообразия микробного сообщества. Идентификацию микроорганизмов осуществляли с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра.

В целях максимально возможного получения видового разнообразия почвенных микроорганизмов на первой стадии процесса почву и смесь инкубировали 48 часов при температуре  $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ .

По результатам микробиологического анализа опытных и контрольных образцов торфонавозной смеси выявлен активный (сплошной) рост многих представителей мезофильных микроорганизмов. Микробное сообщество было представлено бактериями семейства *Enterococcaceae*, *Escherichia coli*, плесневыми микрогрибами рода *Aspergillus spp.*, *Mucor spp.*, бактериями рода *Proteus* и *Citrobacter*. При микробиологическом посеве почвы наблюдался менее активный рост мезофильных культур, с гораздо меньшим разнообразием микрофлоры. Почвенная флора была представлена единичными колониями плесневых микрогрибов рода *Aspergillus spp.*, *Escherichia coli* и большей частью представителями спорообразующих почвенных бактерий *Bacillus cereus*.

Для исследования влияния глифосата на термофильных представителей почвенной флоры, опытные и контрольные образцы почвы и смеси подвергали термостатированию при температуре  $(60 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$  в течение 48 часов. Установление пастеризационного периода способствовало уменьшению общей численности микроорганизмов. Микробное сообщество почвы и смеси было представлено термофильными спорообразующими палочковидными бактериями *Bacillus spp.* Дальнейшее снижение температуры до  $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$  слабо влияло на рост и видовое разнообразие почвенной биоты. Видовой состав микроорганизмов в торфонавозной смеси и почве при различных условиях культивирования приведен в таблице 4.

## Видовой состав микроорганизмов

Содержание глифосата в образцах, мг/кг	Условия культивирования, численность и наименование колоний микробного сообщества	
	48 часов при температуре 37 °С	48 часов при температуре 60 °С
	Легкосуглинистая почва	
200	<i>E. coli</i> *, плесневые грибы рода <i>Aspergillus spp.</i> *, <i>Bacillus cereus</i> , численность колоний 3,2 <sup>10</sup> <sup>3</sup> КОЕ/г	бактерии <i>Bacillus cereus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , численность колоний 2,4 <sup>10</sup> <sup>2</sup> КОЕ/г
400	<i>E. coli</i> *, плесневые грибы рода <i>Aspergillus spp.</i> *, численность колоний 2,8 <sup>10</sup> <sup>3</sup> КОЕ/г	бактерии <i>Bacillus cereus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , численность колоний 2,5 <sup>10</sup> <sup>2</sup> КОЕ/г
600	<i>E. coli</i> *, плесневые грибы рода <i>Aspergillus spp.</i> *, <i>Bacillus cereus</i> , численность колоний 2,8 <sup>10</sup> <sup>3</sup> КОЕ/г	бактерии <i>Bacillus cereus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , численность колоний 2,4 <sup>10</sup> <sup>2</sup> КОЕ/г
	Торфоновозная смесь	
200	бактерии рода <i>Citrobacter</i> и <i>Proteus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterococcaceae</i> , плесневые грибы рода <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Mucor spp.</i> , более 8 <sup>10</sup> <sup>4</sup> КОЕ/г	бактерии <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , численность колоний 1 <sup>10</sup> <sup>3</sup> КОЕ/г
400	бактерии рода <i>Proteus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterococcaceae</i> , плесневые грибы рода <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Mucor spp.</i> , более 8 <sup>10</sup> <sup>4</sup> КОЕ/г	бактерии <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , численность колоний 7 <sup>10</sup> <sup>2</sup> КОЕ/г
600	бактерии рода <i>Citrobacter</i> и <i>Proteus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterococcaceae</i> , плесневые грибы рода <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Mucor spp.</i> , более 8 <sup>10</sup> <sup>4</sup> КОЕ/г	бактерии <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , численность колоний 8 <sup>10</sup> <sup>2</sup> КОЕ/г
	Легкосуглинистая почва	
Контроль	<i>E. coli</i> *, плесневые грибы рода <i>Aspergillus spp.</i> *, <i>Bacillus cereus</i> , 3,2 <sup>10</sup> <sup>3</sup> КОЕ/г	бактерии <i>Bacillus cereus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , численность колоний 3,2 <sup>10</sup> <sup>2</sup> КОЕ/г
	Торфоновозная смесь	
Контроль	бактерии рода <i>Citrobacter</i> и <i>Proteus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterococcaceae</i> , плесневые грибы рода <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Mucor spp.</i> , более 1 <sup>10</sup> <sup>7</sup> КОЕ/г	бактерии <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. altitudinis</i> , численность колоний 5,8 <sup>10</sup> <sup>2</sup> КОЕ/г
* - Единичные колонии.		

