



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/см³, 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.

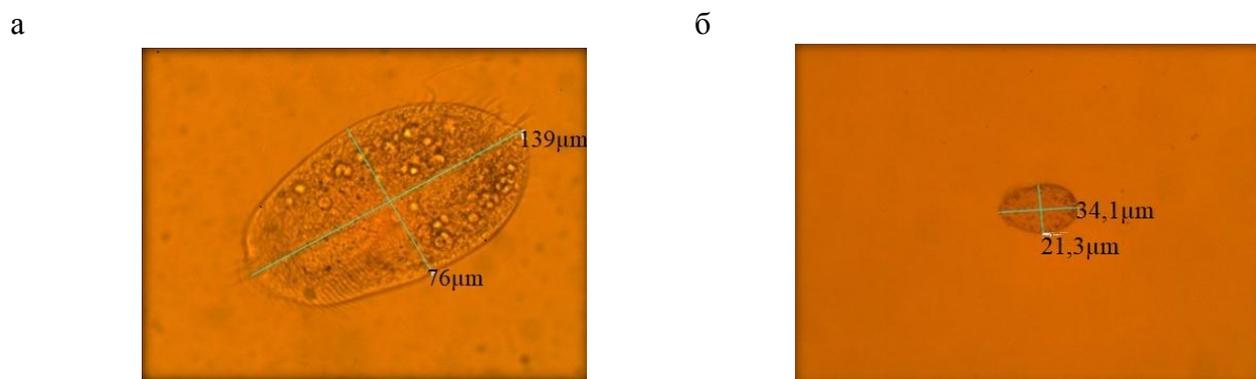


Рис. 1. – Форма и размер клетки инфузории: а - в начале опыта; б - при концентрации глифосата 40 мг/л, время экспозиции 72 часа

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 стилоухий 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 ¹⁰ ³ КОЕ/г	бактерии <i>Bacillus cereus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , численность колоний 2,4 ¹⁰ ² КОЕ/г
400	<i>E. coli</i> *, плесневые грибы рода <i>Aspergillus spp.</i> *, численность колоний 2,8 ¹⁰ ³ КОЕ/г	бактерии <i>Bacillus cereus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , численность колоний 2,5 ¹⁰ ² КОЕ/г
600	<i>E. coli</i> *, плесневые грибы рода <i>Aspergillus spp.</i> *, <i>Bacillus cereus</i> , численность колоний 2,8 ¹⁰ ³ КОЕ/г	бактерии <i>Bacillus cereus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , численность колоний 2,4 ¹⁰ ² КОЕ/г
	Торфонавозная 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 ¹⁰ ⁴ КОЕ/г	бактерии <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , численность колоний 1 ¹⁰ ³ 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 ¹⁰ ⁴ КОЕ/г	бактерии <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , численность колоний 7 ¹⁰ ² 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 ¹⁰ ⁴ КОЕ/г	бактерии <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , численность колоний 8 ¹⁰ ² КОЕ/г
	Легкосуглинистая почва	
Контроль	<i>E. coli</i> *, плесневые грибы рода <i>Aspergillus spp.</i> *, <i>Bacillus cereus</i> , 3,2 ¹⁰ ³ КОЕ/г	бактерии <i>Bacillus cereus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , численность колоний 3,2 ¹⁰ ² КОЕ/г
	Торфонавозная 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 ¹⁰ ⁷ КОЕ/г	бактерии <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. altitudinis</i> , численность колоний 5,8 ¹⁰ ² 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.

