

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Тверской государственный технический университет»

На правах рукописи

Шувалова Наталья Евгеньевна

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

03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
к.б.н., доцент Прутенская Е.А.

Тверь - 2021

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

2,4-Д – дихлорфеноксисукусная кислота

EPSP-синтазы - 5-еноилпирувоил-шикимат-3-фосфат синтетаза

АМФК - аминометилфосфоновая кислота

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

СО – стандартный образец

СОП - стандартный образец предприятия

ФОС – фосфорорганические соединения

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Практическое применение гербицидов	11
1.2 Гербицид неселективного действия - глифосат	12
1.2.1 Основные свойства гербицида, механизм действия	12
1.2.2 Глифосат в окружающей среде	13
1.2.3 Пути трансформации гербицидов	14
1.2.4 Деструкция глифосата микроорганизмами	15
1.2.5 Остаточные количества глифосата в пищевой продукции и кормах	19
1.3 Синтетический гербицид - 2,4-Д	20
1.3.1 Основные свойства гербицида, механизм действия	20
1.3.2 Трансформация 2,4-Д в растениях	22
1.3.3 Биоразложение гербицида микроорганизмами	23
1.4 Применение клопиралида и его основные свойства	26
1.4.1 Основные свойства гербицида, механизм действия	26
1.4.2 Пути деградации клопиралида	27
1.5 Влияние гербицидов на биологическую активность почвы	28
1.6 Методы определения остатков гербицидов в объектах окружающей среды	29
1.6.1 Химические методы анализа гербицидов	29
1.6.2 Биотестирование гербицидов	30
1.6.2.1 Обитатели водных объектов – как тест-организмы	31
1.6.2.2 Почвообитающие организмы в биотестировании гербицидов	34
1.6.2.3 Использование <i>Daphnia magna</i> в биотестировании	36
1.6.2.4 Биотестирование с использованием растений	38
1.6.2.5 Влияние гербицидов на млекопитающих	43
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ПЕРВОЙ ГЛАВЕ	47
2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	48

2.1 Объекты исследования	48
2.2 Материальная часть	48
2.3 Методы исследования	50
2.3.1 Культивирование стилонихий	50
2.3.2 Проведение биотестирования со стилонихиями	50
2.3.3 Подготовка почвы для биотестирования	51
2.3.3.1 Заражение почвы гербицидом	51
2.3.3.2 Приготовление водной вытяжки	51
2.3.4 Определение концентрации глифосата методом ВЭЖХ	51
2.3.5 Компостирование торфонавозной смеси и почвы	52
2.3.6 Микробиологическое исследование почвы, торфонавозной смеси	54
2.3.7 Подготовка зерна овса, зараженного стандартным образцом глифосата	54
2.3.8 Определение хронической токсичности на лабораторных животных	55
2.3.8.1 Биотестирование гербицидов на мышах	55
2.3.8.2 Приготовление цитологических препаратов крови	56
2.3.8.3 Приготовление гистологических препаратов	57
2.3.9 Формулы расчета	57
2.3.9.1 Расчет изменения количества стилонихий	57
2.3.9.2 Изменение количества лейкоцитов, эритроцитов	58
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	59
3.1 Обоснование концентрации гербицидов в модельных образцах	59
3.2 Определение оптимальных условий растворения гербицидов	61
3.3 Применение инфузорий при биотестировании на клеточном уровне	62
3.4 Определение оптимального числа клеток простейших при биотестировании	65
3.5 Биотестирование глифосата	68
3.6 Определение токсичности 2,4-Д	69

3.7 Оценка токсичности клопиралида	70
3.8 Сравнительная оценка токсичности гербицидов	72
3.9 Влияние гербицидов на размер и форму клеток стилонихий	73
3.10 Биотестирование почвы	75
3.10.1 Обоснование выбора гербицида для биотестирования почвы	75
3.10.2 Биотестирование почвы различного гранулометрического состава	76
3.10.3 Алгоритмы подготовки проб водных вытяжек почв и биотестирование на инфузориях	79
3.10.4 Определение концентрации глифосата в водных вытяжках методом ВЭЖХ	80
3.11 Изучение влияния глифосата на микробное сообщество почвы и торфонавозной смеси	83
3.12 Лабораторная мышь как тест-объект при биотестировании на организменном уровне	86
3.13 Изучение влияния остаточных количеств глифосата на лабораторных животных	87
3.13.1 Изучение влияние гербицида на репродуктивную систему мышей	88
3.13.2 Изучение влияния гербицида на органы мышей	90
3.13.3 Изучение гематоксичности глифосата	97
3.13.4 Гистологические исследования печени экспериментальных животных	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	113

ВВЕДЕНИЕ

Средства химической защиты растений являются доминирующим направлением в сельском хозяйстве для повышения урожайности культурных растений. Наибольшую опасность представляет использование гербицидов в качестве десиканта в предуборочный период. Как результат, остаточные количества гербицидов обнаруживаются в сельскохозяйственных культурах, в объектах окружающей среды, тканях животных и биоматериале человека. С целью оценки токсического воздействия загрязняющих веществ применяют биотестирование. Преимущество биологических систем заключается в способности быстро дать представление об опасности химических веществ для организма и окружающей среды.

Интерес к биотестированию способствовал изучению новых тест систем на клеточном и организменном уровне и их тест-функций. Ответные реакции тест-объектов включают интегральные параметры: изменение морфологических показателей, выживаемость, рост, воспроизводство потомства и др. Одним из основных требований к тестируемым объектам является возможность получения культур из генетически однородных организмов, кроме того они должны быть распространены в окружающей среде и иметь значение для развития экосистемы, чувствительны к начальным экологическим изменениям, безвредны, экономичны.

С целью определения экологического состояния почвы при биотестировании в качестве тест-объектов используют дождевых червей. Черви обладают ответной реакцией на различные химические вещества, попадающие в почву в результате деятельности человека. Биотестирование основано на контактном и кишечном воздействии веществ на организм животного.

Рачки дафний *D. magna*, рыбы, инфузории являются акватории, поэтому получили широкое применение в биотестировании водных объектов. Воздействие различных веществ определяется изменением морфологических параметров тест-объекта, выживаемости и способности воспроизвести

потомства.

Млекопитающих получили широкое применение в биотестировании продуктов питания, лекарственных препаратов, кормов и кормовых добавок. Данный тест-объект дает возможность определять действие химических веществ на отдельные органы, организм в целом, наблюдать за несколькими поколениями животных при постановке эксперимента, а также изучать терапевтическую эффективность многих лекарственных препаратов и вакцин.

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

В соответствии с поставленной целью были определены 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, глифосата).
- 3) Определить чувствительность культуры *Styloynchia mytilus* к гербицидам на примере клопиралида, 2,4-Д, глифосата.
- 4) На основе полученных данных оценить возможность использования культуры *Styloynchia mytilus* как тест-объекта для контроля безопасности водной и почвенной среды. Провести биотестирование почвы различного гранулометрического состава с помощью *Styloynchia 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 *Styloynchia mytilus* используется при проведении лабораторных занятий по дисциплине «Химическая и биологическая безопасность пищевых продуктов питания» специальности 19.03.01 «Биотехнология».

На защиту выносятся:

1) *Styloynchia 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 *Styloynchia 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, , 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.

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 работы, в том числе 146 отечественных и 40 зарубежных авторов.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Практическое применение гербицидов

В настоящее время применение гербицидов является неотъемлемой практикой в сельском хозяйстве [1 - 4]. Естественные причины, изменение сообщества сорных растений на возделываемых землях в результате применения пестицидов, и выращивание трансгенных культурных растений, все это приводит к увеличению количества используемых гербицидов, их широкому ассортименту и поиску новых классов химических веществ [2, 5 - 8]. В случае культивирования генетически устойчивых сельскохозяйственных культур, применение гербицидов возможно на протяжении всего периода роста культурного растения, а также в предуборочный период [5, 9].

Гербициды могут применяться двумя способами, путем опрыскивания вегетирующих растений или непосредственно почву. В первом случае до 30% гербицида попадает на вегетативную часть растения, все остальное проникает в почву. Во втором случае химическое вещество полностью поступает в почву [10]. В результате многократного применения пестицидов происходит их накопление в почве. Дальнейшее преобразование гербицидов в окружающей среде зависит от многих факторов: сорбционной способности почвы, влажности, температуры почвы, сообщества почвенных бактерий, способности гербицида к фото- и химическому разложению, биodeградации и т.п. Некоторые гербициды адсорбируются необратимо на частицах почвы, другие не способны образовывать стабильных комплексов, вследствие чего мигрируют по слоям почвы, и попадают в поверхностные и грунтовые воды [11]. В результате, остаточные количества гербицидов обнаруживают в объектах окружающей среды, кормах, продуктах питания, в тканях животных и биоматериале людей (моче, грудном молоке) [5]. Из-за не соблюдения норм применения гербицидов в России, считается, что ежегодно умирает 14 000 человек, а в 700 000 случаев пестициды являются причиной заболеваний [12].

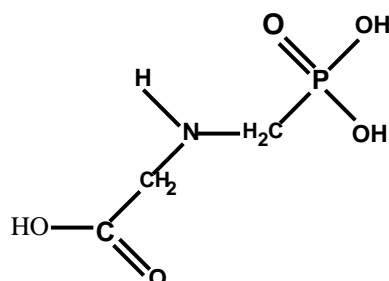
Загрязнение гербицидами окружающей среды является экологической проблемой не только в России, но и во всем мире [5].

Препараты гербицидов на территории Российской Федерации представлены в виде более 400 наименований, которые включают 21 действующее вещество [13]. Наиболее востребованными гербицидами являются производные фосфоновой кислоты (глифосаты) и производные хлорфеноксипропионовой кислоты (2,4-Д). Глифосаты занимают 1/3 мирового объема применения в сравнении с другими гербицидами.