Опытные данные показывают, что глифосат при различных концентрациях не оказывал выраженного негативного воздействия на видовой состав и численность микроорганизмов.

Следующим этапом работы было определение хронической токсичности глифосата, содержащегося в зерне, в концентрациях 7, 14 и 28 мг/кг при биотестировании на белых мышах. Концентрации пестицида были взяты на основании литературных данных (Кузнецова Е.М., 2010) по изучению остаточного количества гербицида в сельскохозяйственных культурах.

Эксперимент выполняли в две стадии. Первая стадия предусматривала раздельное содержание самцов и самок в течение 1 месяца до достижения половозрелого возраста 3-х месяцев. Для этого животные были распределены на 16 групп, и помещались в индивидуальные клетки следующим образом: четыре клетки по 3 самца, двенадцать клеток по 3 самки. Далее из них формировались 4 подгруппы, каждая из которых включала одну клетку с самцами и три клетки с самками. Животных каждой подгруппы кормили соответственно зерном, свободным от глифосата и зерном, содержащим глифосат в количестве 7, 14 и 28 мг/кг.

Вторая стадия предусматривала перераспределение животных из 16 групп на 12 семей. С учетом схемы кормления на первой стадии, в индивидуальную клетку с самками помещали самца. В результате были образованы также 4 подгруппы. В соответствии с этим распределением каждая подгруппа животных содержала по 3 семейства мышей, и на протяжении всего опыта каждая подгруппа получала в корм зерно, содержащее определенное количество глифосата 7, 14, 28 мг/кг и без него (контрольная группа). Вода подавалась из поилок, кормление осуществлялось раз в сутки без ограничения.

Для наблюдения динамики воздействия гербицида на животных,  $\frac{1}{2}$  часть лабораторных мышей содержалась по схеме второй стадии в течении 3 месяцев, затем умерщвлялась методом декапитации, другая часть - через 5 месяцев.

Критериями хронической токсичности служили изменение поведенческих реакций животных, воспроизводство потомства, количество особей в потомстве и жизнеспособность детенышей, число павших животных и сроки их гибели, изменения в клетках крови и тканях органов.

Клиническая картина у мышей в опытных подгруппах не имела признаков отравления, изменений в поведении животных не наблюдалось.

Воспроизводство потомства в контрольных и опытных подгруппах животных различалось существенно. Появление первого потомства в контрольных подгруппах зарегистрировано в период от 20–23 дней после начала второго этапа эксперимента. Число детёнышей варьировало от 6 до 9 особей.

В подгруппе лабораторных животных, кормление которых осуществлялось зерном овса, содержащего гербицид в количестве 7 мг/кг, потомство воспроизвела только одна самка. Период до появления потомства составил 68 дней с задержкой от 46 до 48 дней по сравнению с контрольной подгруппой. В помёте насчитывалось 6 детёнышей, продолжительность их жизни составила от 1 до 3 дней.

В подгруппе животных, кормление которых осуществлялось зерном овса, содержащего глифосат 14 мг/кг, потомство также воспроизвела единственная самка, период до воспроизводства потомства составил 80 дней с задержкой от 60 до 58 дней по сравнению с

контрольной подгруппой, число детёнышей составило 7, продолжительность их жизни от 1 до 4 дней. Самки из третьей опытной подгруппы, кормление в которой осуществлялось зерном овса, содержащего глифосат 28 мг/кг, не принесли потомства за время эксперимента. При патологоанатомическом вскрытии по истечении 5 месяцев после начала второго этапа эксперимента у единственной самки из подгруппы в рогах матки обнаружены 7 эмбрионов.