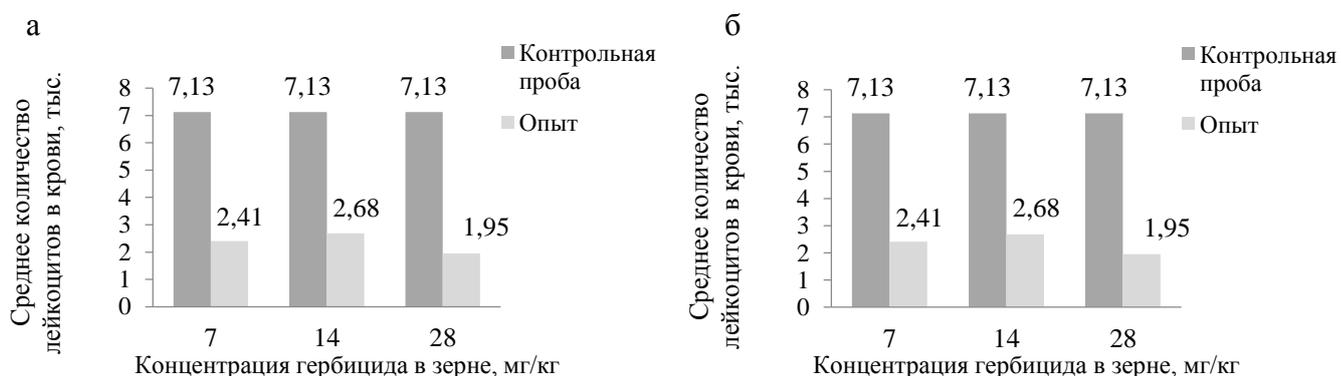


Рис. 2. Количество лейкоцитов в крови лабораторных мышей, питавшихся в эксперименте зерном овса, обработанным глифосатом в разной концентрации, в течение: а – 4 месяцев; б – 6 месяцев.

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.

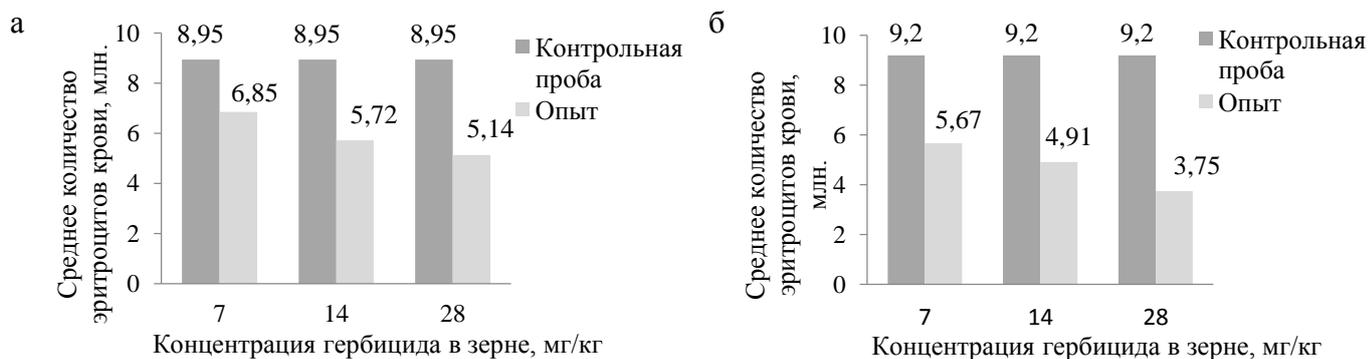


Рис. 3. Количество эритроцитов в крови лабораторных мышей, питавшихся в эксперименте зерном овса, обработанным глифосатом в разной концентрации, в течение: а – 4 месяцев; б – 6 месяцев.

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.

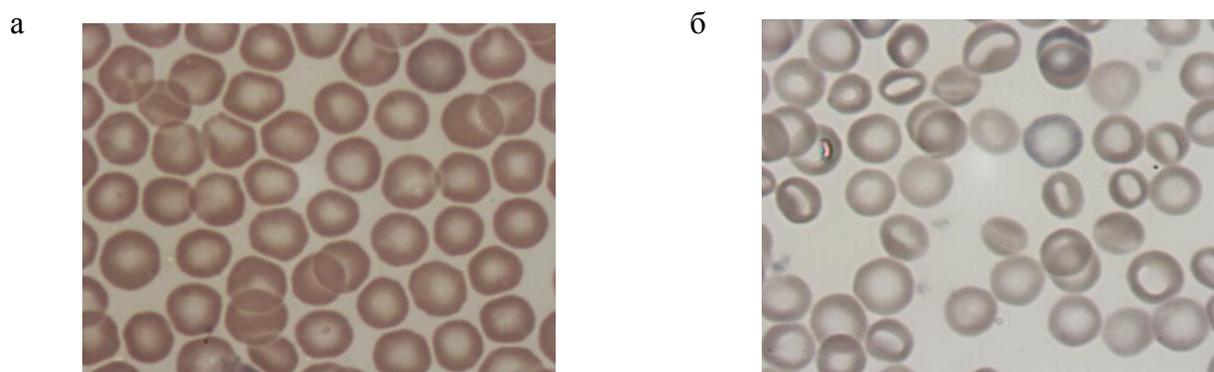


Рис. 4. Эритроциты в крови лабораторных мышей, питавшихся в эксперименте зерном овса, период кормления 4 месяца: а – контрольные животные; б – концентрация гербицида в зерне 28 мг/кг.

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 *Styloynchia 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 *Styloynchia 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 *Styloynchia 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 технический 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.