1.2 Гербицид неселективного действия - глифосат

1.2.1 Основные свойства гербицида, механизм действия

Глифосат является наиболее перспективным гербицидом. Выведение генетически модифицированных культур, устойчивых к глифосату, способствовало многократному увеличению его применения в сельском хозяйстве [5, 14, 15]. Глифосат системный (неселективный) гербицид широкого спектра действия. Химическое наименование глифосата-N-(фосфометил) глицин ($C_3H_8NO_5P$):



Основное действие глифосата – блокировка ферментов растений, участвующих в биосинтезе аминокислот и белков [16]. Например, глифосат ингибирует EPSP-синтазы (5-еноилпирувоил-шикимат-3-фосфат синтетаза), блокирует синтез хоризмата, который является предшественником в синтезе ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофан) в растениях, это приводит к дефициту белков, жизненно необходимых для роста и развития растений [5, 10, 17 - 21].

Содержание гербицида в коммерческих препаратах колеблется от 360 до 500 г/л глифосата кислоты. Он представлен следующими наименованиями коммерческих препаратов: Торнадо, Тайфун, Истребитель, Рап, Раундап, Глифоган, Глифор и др. [22]. Для увеличения проникновения глифосата внутрь клетки растения, за счет изменения проницаемости мембраны, его применяют совместно с поверхностно-активными веществами [5, 15, 23]. К наиболее эффективным и часто используемым вспомогательным веществам, добавляемым к препаратам глифосата, относят полиоксиэтиленалкиламин, пропиленгликоль, глицерин, бензойная и сорбиновая кислоты, парафин на основе нефтяных масел и др. [5].

1.2.2 Глифосат в окружающей среде

Глифосатсодержащие препараты широко применяются, как регуляторы сорной травы в виноградниках, оливковых рощах, фруктовых садах, при облагораживании городских и промышленных территориях [23, 24], для уничтожения культур, которые используются для изготовления наркотиков, произрастающие в Колумбии, применяется в карантинных мероприятиях перед ввозом в Австралию и Новую Зеландию продукции растительного происхождения, в предуборочный период. Гербициды вносят в водоемы для уничтожения растительности и устранения «цветения» воды [5]. Сельскохозяйственные культуры, обработанные глифосатсодержащими препаратами, используют без ограничения при производстве продуктов питания, кормов для животных.

Пестициды смываются дождями в канавы, реки и ручьи, попадают в поверхностные и грунтовые воды, которые используются, как главный источник запаса питьевой воды [24]. Европейские Информационные Центры опубликовали результаты мониторинга поверхностных вод в период с 1993-2009 год на предмет исследования остаточного количества глифосата. Глифосат может распространяться на большие расстояния (до нескольких километров) от

места применения [25, 26]. Было исследовано более 50 000 образцов поверхностных вод, глифосат был найден в 29% из этих образцов. Остатки продукта разложения глифосата в виде аминотетилфосфоновой кислоты (АМФК) были обнаружены в 50% проб. Превышение предельно допустимой концентрации глифосата для питьевой воды (0,1 мкг/л) было обнаружено у 270 образцов (0,7%) [24].

В статье [27] представлены данные об уровнях остатков глифосата в объектах окружающей среды (природных и поверхностных водах, почве, частях растений). Было обнаружено, что остаточные количества гербицида в природных водах достигает 1,7 мг/л. В тоже время, предельно допустимая концентрация глифосата для воды в водоемах составляет 0,02 мг/л [28].

1.2.3 Пути трансформации гербицидов

Разложение гербицидов в естественных условиях протекают по нескольким направлениям: фоторазложение, химический гидролиз, биологическое разложение. Направления трансформации гербицидов представлены на рисунке 1.1.

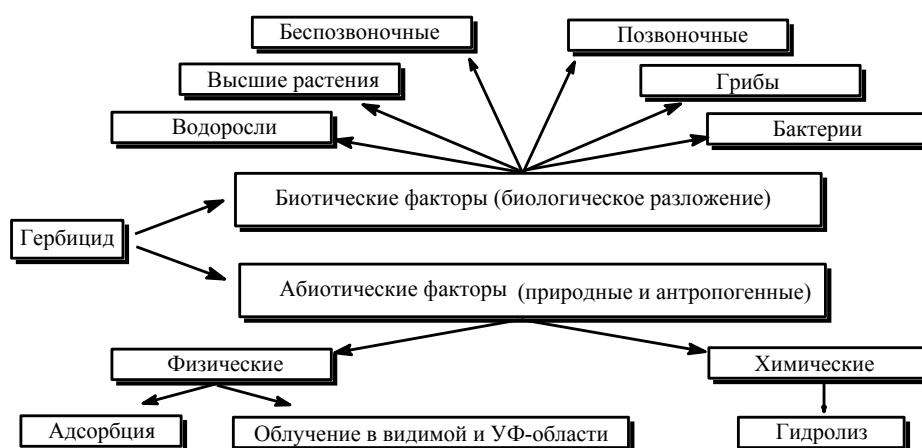


Рисунок 1.1 - Факторы, влияющие на разложение гербицидов

В почвах основной путь деградации химических веществ - микробиологическое разложение. Микробная деградация в значительной степени зависит от температуры, влажности и рН почвы. При высокой

кислотности почвы микробная деградация ингибируется, что позволяет некоторым гербицидам сохранять свою молекулярную структуру [29, 30]. Низкая температура и влажность почвы, также затрудняет процесс микробиологического разложения.

Большинство гербицидов растворимы в воде, что способствует их связыванию с частицами почвы при определенных условиях, особенно в глинистых. Они взаимодействуют с катионами поливалентных металлов, образуя комплексы, либо с разнородной поверхностью твердой фазы почвы в результате молекулярной сорбции. Сорбционные процессы протекают интенсивнее с увеличением органических веществ в почве. Гербициды могут вымываться водой из песчаных почв или годами находиться в почвах с высоким содержанием глины [31].

В лабораторных условиях, под воздействием ультрафиолетового излучения, гербициды способны разрушаться, но в тоже время в естественных условиях фоторазложение может не наблюдаться. Это связано с отсутствием достаточного уровня ультрафиолетового излучения от солнца в полевых условиях.

1.2.4 Деструкция глифосата микроорганизмами

Интенсивное использование глифосата способствует повышению интереса к изучению поведения гербицида в окружающей среде. Он устойчив к фото- и химической деградации [27], главный путь деградации глифосата – микробиологическое разложение [17, 27].

Для изучения механизма деградации глифосата используются микроорганизмы-деструкторы, выделенные из почвы загрязненной гербицидами, или активного ила. Например, в работе М.Г. Жариков [32] описывает выделение штаммов бактерий, способных разлагать глифосат, из загрязненной почвы гербицидом. Для выделения микроорганизмов осуществляли экстракцию из почвы и последующее культивирование в жидкой

среде с добавлением глифосата в качестве источника углерода и фосфора. В результате исследования выявлены и идентифицированы два вида микроорганизмов, относящиеся к семействам *Corinobacterium* (штамм Z-1) и *Micrococcus* (Z-2). Другими учеными выделены и идентифицированы микроорганизмы из активного ила очистных сооружений *Chryseomonas luteola*, *Aeromonas salmonicida subsp. achromogenes*, способных ассимилировать алкильный радикал (-CH₃) изопропилового эфира метилфосфоновой кислоты [33].

В научных работах [5, 34 - 37] представлены несколько основных путей микробиологического разложения пестицида. Первый путь деградации протекает с расщеплением связи С-Р. Называют С-Р лиазный путь. Первичными продуктами разложения являются саркозин и неорганический фосфор P_i. Лиазный механизм расщепления глифосата недостаточно изучен и охарактеризован. В окружающей среде описанный механизм метаболизма возможен при дефиците внеклеточного неорганического фосфора, что не характерно для природных экосистем [34]. Механизм процесса представлен на рисунке 1.2.

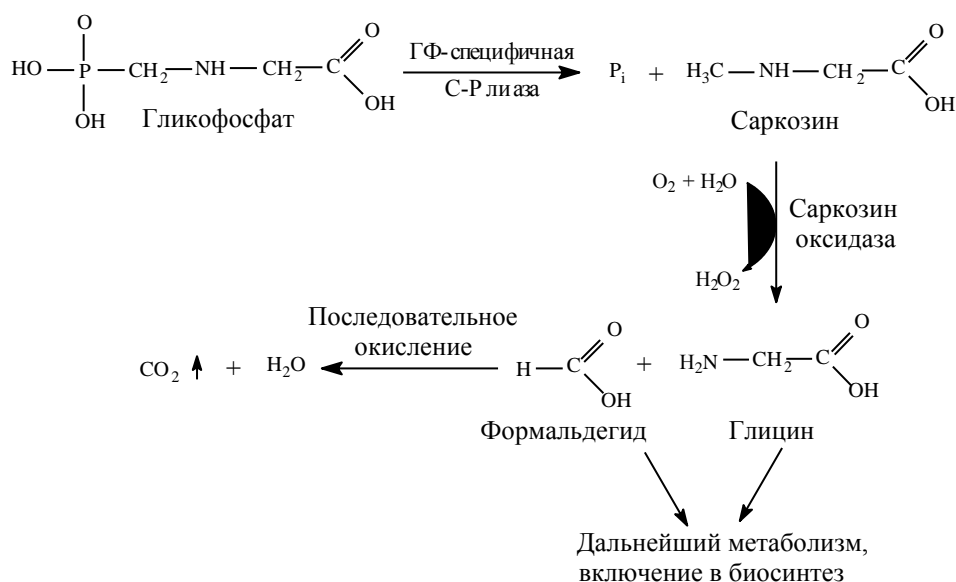


Рисунок 1.2 - Механизм трансформации с образованием саркозина и неорганического фосфора P_i

В данном процессе разрушения гербицида участвуют бактерии, которые используют глифосат в качестве источника фосфора, к ним относятся *Escherichia coli*, *Arthrobacter* sp. GLP-1, *Achromobacter* sp. MPS 12A, *Pseudomonas* sp. 4ASW, *Pseudomonas* sp. GLC11, *Pseudomonas* sp. PG2982, *Streptomyces* sp. StC [34].