При исследовании мазков периферической крови было выявлено количественное изменение содержания форменных клеток у опытных животных по сравнению с контрольными. Токсическое воздействие гербицида выразилось в подавлении лимфоцитобразования, рисунок 2.

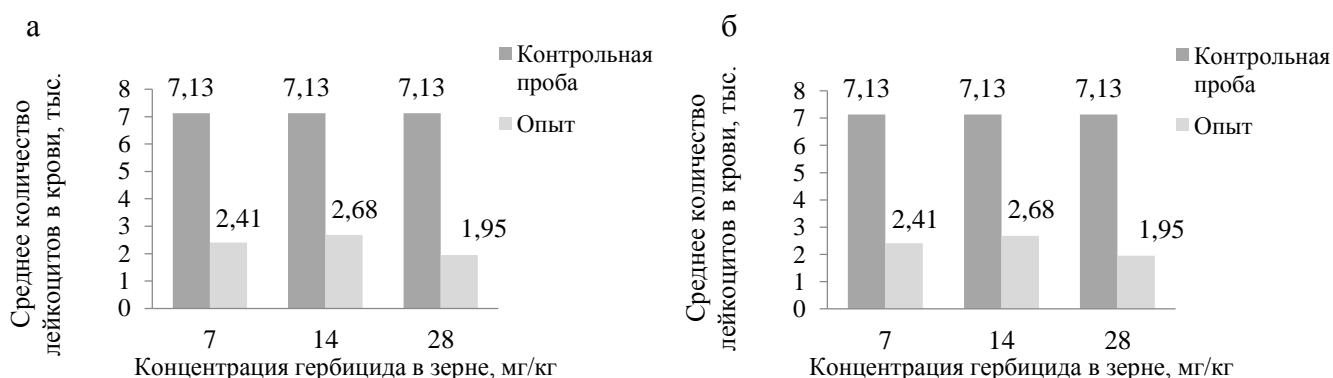


Рис. 2. Количество лейкоцитов в крови лабораторных мышей, питавшихся в эксперименте зерном овса, обработанным глифосатом в разной концентрации, в течение: а – 4 месяцев; б – 6 месяцев.

Количество лейкоцитов в крови в подгруппе животных, кормление которых осуществлялось зерном с содержанием гербицида 7 мг/кг, снизилось в среднем на 30 и 66 % спустя 4 и 6 месяцев соответственно; в группе животных, которых кормили зерном с содержанием гербицида 14 мг/кг, снижение составило 30 и 62 % через 4 и 6 месяцев соответственно, у животных, получавших корм с содержанием гербицида 28 мг/кг, количество лейкоцитов упало на 38 и 73% соответственно.

В ходе всего эксперимента у опытных животных наблюдалось снижение числа эритроцитов крови. Среднее уменьшение количества эритроцитов в первой подгруппе составило 23 и 38 % через 4 и 6 месяцев соответственно, во второй – 36 и 47 %, а в третьей – 43 и 59 % соответственно, рисунок 3.

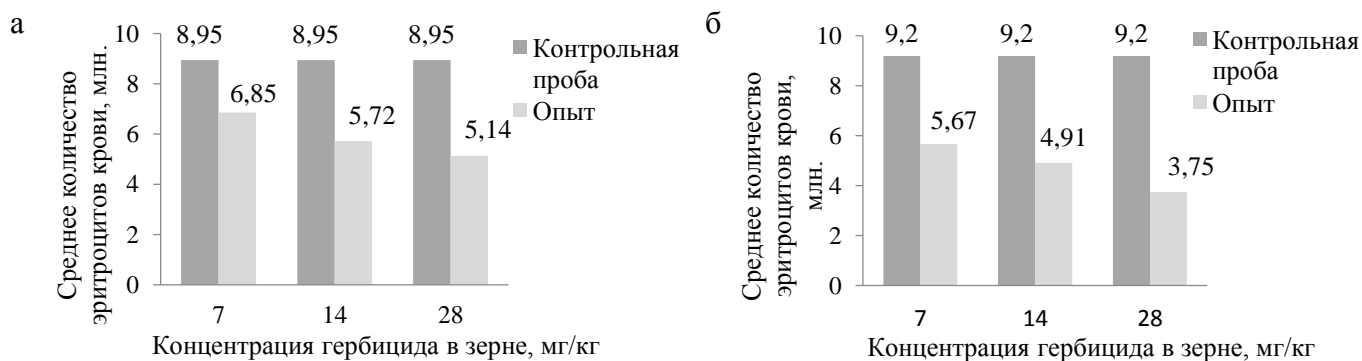


Рис. 3. Количество эритроцитов в крови лабораторных мышей, питавшихся в эксперименте зерном овса, обработанным глифосатом в разной концентрации, в течение: а – 4 месяцев; б – 6 месяцев.

При исследовании цитологических препаратов крови получены следующие результаты. Большинство эритроцитов нормохромные, имеют одинаковую форму, центральную зону просветления. В тоже время, при исследовании цитологических препаратов в мазках крови всех опытных животных наблюдались качественные изменения эритроцитов, выраженные анизо- и пойкилоцитозом, рисунок 4.

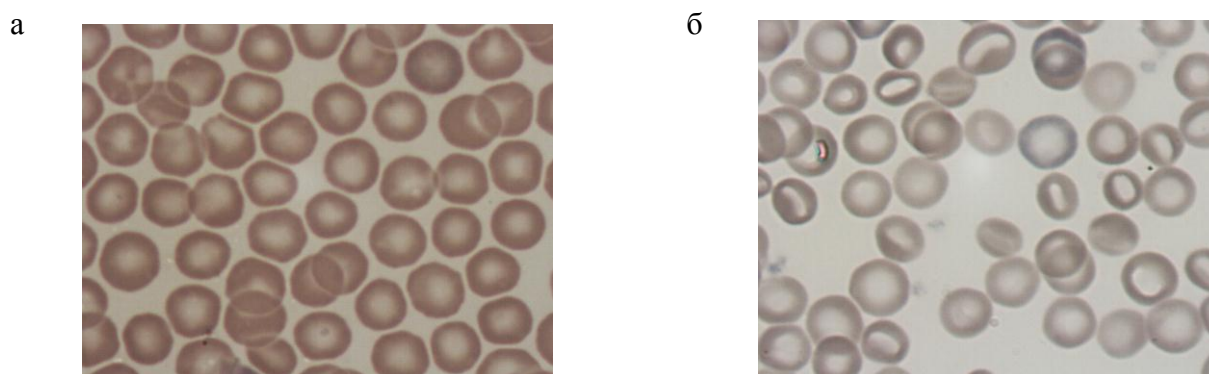


Рис. 4. Эритроциты в крови лабораторных мышей, питавшихся в эксперименте зерном овса, период кормления 4 месяца: а – контрольные животные; б – концентрация гербицида в зерне 28 мг/кг.

При патологоанатомическом исследовании лабораторных животных из контрольного опыта состояние паренхиматозных органов соответствовало норме. У опытных животных выраженные изменения обнаружены в печени, тонком и толстом отделе кишечника. В результате хронической интоксикации печень слегка увеличена в размерах, дряблой консистенции, светло-коричневого цвета. Стенки тонкого и толстого отделов кишечника серого цвета, консистенция дряблая, слизистая оболочка светло-коричневого цвета, циркулярно расположенные складки не просматривались, слизистая оболочка местами слущивалась. Наиболее ярко патологические изменения стенки кишечника были выражены у мышей,

поедавших зерно с концентрацией гербицида 28 мг/кг, в виде точечных кровоизлияний под слизистой оболочкой тонкого кишечника.