Второй путь биodeградации является наиболее распространенным, и протекает с образованием глиоксилата и аминометилфосфоновой кислоты. Механизм деградации гербицида связан с расщеплением C-N связи, представлен на рисунке 1.3. К микроорганизмам-деструкторам, находящимся в окружающей среде (почве, активном или очистных сооружениях), относятся *Achromobacter* sp. LW9, *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752, *Flavobacterium* sp. GD1, *Ochrobactrum anthropic* GDOS, *Ochrobactrum anthropic* GPK 3, *Ochrobactrum anthropic* LBAA, *Ochrobactrum anthropic* S5, *Pseudomonas* sp. LBr, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* и др.

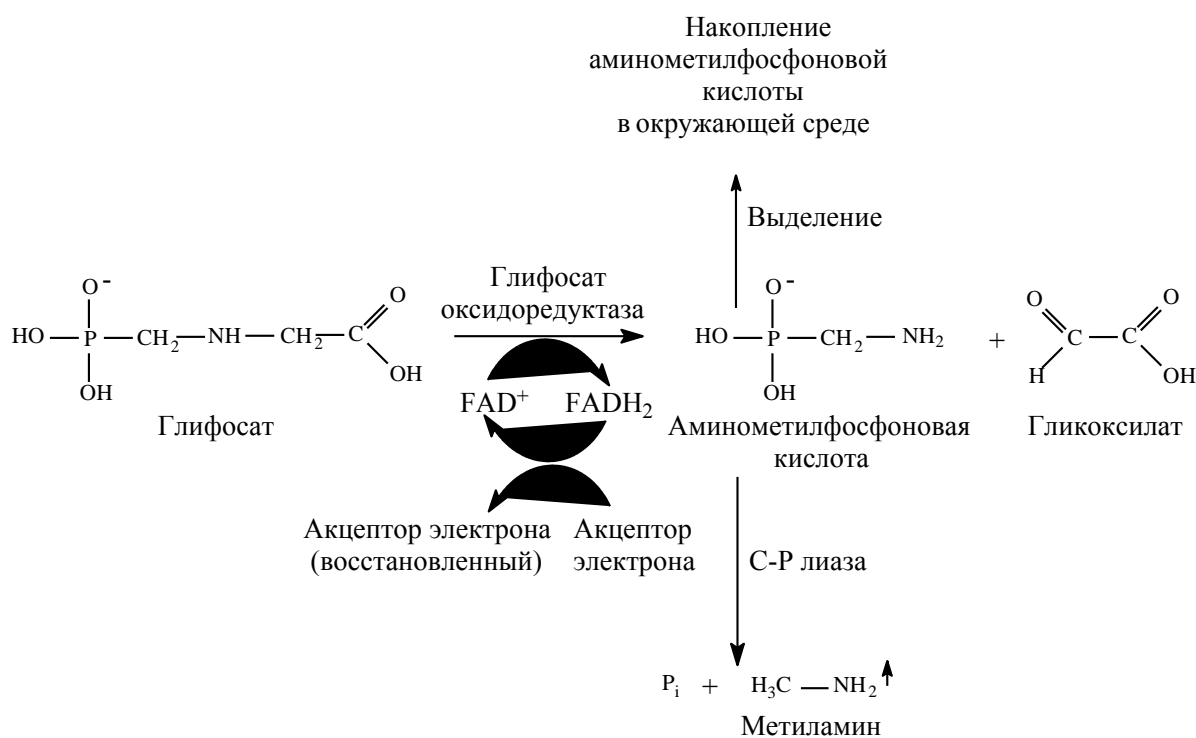


Рисунок 1.3 - Биodeградация глифосата с образованием аминометилфосфоновой кислоты и глиоксилата, характерная для большинства бактерий-деструкторов

В статье [38] показана способность адаптации актиномицетов к токсичности метилфосфоновой кислоты, и возможность мицелиальных прокариот использовать в качестве микроорганизмов-деструкторов.

Изучен новый путь разложения глифосата с помощью бактерий *Ochrobactrum anthropic* GPK 3 [34]. Данный путь деградации представлен на рисунке 1.4.

В работе [39] изучено в модельном опыте влияние бактерий родов *Pseudomonas* и *Proteus* на расщепление глифосата. Показана взаимосвязь между глифосатом при различных концентрациях и количеством колониеобразующих бактерий в жидкой среде, а также способность бактерий инактивировать гербицид.

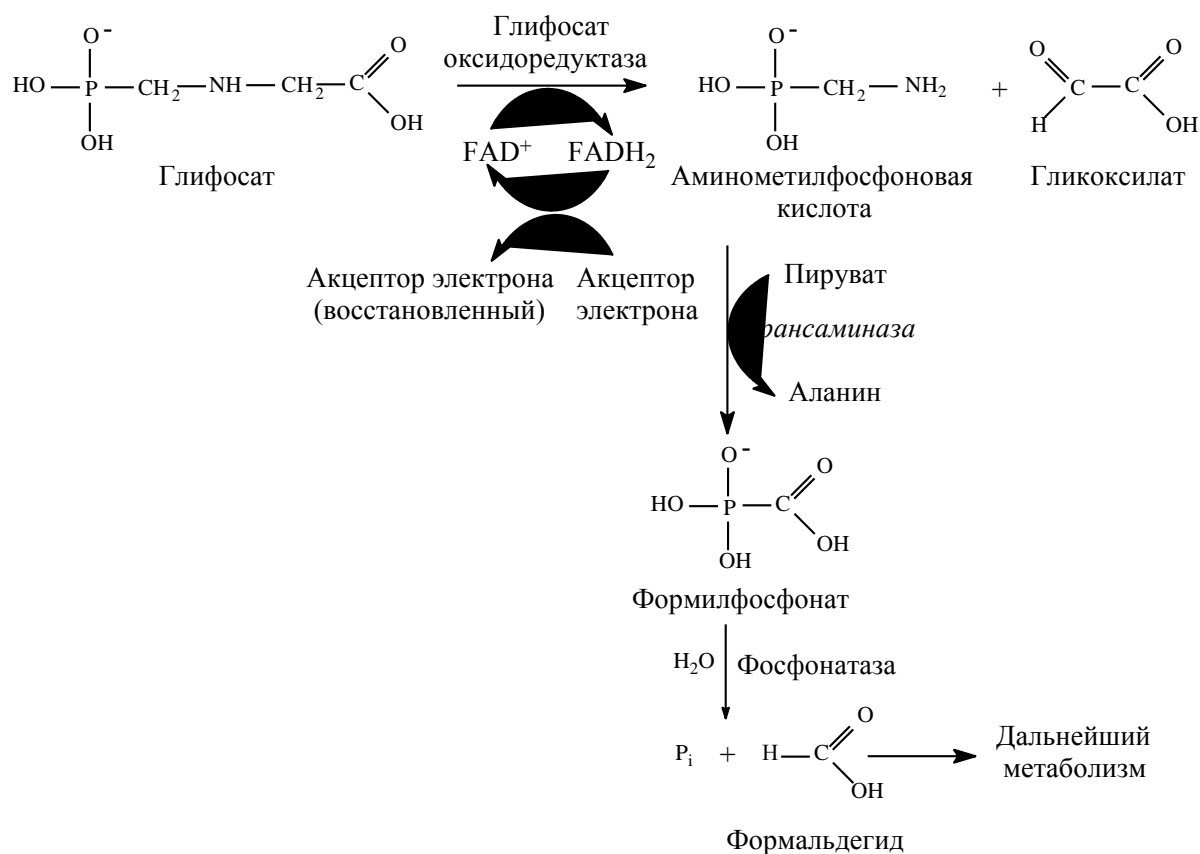


Рисунок 1.4 - Метаболизм глифосата бактериями *Ochrobactrum anthropic* GPK 3

Естественный процесс биodeградации в природных условиях в основном протекает по пути образования основного метаболита, которым является АМФК [25, 27, 34, 40]. Скорость разрушения гербицида зависит от микробного сообщества, сорбционной способности почвы [27], кислотности и температуры почвы [32]. Кроме того, деградация глифосата в воде протекает медленнее, чем в почве.

1.2.5 Остаточные количества глифосата в пищевой продукции и кормах

Вследствие того, что гербицид в почве находится в связанном состоянии, основной путь проникновения является клеточная мембрана листьев. Поверхностно-активные вещества и вода, входящие в состав рецептуры коммерческих препаратов, увеличивают скорость диффузии глифосата вовнутрь растения. Основным продуктом метаболизма в растениях, чувствительных к гербициду, и генетически модифицированных является также аминотетрагидропиримидиновая кислота. В дальнейшем она может неселективно связываться с аминокислотами и белками, образуя малоподвижные комплексы. В тоже время, количество метаболитов глифосата зависит от скорости распределения его в растениях и длительности образования аминотетрагидропиримидиновой кислоты. Глифосат, находясь в связанном состоянии с коллоидными частицами почвы, проявляет иммобильность по отношению к растениям, проникновение через корневую систему составляет менее 1% [34].

Глифосат обнаружен в зерне хлебных злаков и бобах в количестве от 0,2 до 4,8 мг/кг, в муке пшеницы 0,16 мг/кг, в пиве на уровне 0,05 мг/кг или ниже. Гербицид не разрушается при производстве хлеба, пива, и основное снижение остаточного количества гербицида происходит за счет технологического разбавления. Обнаружены остаточные количества глифосата и АМФК в соевых бобах в количестве от 0,27-17 мг/кг [41]. Также, гербицид обнаружен и в тканях животных в диапазоне от 0,05 до 1,6 мг/кг [21, 40]. В таблице 1.1 приведены

данные с максимальным количеством остатков глифосата, АМФК в различных сельскохозяйственных культурах [40].

Таблица 1.1 - Максимальное количество остатков глифосата (АМФК) в сельскохозяйственных культурах, мг/кг

	Великобритания	Украина	Канада	США
Пшеница (солома)	47,0	2,0	-	-
Ячмень (солома)	-	27,1	-	-
Кукуруза (стебли)	-	0,26	-	-
Рапс (солома)	30,0	17,9	-	-
Лен (солома)	-	4,4	-	-
Овес (солома)	64,0	-	33,0	-
Овес (зерно)	14,0	-	4,6	-
Сорго (солома и фураж)	-	-	-	33,0
Сорго (зерно)	-	-	-	13,0
Люцерна	-	-	78,0	154,0

Кроме того, согласно гигиеническим нормативам [28] глифосат в различных сельскохозяйственных культурах имеет максимально допустимый уровень от 0,1 до 20 мг/кг.

Вопрос о воздействии глифосатсодержащих пестицидов при малых концентрациях на объекты окружающей среды, в том числе на человека остается малоизученным. В связи с этим, представляет интерес изучение воздействия остаточного количества гербицида на млекопитающих.

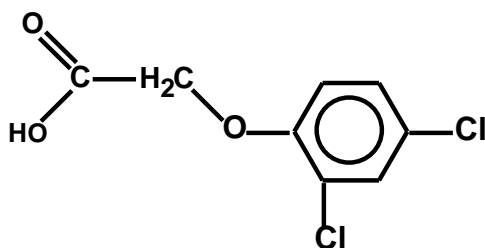
2,4-Д занимает второе лидирующее место по объему производства в мире.

1.3 Синтетический гербицид - 2,4-Д

1.3.1 Основные свойства гербицида, механизм действия

Простой технологический процесс, доступность и дешевизна исходного сырья, стали причинами масштабного производства и длительного применения гербицидных препаратов на основе производных 2,4-Д. Производство

коммерческих препаратов с действующим веществом 2,4-Д в настоящее время не регулируются патентами, поэтому объем производства достаточно высок, и представлен на рынке широким спектром торговых марок, в том числе комбинированными препаратами [6]. 2,4-Д относят к гормоноподобным веществам растений, которые проявляют рострегулирующие свойства. Химическое название 2,4-Д - дихлорфеноксиуксусная кислота с молекулярной формулой $C_8H_6Cl_2O_3$:



Принцип действия гербицида – ингибирование синтеза нуклеиновых кислот и процессов окислительного фосфорилирования, что ведет к повреждению репродуктивных органов, отмиранию ростовых (апикальных) центров растения и деформированию листьев [42].

Содержание гербицида в препаратах составляет от 600 г/л. 2,4-Д кислота представлена торговыми марками Дикопур Ф, Аминка, Эстет, 2,4-Дактив, Элант, Зерномакс, Октиген, Метис, Дуплет Гранд, Аврорек и др. [22].

2,4-Д широко применяется в сельскохозяйственной практике для выращивания зерновых культур (пшеница, ячмень, овес, кукуруза, рис, гречиха). Гербицид обладает селективным действием, вызывая гибель широколиственных растений. Зерновые культуры проявляют к нему устойчивость. Избирательная деятельность гербицида обусловлена самой культурой. Благодаря особенному анатомическому строению листовой пластины (вертикальное расположение, меньшее опушение, большее содержание восков), гербицид проявляет слабые сорбционные способности, не удерживаясь на поверхности листа. Кроме того, злаковые культуры способны

задерживать движение гербицида внутри листа по средством абсорбции на определённых субстратах, образовании комплексов с белками. 2,4-Д является послевсходовым гербицидом, и применяют в период полного кущения злаковых культур [42].

1.3.2 Трансформация 2,4-Д в растениях

После обработки гербицидом, время его проникновения в листья растения достигает нескольких часов. Для увеличения скорости диффузии действующего вещества в рецептуру коммерческих препаратов гербицида входят поверхностно-активные вещества.

Основное поступление 2,4-Д в клетку осуществляется при помощи полярного транспорта, за который отвечают белки-переносчики, локализованные на поверхности плазматической мембраны. В незначительной степени гербицид распространяется по флоэмной системе [43]. Ауксин, достигая апикальные точки растений, накапливается в больших количествах в зонах активного роста, нарушает процесс синтеза ферментов [42]. В первое время после обработки основная часть гербицида накапливается в вегетативной части растения, в корнях содержится порядка 10%. Поэтому основная деградация гербицида происходит в наземной части растения в процессе вегетации [44].

Попадая в растение 2,4-Д достаточно быстро претерпевает трансформацию, с потерей гербицидных свойств. Установлено несколько путей процесса трансформации гербицида, но во всех из них первый этап декарбоксилирование 2,4-Д. Пути окислительного декарбоксилирования представлены на рисунке 1.5.

Декарбоксилирование протекает с образованием углекислого газа и дихлорфенола. Дихлорфенол в дальнейшем претерпевает превращения с разрушением бензольного кольца. Кроме того, потере гербицидных свойств

способствуют такие процессы, как этерификация, комплексообразование с белками, конъюгация с аминокислотами.

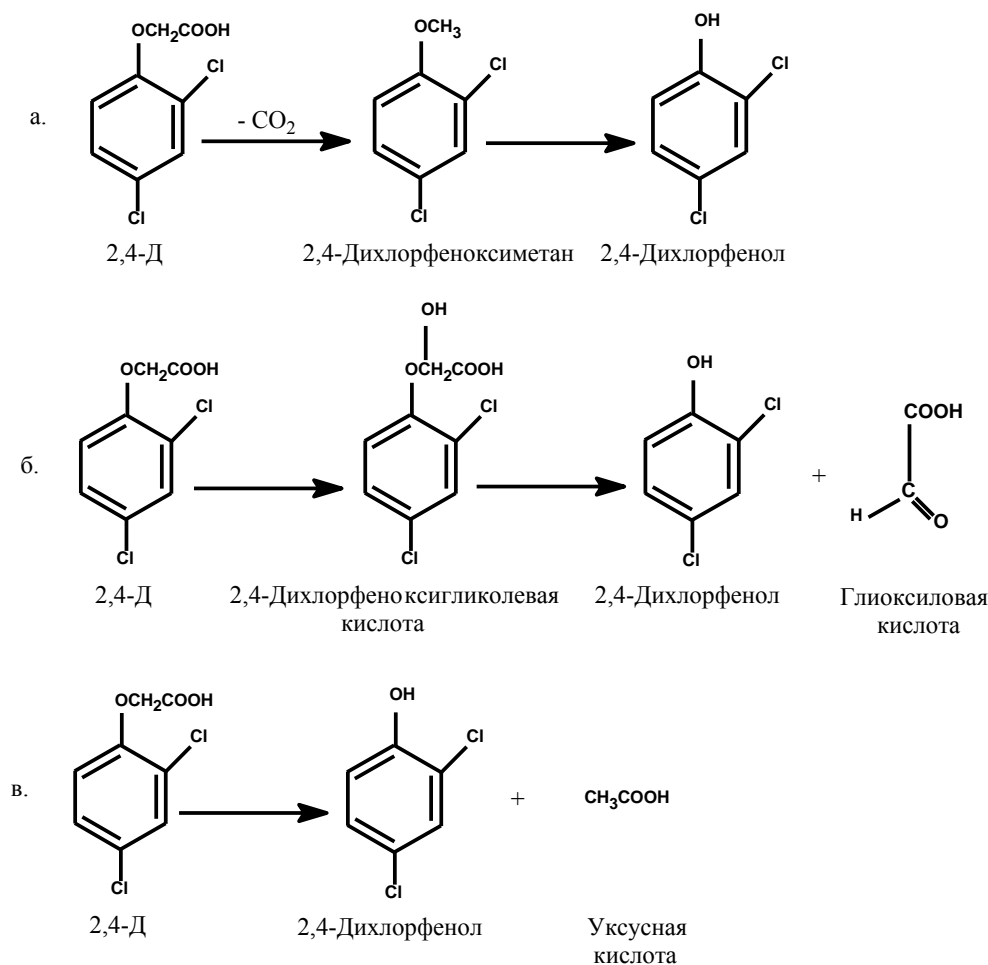


Рисунок 1.5 - Пути окислительного декарбоксилирования 2,4-Д в растениях

1.3.3 Биоразложение гербицида микроорганизмами

Основной путь разложения 2,4-Д - деградация микроорганизмами, который зависит от pH среды, температуры, влажности. Разложение гербицида микроорганизмами возможно при pH выше 7, в кислой среде микробный метаболизм ингибируется. Период деградации 2,4-Д зависит от численности микроорганизмов и количества гербицида, период процесса распада уменьшается при повторном и последующем применении гербицида.

В статьях [45, 46] приведены следующие микроорганизмы, использующие 2,4-дихлорфенол в качестве единственного источника углерода и энергии: *Achromobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Bacillus insolitus*, *Pseudomonas* sp.,

Rhodococcus erythropolis, *Burkholderia cepacia*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Streptomyces viridosporus*, *Flavimonas oryzihabitans*, *Chryseomonas luteola*, *Aspergillus penicilloides* и др.

В статье Халимова Л.Х. [47] представлены исследования биodeградации фенола, хлорфенолов и 2,4-Д с помощью консорциума микроорганизмов-деструкторов *Bacillus* Д2, *Pseudomonas* Д22, *Rhodococcus* Ф93. Другими исследователями выделены штаммы бактерий рода *Bacillus* sp. и *Pseudomonas* sp. способные деструктировать 2,4-Д и гербициды ряда сульфонилмочевины [48, 49]. Изучен «гидрохинонный» путь деградации хлорфенолов с помощью бактерий *Arthrobacter ureafaciens* CPR706, на первом этапе, которого образуется, в качестве промежуточного соединения, гидрохинон [50].

Авторами статьи [51] проведены исследования биodeградации 2,4-Д при помощи микроорганизмов, выделенных из почвы, ранее контаминированной гербицидом. Из 25 выделенных штаммов для исследования отобраны 5 штаммов (*Acinetobacter* sp, *Serratiamarcescens*, *Stenothrophomonas maltophilia*, *Flavobacterium* sp and *Penicillium* sp.). Биodeградация гербицида составила от 0,25 до 30,20 %.

В статьях [52, 53] представлены результаты исследования механизма деградации 2,4-Д микроорганизмами *Flavobacterium* sp., *Escherichia coli*, *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Rhizobium* sp., *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Acinetobacter calcoaceticus*. Механизм деградации 2,4-Д микроорганизмами представлен на рисунке 1.6. Результатом почвенной биodeградации является янтарная кислота, которая в свою очередь включается в метаболизм бактериальной клеткой.