При микроскопическом исследовании гистологических препаратов печени наиболее сильные изменения также обнаружены у опытных животных, поедающих зерно с максимальной концентрацией гербицида. В капиллярных протоках наблюдалось значительное количество лейкоцитов, нечеткое прослеживание балочно-радиального строения печеночных долек, расширение синусоидных капилляров, удлинённая полигональная форма гепатоцитов и увеличение размера клеток. У животных, поедающих зерно, содержащее гербицид в количестве 7, 14 мг/кг, наблюдалось расширение синусоидных капилляров, в протоках просматривались единичные лимфоциты. В таблице 5 приведены некоторые значения ширины синусоидных капилляров лабораторных животных различных групп.

Таблица 5

Ширина синусоидов печени

Номер образца	Ширина синусоидного капилляра, мкм
К(3)-1 (животное из контрольной подгруппы)	3,8; 3,9; 4,2; 4,4; 4,7; 4,9; 4,9; 5,3; 5,2; 5,8; 6,2; 6,9; 7,4; 7,8; 8,2
7(3)-1 (животное из опытной подгруппы, содержание глифосата в зерне 7 мг/кг)	6,7; 6,8; 7,2; 7,3; 7,3; 7,4; 7,4; 7,7; 7,9; 8,2; 8,6; 8,9; 9,1; 9,5; 9,7
14(1)-2 (животное из опытной подгруппы, содержание глифосата в зерне 14 мг/кг)	5,8; 6,2; 6,5; 6,5; 6,9; 7,1; 7,2; 7,3; 7,4; 8,1; 8,5; 8,9; 10,7; 13,3; 15,1
28(3)-2 (животное из опытной подгруппы, содержание глифосата в зерне 28 мг/кг)	5,8; 5,9; 6,1; 6,3; 7,7; 7,9; 9,4; 10,3; 10,9; 11,3; 12,1; 12,5; 12,5; 12,6; 14,6

Исследования показали, что остаточное количество глифосата в зерне с концентрациями 7, 14, 28 мг/кг способно вызывать количественное и качественное изменение форменных клеток крови, негативно воздействуя на кроветворную систему. Установлено, что происходит угнетение функции репродуктивной системы опытных животных и изменение структуры паренхиматозных органов. Опытные данные свидетельствуют о хронической токсичности глифосата при исследуемых концентрациях.

## ВЫВОДЫ

1) Широкое распространение получили методы биотестирования, основанные на изучении одноклеточных и низших животных, т.к. они характеризуются непродолжительным жизненным циклом развития, хорошей выживаемостью в условиях *in vitro* и позволяют получать экспресс информацию. Экспериментальные животные являются удобным тест-



объектом для оценки токсического потенциала гербицидов. При биоиндикации на организменном уровне используются лабораторные мыши, крысы.

2) Оптимальное количество простейших для проведения биомониторинга - 6-9 клеток *Stylonychia mytilus*.

3) Ответная реакция простейших наблюдалась при концентрациях гербицидов (глифосата, клопиралида, 2,4-Д) от 1 до 100 мг/л. Биоиндикатор проявил быструю ответную реакцию. Это позволяет использовать стилонихии в качестве тест-объекта для оценки воздействия гербицидов при различных концентрациях.

4) При биотестировании почвы различного гранулометрического состава при концентрациях глифосата 200, 400, 600 мг/кг ответная реакция стилонихий наблюдается при содержании гербицида в почве 600 мг/кг. Снижение количества клеток составляет в среднем до 81 % относительно начала опыта, в то время как контрольных опытах численность простейших увеличивается в среднем в 2,1 раза. Кроме того, при биотестировании почвы при различных концентрациях от 200 до 600 мг/кг наблюдается ответная реакция стилонихий в виде морфологических изменений в сторону уменьшения размеров клеток.

5) Глифосат при концентрациях от 200 до 600 мг/кг не оказывал негативного воздействия на микробное сообщество почвы и торфонавозной смеси. Кроме того, в экспериментальных образцах идентифицированы бактерии рода *E. coli*, *Proteus*, *Bacillus*, которые способны осуществлять биodeградацию фосфорорганических гербицидов.

6) На всем протяжении эксперимента гибель мышей не зарегистрирована. За время проведения опыта животные всех групп были активны, хорошо поедали корм. В ходе длительной интоксикации глифосатом при концентрациях 7, 14, 28 мг/кг было отмечено снижение фертильности и жизнеспособности потомства опытных животных по сравнению с контрольными.

7) При патологоанатомическом вскрытии мышей, перенесших хроническую интоксикацию, наблюдались изменения печени, тонкого и толстого отделов кишечника. Патологические изменения в стенке кишечника у мышей, поедающих зерно с концентрацией гербицида 28 мг/кг, более ярко выражены, и появляются более тяжелые повреждения: точечные кровоизлияния под слизистой оболочкой тонкого кишечника.

8) Данные опытов показали количественные и качественные изменения форменных клеток крови. Наблюдалось снижение количества лейкоцитов в среднем от 30 до 73 % и эритроцитов в среднем от 23 до 59 % у опытных животных на всем протяжении эксперимента. Качественные изменения клеток крови выражались в виде анизоцитоза и пойкилоцитоза.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*Публикации изданиях, индексируемых в международных базах данных:*

1. Fomicheva N., Rabinovich G., Prutenskaya E., Stepacheva A., **Shuvalova N.** Microbiological aspects of organic fertilizers production through fast fermentation of organic feedstock // 20th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2020. 2020. Vol.20. P. 267 – 272.
2. **Shuvalova N.**, Prutenskaya E., Sulman M. Determination of chronic toxicity of glyphosate by biotesting in laboratory mice // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2021. № 677. 042035.

*Публикации в рецензируемых изданиях из перечня ВАК:*

3. **Шувалова Н.Е.**, Прутенская Е.А., Сульман Э.М., Сульман М.Г. Биотестирование гербицидов на *Stylonychia mytilus* // Вестник Тверского государственного университета. Серия «Биология и экология». 2018. № 4. С. 262 - 269.
4. **Шувалова Н.Е.**, Прутенская Е.А., Сульман М.Г. Оценка воздействия глифосата при низких концентрациях в кормовых зерновых культурах на биохимические показатели крови и органы лабораторных мышей // Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология». 2021. Т. 35. С. 97 – 107.

*Публикации в других изданиях:*

5. **Шувалова Н.Е.**, Сульман Э.М., Прутенская Е.А. Оценка безопасности гербицидов с помощью стилонихий // Актуальная биотехнология. № 3(26). 2018. С. 221 - 224.
6. **Шувалова Н.Е.**, Прутенская Е.А., Сульман Э.М., Чагина А.В. Исследование влияния токсического действия глифосата на *Stylonychia mytilus* // Всероссийская конференция с международным участием и элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2018». 2018. С. 62 – 63
7. **Шувалова Н.Е.**, Чагина А.В., Прутенская Е.А. Тестирование токсичности гербицидов на *Stylonychia mytilus* // Теоретические исследования и экспериментальные разработки студентов и аспирантов : сборник научных трудов : в 2 ч. Ч. 1 / под ред. Т.Б. Новиченковой. Тверь : Тверской государственной технической университет. 2019. С. 227 – 229.
8. **Шувалова Н.Е.**, Прутенская Е.А. Биотестирование глифосата в природных объектах с помощью стилонихий // Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии: Материалы заочных докладов Международной научной конференции (18–21 ноября 2020 г., Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия) / под ред. Т. В. Глухаревой, Ю. И. Нейн, Т. А. Пospelовой, В. А. Бакулева. – Екатеринбург : Издательство АМБ. 2020. С. 453 - 454.
9. **Шувалова Н.Е.**, Сульман М.Г., Прутенская Е.А. Биотестирование токсичности пестицидов на клеточных и организменных тест-системах // Актуальная биотехнология. № 3(34). 2020. С.40 – 44.