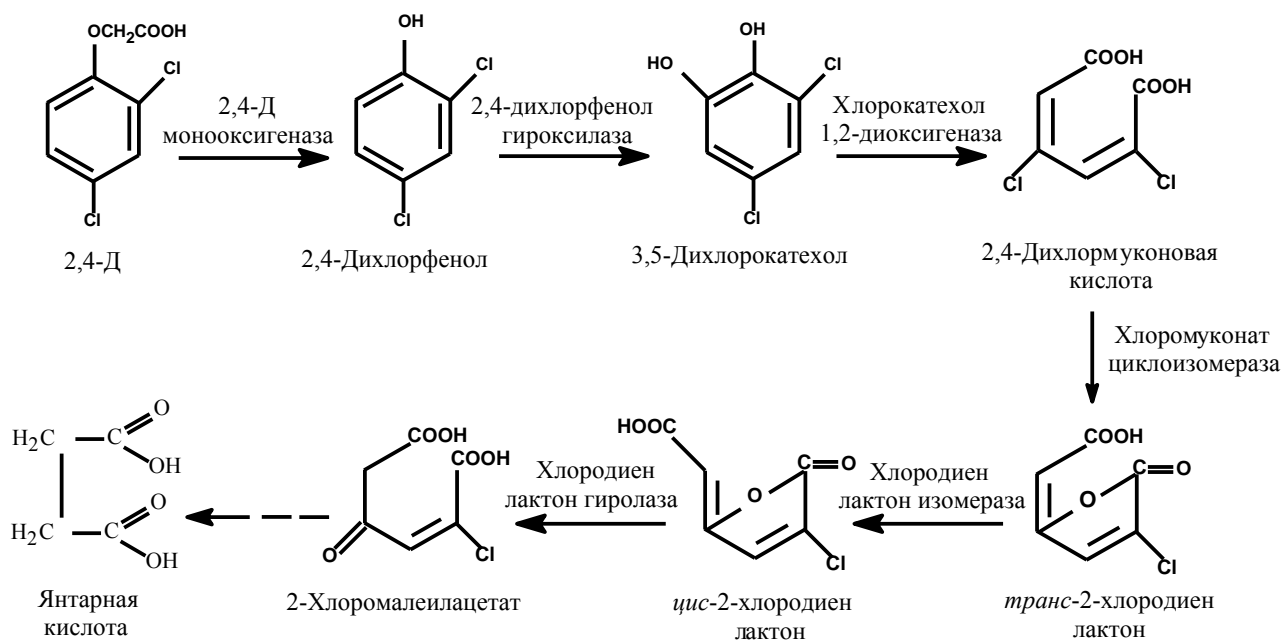


Рисунок 1.6 - Механизм деградации 2,4-Д микроорганизмами

Подобный путь биоразложения описан в работах [54 - 57]. Деградация 2,4-дихлорфенола протекает при помощи клеток *Bacillus cereus*. Процесс разрушения сопровождается гидрокселированием ароматического кольца, с дальнейшим дехлорированием и разрывом кольца. Продуктами биodeградации являются органические кислоты (пропановая, фталевая), которые не являются токсичными.

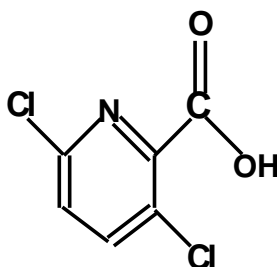
В окружающей среде необходимые условия для разрушения пестицидов часто отсутствуют, что ведет их накоплению в почве, природных водах [58]. При анализе земель сельскохозяйственного назначения в некоторых регионах Российской Федерации выявлены превышения ПДК 2,4-Д в 1,4 – 5,2 раза, местами в 7,6 раз. Превышение ПДК зафиксировано в местах захоронения и на территориях близи складирования пестицидов [59, 60].

Одним из немногих эффективных и доступных гербицидов, применяемых в борьбе с многолетними сорняками, является клопиралид.

1.4 Применение клопиралида и его основные свойства

1.4.1 Основные свойства гербицида, механизм действия

Клопиралид относится к производным пиколиновой кислоты. Карбоновые кислоты пиридина обладают свойствами фитогормонов, т.е. являются ауксинами [59]. Гормоноподобные гербициды инициируют увеличение растений в размерах, которое не успевает себя обеспечивать питательными веществами и погибает. Вторым механизмом действия ауксина связан с синтезом гормона-антагониста этилена, который угнетает рост побегов и корней. Химическое название клопиралида - 3,6-дихлорпиридин-2-карбоновая кислота с молекулярной формулой $C_6H_3Cl_2NO_2$:



Содержание гербицида в коммерческих препаратах от 300 г/л клопиралида, и представлен следующими торговыми марками: Лонтрел-300, Лорнет, Лоск, Лонтрел гранд, Корректор и др. [22].

Основное предназначение клопиралида борьба с однолетними и многолетними широколиственными сорными растениями семейств: астровые, бобовые, пасленовые, многоцветковые и применяется для обработки газонов, полей для гольфа, промышленных площадок, парков дорожных обочин. В связи с тем, что некоторые овощные культуры, такие как томаты, подсолнечник, горох, чечевица, салат-латук, перец, фасоль, виноград чувствительны к клопиралиду на достаточно низком уровне 10 мг/кг, в сельскохозяйственной практике данный гербицид применяют избирательно [59].

1.4.2 Пути деградации клопиралида

После опрыскивания клопиралид поступает в клетку растения, перемещается из клетки в клетку по средством полярного транспорта, частично по флоэме [43]. В работе [61] клопиралид описан, как неустойчивое соединение с периодом полураспада от 2 до 28 суток, данное свойство снижает вероятность его накопления в почве и природных водах. В то же время, основным путем деградации гербицидов является биodeградация бактериями, поэтому период полураспада зависит от влажности, температуры почвы, количества органического вещества. В теплом (25 °С) и влажном климате период полураспада может колебаться в зависимости от условия опыты, в среднем 28 дней, при увеличении температуры почвы (30 -35 °С) - 19 дней. При низких температурах (10 °С) средний период полураспада увеличивается до 64 дня. Однако заболоченная почва и анаэробные условия замедляют процесс деградации клопиралида, в этих условиях период полураспада составлял более 365 дней. Хорошая растворимость в воде способствует его проникновению в более глубокие слои почвы, что увеличивает период разложения гербицида [62].

Клопиралид не подвержен фото- или химической деградации, не адсорбируется на частицах почвы, что увеличивает вероятность загрязнения поверхностных и грунтовых вод [59]. Авторами работы [63 - 65] проведены исследования фотохимического окисления гербицида под действием УФ-облучения в лабораторных условиях. Доказано, клопиралид и его комплексы с металлами трудно разлагаются под действием УФ-облучения, основные продукты разложения хлорбензолы и хлорбутанолы. Продукты фотохимической деградации являются не менее токсичными соединениями, однако легко разрушающиеся микроорганизмами активного ила.

1.5 Влияние гербицидов на биологическую активность почвы

Плодородие почвы является ее основным свойством, которое дает возможность производства в сельском хозяйстве. Особая роль в процессе образования плодородного слоя принадлежит живым организмам, зеленым растениям и микроорганизмам. Основная роль микроорганизмов заключается в трансформации органических веществ, гумификации, образовании солей из минеральных и органических соединений. Микробное сообщество включает в себя бактерии, грибы, актиномицеты и водоросли, количество микроорганизмов в 1 г почвы колеблется от миллионов до миллиардов [31].

Гербициды являются реакционно активными веществами, попадая в почву, они могут влиять на ее параметры (кислотность, образование новых комплексов с гуминовыми веществами и др.), тем самым изменяя в первую очередь качественные и количественные характеристики микробного сообщества, функции почвенной экосистемы и здоровье растений. Глифосат может быть использован, как источник энергии и питательных веществ некоторыми почвенными бактериями, увеличивая их численность. В тоже время он может быть токсичным для других видов, сокращать их популяцию. Некоторые виды грибов, которые вызывают заболевания растений, обнаружены в увеличенном количестве в почвах обработанными глифосатом [5].

В работе [66] проведено исследование влияния фосфорорганических гербицидов на сапрофитную микрофлору. Многократное внесение гербицидов в почву приводит к изменению состава микроорганизмов. Основными микроорганизмами сообщества становятся низшие грибы рода *Aspergillus* и *Penicillium*, и увеличивается количество родококков, микрококков, анаэробных бактерий, снижается численность артробактера.

Присутствие фосфорорганических соединений в почве стимулирует спорообразование актиномицетов *Actinomyces*, что говорит о токсичном, неблагоприятном воздействии метилфосфоновой кислоты. Актиномицеты участвуют в трансформации органического вещества, формировании гумуса.

Уменьшение численность бактерий вегетативной формы указывает на снижение биологической активности почвы, так как уменьшается накопление гумусовых веществ [38].

Глифосат оказывает влияние на развитие фототрофных почвенных популяций, а именно на видовое разнообразие водорослей [67, 68]. Гербицид Раундап, по-разному воздействует на почвенные микроорганизмы в опытном исследовании [69]. Автор статьи это объясняет возможностью использования глифосата, определенным микробным сообществом, как питательный субстрат.

На изменение видового состава микробного сообщества и численности почвенных организмов влияет и уменьшение растительной биомассы, вследствие применения гербицидов [8].

1.6 Методы определения остатков гербицидов в объектах окружающей среды

1.6.1 Химические методы анализа гербицидов

Ежегодное применение гербицидов ведет к накоплению их в окружающей среде: в почве, воде, растительности. Для определения количественного содержания действующих веществ в гербицидных препаратах используют химические методы анализа. Эти методы являются высокочувствительными, точными, специфичными и позволяют определить динамику накопления и процессы метаболизма химических веществ в объектах окружающей среды, позволяют анализировать химическое разложение соединений во времени [70]. Для определения остаточных количеств гербицидов в объектах окружающей среды применяют методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [71 - 79], газожидкостной хроматографии [80, 81], газовой хроматографии [82, 83], капиллярного зонного электрофореза [84 - 86], тонкослойной хроматографии [87].

Наряду с достоинствами вышеуказанных методик к недостаткам относят: трудоёмкий процесс пробоподготовки, специальное дорогостоящее аналитическое оборудование и реактивы, оборудование для ВЭЖХ сложное в обслуживании и требует квалифицированного персонала. Химические методы анализа являются специфичными, при исследовании необходимо точно знать определяемое вещество. Данные исследования не показывают воздействия на окружающую среду, включая организмы, обитающие в ней. Выявленные химические вещества в объектах окружающей среды не позволяют судить об их токсичном воздействии на теплокровных животных и человека, кроме того для многих из них не установлены предельно допустимые концентрации.

1.6.2 Биотестирование гербицидов

Количество наименований токсичных примесей, например, только в природных и сточных водах достигают почти миллиона, в то время как нормированию подлежат около тысячи [88]. Восстановление экосистемы стали задачами экономической значимости. Для контроля воздействия загрязняющих веществ на состояние окружающей среды применяют биотестирование. Достоинство биологических тест-систем - возможность в короткие сроки дать представление об опасности загрязняющих веществ для организмов окружающей среды [89, 90]. Биотестирование используют специалисты разных областей науки в экологической токсикологии, ветеринарной медицине, сельском хозяйстве.

Биотестирование делят на два вида: *in vivo* – исследования проводятся на живых организмах (считаются более достоверными), и *in vitro* - «в пробирке», например, на культуре клеток. Биотестирование различают специфическое и неспецифическое. Первые применяют для идентификации загрязнителей, вторые для определения общей токсичности [91].

При биотестировании используются тест-объекты, полученные в лабораторных условиях и чувствительные к ксенобиотикам [91]. Развитие

биотестирования привело к изучению многих тест-организмов и их тест-функций, т.е. ответных реакций тест-организмов для определения токсичности исследуемой пробы [92]. Основными критериями токсичности в биотестировании являются интегральные параметры тест-объектов (выживаемость, плодовитость, рост и др.) [88, 92]. Ответная реакция тест-объектов к различным загрязняющим веществам неодинакова. Требования к тест-объектам: генетическая однородность, распространенность в окружающей среде и значимость для развития экосистемы, чувствительность к загрязняющим веществам; безвредность, возможность культивирования в лабораторных условиях, отсутствие мутагенных свойств, возможность микробиотестирования [91], чувствительность к начальным экологическим изменениям, простота, надежность и экономичность [92].

В качестве тест-объектов в биотестировании используют, млекопитающих, рыб и беспозвоночных животных, дождевых червей, растения, простейших.

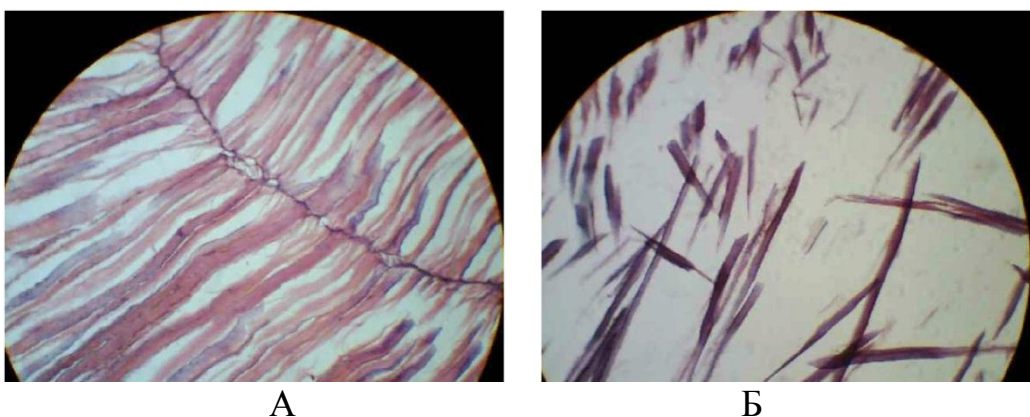
1.6.2.1 Обитатели водных объектов – как тест-организмы

Водные беспозвоночные животные являются естественными обитателями акваторий, широко распространены в водной среде, и играют важнейшую роль в биоценозе. Рыбы включены в трофические связи, и без них представить животный мир невозможно. В этой связи представители акваторий вызывают интерес в биотестировании с целью определения токсического воздействия гербицидов на биохимические процессы [24, 53].

Гербициды вызывают морфологические, иммунные, физиологические и биохимические изменения [93 - 96]. Эти изменения ослабляют иммунитет, увеличивая уязвимость к паразитам и патогенным микроорганизмам, вызывают нарушение строения ДНК, способствуют развитию мутагенности в геноме.

В работе [97] описано воздействие гербицидов метрибузина, глифосата и 2,4-Д на рыбу при концентрациях 2ПДК (0,2 мг/л; 0,04 мг/л; 0,008 мг/л соответственно). В качестве тест-объектов служили мальки, сеголетки и

двухлетки карпа. Критерии токсичности – морфологические изменения в организме рыбы. В результате интоксикации гербицидами в организме у рыб произошло количественное перераспределение синтеза фракций белков в сторону увеличения фракции водорастворимых белков. Водорастворимые белки (альбумины) участвуют в обмене веществ в органах рыбы и адаптации организма к стрессу. Автор показывает взаимосвязь между растворимостью в воде гербицидов и количеством альбуминов в крови. Глифосат, как наиболее растворимый гербицид, вызывал увеличение водорастворимых белков в крови на 25,4 %, а 2,4-Д, как менее растворимый, на 16,8%. Перераспределение общего количества белка в сторону водорастворимых повлекло за собой изменение в структуре мышечной ткани и внутренних органах. Воздействие глифосата и 2,4-Д способствовало уменьшению синтеза нерастворимых белков, что привело к деградации мышечной ткани, это выражалось в нарушении структуры мышечных волокон, их неупорядоченному расположению, отсутствием поперечно-полосатой исчерченности. Гистопрепараты мышечной ткани представлены на рисунке 1.7 [97].



А – контроль, Б – в результате воздействия Раундапа на 14 сутки опыта

Рисунок 1.7 - Скелетные мышцы двухлетки карпа

Гистологические препараты печени рыб указывают на белковую дистрофическую патологию (зернистая дистрофия) и некроз гепатоцитов.

Исследуемые гербициды способствовали изменению азотистого баланса и содержания неорганического фосфора в крови.

В клетках печени и митохондриях пресноводного карпа были выявлены изменения, даже после выдерживания в препарате Раундап при концентрациях в 20 и 40 раз ниже, чем предлагаемые для применения в сельскохозяйственной практике.

Глифосат воздействует на активность фермента ацетилхолинэстераза, который участвует в передаче сигнала между клетками нервной системы. В результате конкурентного ингибирования фермент теряет свою активность, нервные импульсы не выключаются, нарушаются биологические процессы в организме рыбы [24].

Авторами работы [95] изучено, и описано влияние Раундапа на активность пептидаз у бентофагов и ихтиофагов. Влияние гербицида исследовалось при концентрациях от 0,1 до 100 мкг/л. Наибольшее снижение активности пептидаз слизистой оболочки кишечника наблюдалось при максимальной концентрации Раундапа. У бентофагов плотвы, карася, карпа, густеры активность фермента упала на 38%, 37%, 22% и 52% соответственно по сравнению контролем. Снижение активности пептидаз наблюдалось также у ихтиофагов.

Влияние глифосата на активность гликозидаз в кишечнике различных рыб представлено в работах [98 - 100]. Исследуемые концентрации гербицида от 0,1 до 50 мкг/л, снижение ферментативной активности составляло от 11 до 18% в зависимости от вида рыбы.

В работе [101] проведен сравнительный анализ действия гербицидов на ранние стадии развития (онтогенеза) рыб и амфибий. По степени уменьшения тератогенности гербициды располагаются в следующем порядке Фуроре-Супер > Мерлин > Бетанал. Препарат Бетанал оказывал влияние на развитие головного мозга, вызывая внешние физиологические уродства (недоразвитие передней части головного отдела, недоразвитие головы). Гербицид Мерлин вызывал

водянку гидробионтов, наполняя брюшную полость жидкостью и изменяя внешний вид организмов. Тератогенность препарата Фуроре-супер выражалась в ингибировании формирования пигментного комплекса. Установлено нарушение развития кровеносной, пищеварительной и дефинитивных систем в период раннего постэмбрионального развития рыб при определении хронического воздействия гербицидов.

1.6.2.2 Почвообитающие организмы в биотестировании гербицидов

Гербициды являются реакционно активными веществами, и для определения воздействия на почвенные организмы в токсикологии широко применяется биотестирование с использованием в качестве тест-объектов дождевых червей [102 - 104], малощетинковых червей энхитреид *Enchytraeidaes albidus* [105 - 111], модельного вида компостного червя *Eisenia fetida* [105]. Черви являются естественными обитателями почвы, участвуют в почвообразовательном процессе, продукты их жизнедеятельности необходимы растениям. Черви поглощают, и разлагают остатки органических веществ, накапливая загрязняющие вещества [103, 104, 112].

Биотестирование на червях основано на контактном и кишечном воздействии ксенобиотиков [102]. Контактное воздействие гербицидов оценивается путем погружения червей в исследуемые растворы, затем переноса на фильтровальную бумагу для стекания жидкости, и размещения в емкости с почвой свободной от загрязняющих веществ. Контактно-кишечное воздействие оценивается, путем размещения тест-объектов в почву контаминированную пестицидами необходимой концентрацией. Ответная реакция определяется по выживаемости, репродуктивности и поведенческим реакциям червей на воздействие загрязняющих веществ [102 - 106, 109, 111, 113 - 115].

В работе [102] в качестве ответной реакции на токсическое воздействие гербицидных препаратов описано поведенческое изменение дождевых червей: снижение подвижности, образование капсул, свертывание червей в узлы и

смертность особей при различных концентрациях. Терещенко П.В. отмечает, что вышеуказанные поведенческие изменения свойственны червям при неблагоприятных природных условиях (засуха, низкие температуры и др.). При негативном воздействии черви впадают в пассивное состояние, перестают питаться, свертываются в клубки, кожные железы образуют слизистые выделения, которые впоследствии образуют капсулу. Черви способны к восстановлению жизнедеятельности в зависимости от времени экспозиции и состава гербицидных препаратов.

Эмировой Д.Э. [103] описано биотестирование с использованием дождевых червей при определении острой токсичности коммерческого препарата ДНОК. Критерием токсичности в данной работе является гибель 50% и более особей червей за двое суток, отсутствие зарывания червей в почву, активное ползание на поверхности почвы, попытки покинуть емкость, изменение двигательной активности животных. По результатам проведенных исследований автор пришел к выводу, что гербицид в концентрации 4,8 г/л влиял на поведенческие реакции животных, угнетая двигательную активность. Аналогичные исследования описаны в работе [91, 113].

Авторы статей [109, 111] считают, что изменение поведенческих реакций червей может служить скрининг-методом для оценки возможной загрязненности почвы химическими веществами.

В работе [105] описывают опыты по определению токсичности гербицидов с использованием модельного вида компостного червя и энхитрейд. Показателями токсичности служили смертность и выживаемость червей. В ходе опытов определены концентрации пестицидов, вызывающих гибель животных, а также концентрацию, не вызывающую и вызывающую минимальный вредный эффект. Так, для глифосата максимально безвредная концентрация составляет 400 мг/кг почвы, минимально вредная концентрация – 500 мг/кг. Ганин Г.Н. отмечает, что при определении концентрации гербицидных препаратов

целесообразно проводить биотестирование с использованием червей, обитающих в почвенном покрове исследуемого региона.

Гербициды нарушают энергетический метаболизм почвообитающих коллембол, образуя комплексы с ДНК и РНК, угнетают функцию репродуктивных органов животных, снижая количество яиц в кладках, кратность увеличения численности популяций [116].

Химические методы способствуют изменению и в некоторых случаях прерыванию жизненных циклов почвенных организмов. Таким образом, обработка почвы гербицидами пагубно влияет на популяцию дождевых червей, снижая разнообразие видов, сокращая численность популяции и биомассу червя [117].

1.6.2.3 Использование *Daphnia magna* в биотестировании

Биотестирование с использованием дафний *D. magna* широко применяется в мировой практике с целью определения токсичности техногенных и природных сред. Дафнию относят к «классическим» тест-объектам. Дафнии являются низшими ветвистоусыми ракообразным, невелики по размеру (длина тела от 1 мм до 6 мм), разнообразны по внешнему виду. Размножаются они партеногенетически, что обеспечивает генетическую однородность рачков. Эти организмы встречаются практически во всех водоемах. Являясь фильтраторами воды, питаются взвешенными бактериями, одноклеточными водорослями, растворенными органическими веществами. Кроме того, дафния отвечает вышеуказанным требованиям, предъявляемым к тест-объектам в биотестировании. [92].

Наибольшее распространение получили дафнии в определении токсичности водных объектов. Пропуская через свой организм большое количество воды, содержащей токсичные вещества, дафнии показывают высокую чувствительность к ксенобиотикам. Это качество позволило использовать рачков для определения не только острой токсичности, но и

биоидентификации некоторых химических соединений [88]. Продолжительность исследований составляет от нескольких часов до 21 суток, в зависимости от изучаемой ответной реакции [118].

В качестве показателей токсичности у *D. magna* используют следующие тест-функции: поведенческие, морфологические, физиологические, биохимические. К наиболее распространенным критериям токсичности относят физиологические: выживаемость (гибель), плодовитость тест-объекта и морфологические. В ряде работ в качестве тест-функции используют качественно-количественное биотестирование. К качественной оценке морфологических изменений относят помутнение плазмы клеток, деформация раковины, изменение окраски дафний. К количественному учету морфологических изменений относятся нарушения эмбрионального развития: изменения размеров тела, уродства, мертворождаемость и др. [90]. В работе Ольковой А.С. [90] описаны поведенческие изменения дафний, которые выражаются в изменении двигательной активности рачков в исследуемой пробе по сравнению с контрольной. Двигательную активность определяли по количеству пересечений двух перпендикулярных линий, нанесенных на дно емкости с образцом. Для достижения максимальной чувствительности дафний к ксенобиотикам используют молодь в возрасте 15-26 часов, у которой в полной мере не сформирован токсикологический барьер. Исследовано влияние фосфорорганических и хлорорганических соединений на биохимическом уровне рачков *D. magna*, показано ингибирующее действие на холинэстеразу [88].

В ряде работ описано биотестирование для определения острой и хронической токсичности пестицидов [119 - 122]. Для исследования ученые [120] использовали глифосат. Метод включал выдерживание тест-объектов в пяти различных концентрациях гербицида с продолжительностью воздействия 24 и 48 часов. В качестве ответной реакции служила выживаемость (гибель) рачков. В ходе эксперимента определена концентрация глифосата LC₅₀,

вызывающая 50% гибель тест-организмов. Острая токсичность LC_{50} установлена на уровне 0,019 мг/л при 24-часовом воздействии, и 0,012 мг/л с периодом экспозиции 48 часов. Параметрами хронической токсичности служили морфологические изменения дафний. В ходе опыта определены витальные концентрации, оказывающие угнетающее действие и вызывающие морфологические изменения: отставание в росте, потеря окраски, задержка полового созревания, нарушение эмбрионального развития яиц. Автор статьи показывает влияние пестицидов на эмбриональное развитие яиц разных пометов самок, и делает заключение, что данное отклонение можно использовать, как прогностический тест.

В работе [123] изучено хроническое воздействие гербицида Раундап в ряду поколений *D. magna*. В ходе исследования отмечено, что при концентрациях Раундапа 0,2 мг/л и 2,0 мг/л происходило угнетение репродуктивной системы (снижение количества новорожденных в одном помете), уменьшение размеров рачков и ингибирование формирования пигментного комплекса, выраженное в потере интенсивности окраса особей.

Биотестирование с использованием дафний соответствует современным требованиям к биотестам. Дафнии обладают высокой чувствительностью к различным химическим веществам, при учете ответных реакций затрагиваются важные параметры жизнедеятельности, что позволяет различать острое и хроническое воздействие.

1.6.2.4 Биотестирование с использованием растений

Для оценки токсичности водных образцов или водных почвенных вытяжек широкое распространение получило фитотестирование. С этой целью в качестве тест-объектов используют растения, проросшие семена растений.

Рясковый тест является распространенным методом биотестирования. В качестве тест-объектов используют ряску малую (*Lemna minor L.*), ряску горбатую (*Lemna gibba L.*) и другие виды. Вегетативное тело рясковых

напоминает крошечный плавающий лист, недифференцированное на лист и стебель. Листецы собраны в небольшие розетки, цветет ряска редко. Процесс размножения вегетативный, с образованием дочерних отростков, которые отделяются, и становятся самостоятельными растениями. Каждое растение в течении жизни производит большое количество дочерних листецов, поглощая огромное количество веществ, растворенных в воде [124]. Бионакопление, а также простота строения, высокая чувствительность и распространенность позволили использовать ряску в биотестировании.

Критериями токсичности при биотестировании проб с использованием *Lemna minor* L. служат морфологические изменения: появление хлорозов и некрозов, гибель растения, окрас листецов, появление дочерних отростков, распад цельного растения на отдельные листецы [11, 89, 124 - 127].

В работе [89] описано определение фитотоксичности почвенных и системных гербицидов, применяемых на посевах подсолнечника. Опытными образцами служили растворы с различной концентрацией имидазолиновых гербицидов, результаты сравнивали с контрольным образцом (вода). Тест-объектом служила ряска малая с хорошо развитыми листецами ярко-зеленой окраски, помещённая в емкости с растворами гербицидов. Оценку токсичности проводили по уровню роста растений в течение 7 суток. В результате опыта выявлено как угнетающее, так и стимулирующее действие различных гербицидов.

Автором в работе [11] проведены результаты исследования по определению токсичности препарата ДНОК, обладающего гербицидными свойствами. Исследования проводили при концентрациях равных 0,4; 0,8; 1,6 и 3,2 мл/л, времени экспозиции 7 суток. Параметрами фитотоксичности служили количество живых растений, морфологические изменения (обнаружение хлороза, обесцвечивание листецов, расслоении розеток). Эмирова Д.Э. отмечает снижение функционирования репродуктивной системы, выраженное в отсутствии вегетативного деления клеток. Результаты исследования показали,

что препарат в указанных концентрациях обладает фитотоксическим действием, морфологические изменения листочков зависимы от количества препарата в исследуемых растворах.

В работе [125] описано исследование воздействия гербицида Раундап на *Lemna minor* L при концентрациях в диапазоне 0,1 - 0,8 мл/л, времени экспозиции 7 суток. Автором статьи также отмечено негативное воздействие гербицида на тест-объект, которое выражалось в расслоении розеток, хлорозе и некрозе листочков, угнетении репродуктивной функции, отмирания корней, гибели растений. Гербицид в указанных концентрациях обладал фитотоксичным действием, которое возрастало с увеличением времени экспозиции. На основании морфологических изменений автор классифицирует исследуемые концентрации гербицида на слаботоксичные (E_{10}), среднетоксичные (E_{50}) и высокотоксичные (E_{90}). Аналогичные морфологические изменения описаны в работе [126] при биотестировании гербицида метазахлор. При концентрации 2,8 мг/л метазахлор проявлял слабую токсичность, время воздействия 7 дней; при концентрации более 48,6 мг/л наблюдался негативный эффект с некрозом листьев и гибелью растений.

Биотестирование гербицидов с использованием растений сельскохозяйственного назначения необходимо с целью определения воздействия на организмы агроценозов, в том числе на культуры севооборота. К наиболее распространенным тест-объектам относятся: свекла, горчица, кукуруза, рис, соя, пшеница и ячмень, характеризующиеся различной чувствительностью [128].

Автор статьи [128] описывает результаты исследования воздействия гербицидов клопиралида, клетодима и их смеси, находящихся в почве через год после внесения, на тест-объекты кормовую свеклу и сою. Образцы почвы отбирались с тестируемых полей, в которые высевались семена тест-объектов. Критерием токсичности служили изменение надземной массы свеклы и длины проростков у сои по сравнению с семенами, выращенными в контрольной

почве, свободной от гербицидов. Результаты исследований показали незначительные морфологические изменения (длина отростков, снижение биомассы) у тестируемых культур. Автор сделал заключение о возможности использования кормой свеклы и сои в севообороте на следующий год при применении в агротехнологии исследованных гербицидов.

В работе [89, 129] представлены результаты биотестирования гербицидов с использованием тест-объектов редис красный с белым кончиком и кресс-салат. Имидазолиноны в отношении редиса красного с белым кончиком проявили себя, как ауксины, показывая ростостимулирующие свойства. У данного тест-объекта наблюдался более интенсивное развитие корневой системы в сравнении с контрольным образцом. Противоположное воздействие оказали гербициды на кресс-салат, ингибируя развитие корешков проростков. Кресс-салат в отношении имидазолинонов показал большую чувствительность [89].

Определение фитотоксичности гербицидов с использованием подсолнечника масличного описано в работе [97]. С этой целью в качестве тест-объектов служили семена *Helianthus annuus L.* Семена проращивали в почве, обработанной пестицидами при постоянной температуре и влажности. Критерием токсичности служили морфологические изменения в сравнении контрольной пробой (обработка почвы дистиллированной водой). Морфологический анализ включал следующие показатели: всхожесть, длина корней. Анализ результатов опыта показал, что все исследуемые пестициды ингибируют рост корневой системы и снижают показатели всхожести. Препараты в исследуемых концентрациях оказывали негативное влияние на проростки *Helianthus annuus L.* с выраженным фитотоксическим действием. В статье [130] описано влияние пестицида БИ-58 на морфологические показатели проростков *Allium cepa L* и *Zea Mays L.* Семена выдерживали при концентрациях пестицида от 0,05 до 0,4 мл/л со временем экспозиции 6 часов. Параметрами фитотоксичности служили всхожесть, длина корешков. Пестицид

оказывал негативное воздействие с дозозависимым характером. Увеличение концентрации пестицида ингибировало корневой прирост и всхожесть семян.

С целью определения токсичности ксенобиотиков также используют биотестирование, где в качестве тест-объектов используют генеративные органы растений микрогаметофиты, как самые чувствительные к токсическому воздействию [131 - 133]. Авторы работы [133] для определения токсичности пестицида использовали микрогаметофит подсолнечника масличного *Helianthus annuus L.* Семена *H. annuus* проращивали, проростки обрабатывали пестицидом различной концентрации, с последующей фиксацией, хранением соцветий и определением фертильности пыльцевых зерен. Критерием токсичности служили морфологические изменения структуры пыльцы. В контрольных растениях отсутствовали стерильные пыльцевые зерна, что показывает высокую фертильность мужских генеративных органов. В опытных образцах показатель фертильности снижался (от 1,1 до 1,2 раза) с увеличением концентрации пестицида (от 0,375 до 3,0 мг/л), что позволило авторам сделать вывод о гаметоцидном действии ксенобиотика, ингибирующее продуцирование фертильной пыльцы. Влияние гербицида ДНОК на показатель фертильности генеративного органа *Zea Mays* описано в работе [132]. Мужские соцветия кукурузы сахарной обрабатывали ксенобиотиком при концентрациях в диапазоне от 2 до 16 мг/л. Критерием токсичности служили морфологические изменения мужских гаметофит. Опытные данные показывают увеличение индекса стерильности гаметофитов с увеличением концентрации гербицида. Препарат при концентрации 2 мг/л не оказывал существенного влияния на генеративные органы *Zea Mays*, при концентрации 16 мг/л показатель фертильности снижался в 1,15 раза в сравнении с контрольным образцом. Воздействие на генеративные органы озимой мягкой пшеницы при биотестировании гербицидов описано в работе [131]. В качестве тест-объекта была использована пыльца пшеницы, фитотоксичность определялась по морфологическим изменениям: размер, фертильность, жизнеспособность тест-

объекта. В пыльце обработанных растений присутствовали деформированные, крупные и мелкие пыльцевые зерна, содержание стерильных, аномальных пыльцевых зерен превышало в сравнении с контрольными образцами. По результатам исследований автором статьи Звягиной А.С. сделан вывод о негативном влиянии на репродуктивную систему пшеницы.

1.6.2.5 Влияние гербицидов на млекопитающих

Широкое изучение острой и хронической токсичности гербицидов для млекопитающих связано с возможным аналогичным воздействием ксенобиотиков на организм человека. Основными показателями, характеризующими воздействие гербицидных препаратов на организм млекопитающих, являются: изменение состава и свойств крови, ингибирование ферментов, связывание химических веществ с ДНК или РНК, негативное воздействие на внутренние органы и репродукцию животных.

Высокая токсичность фосфорорганических соединений на организменном уровне объясняется химическим родством с ацетихолином, и возможностью взаимодействовать холинэстеразами [134]. Активный центр холинэстеразы представлен на рисунке 1.8.

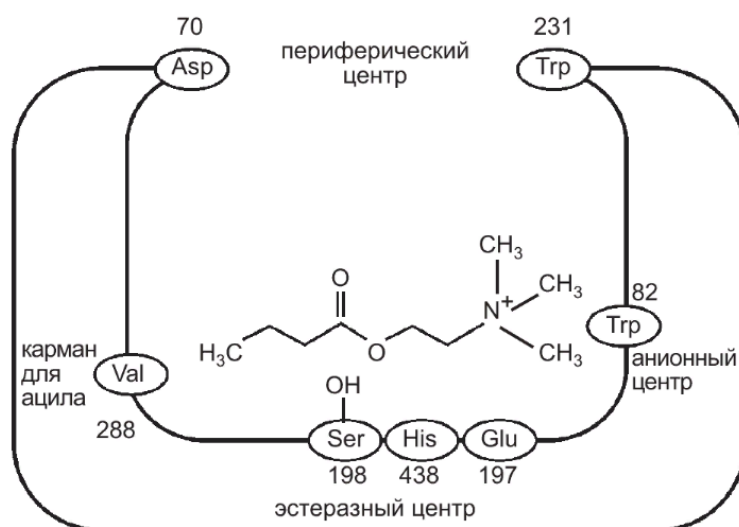


Рисунок 1.8 - Схема активного центра холинэстеразы

В результате конкурентного ингибирования, инактивация холинэстеразы является необратимой, что оказывает губительное действие на организм. Избыток негидролизованного ацетилхолина приводит сначала к ускорению проведения нервных импульсов и далее к блокированию передачи нервных импульсов (паралич). Кроме специфического действия, образование ковалентной связи со специализированным акцептором, для фосфорорганических соединений характерно неспецифическое воздействие (фосфорилирование) с различными радикалами аминокислот, преимущественно ферментных. Результатом таких воздействий является нарушение функции клеточных и субклеточных мембран, дезорганизация метаболизма, и гибель клеток [135].

Продукты метаболизма сложных молекул гербицидов могут накапливаться в органах, тканях и биологических жидкостях в виде молекул меньшего размера. Метаболиты могут участвовать в угнетении тканевого дыхания, подавляя процесс аккумуляции и трансформации энергии, ингибировании синтеза ДНК, а также участвовать в развитии вторичной иммунодепрессии и оказывать угнетающее действие на эритроциты, синтез гемоглобина, влиять на структуру и функции клеточных мембран, обладать мутагенными и канцерогенными свойствами [116, 133, 135 - 143].

В работе [144] описано влияние глифосата при пероральном и подкожном введении гербицида лабораторным животным. Однократное пероральное введение гербицида в концентрациях от 3500 мг/кг до 10000 мг/кг не приводило к гибели животных. При концентрациях свыше 5000 мг/кг наблюдалось изменение в поведении белых мышей, выражающееся в снижении двигательной активности и развитии ступора, у большинства подопытных животных гербицид вызывал воспаление кишечника. При осмотре паренхиматозных органов подопытных животных наблюдалось изменение линейных размеров по отношению к размерам органов здоровых животных. Подкожное введение гербицида в вышеуказанных концентрациях вызывало гибель животных при

концентрации токсиканта 3157 мг/кг. Автор работы делает заключение о негативном влиянии глифосата на организм млекопитающих и человека.

В работе [21, 145] отмечено негативное влияние глифосата на репродуктивную функцию млекопитающих, угнетении выработки половых гормонов, нарушения сперматогенеза. Установлено, что глифосат снижает выработку половых гормонов у мышей на 90% [134].

Глифосат способствует изменению гематологических параметров в крови у животных в сторону уменьшения числа эритроцитов. Глифосат влияет на гуморальную иммунную систему организма животных, снижая концентрацию иммуноглобулинов в сыворотке крови [146].

Внутримышечное введение глифосата при концентрации 50 мг/кг показало достоверное изменение количества форменных клеток в сторону снижения числа эритроцитов и лимфоцитов, отклонение биохимических показателей крови лабораторных животных от физиологических норм [147].

Внутрижелудочное введение аминной соли 2,4-Д способствовало развитию лейкопении, уменьшению числа нейтрофилов в периферической крови лабораторных животных. Гербицид обладает иммуноподавляющим действием, изменяет количество форменных клеток в крови, нарушает функционирование нейтрофилов, вызывает свободно-радикальное окисление липидов, гепатотоксические эффекты, нарушение функционирования клеточной мембраны, энергетического обмена, снижает массу тимуса и численность клеток в органе [148 - 152]. Подкожное введение фосфорорганических соединений провоцирует состояние окислительного стресса в организме животных, активизируя перекисное окисление белков [153 - 155]. Иммунотоксичность ксенобиотиков выражается на влияние развития клеток крови вплоть до полипотентной стволовой кроветворной клетки: ингибирование эритроидного ростка кроветворения (проэритробласты, эритробласты, незрелые клетки эритроцитов, эритроциты), угнетение миелоидного процесса кроветворения (клетки- предшественники нейтрофилов,

эозинофилов, базофилов, моноцитов), угнетение развития лимфатической стволовой клетки, дальнейшей ее пролиферации и дифференцировки в В₂- и Т₂-лимфоциты. Поражение естественных клеток киллеров (Т- лимфоцитов) нарушает иммунный гомеостаз, снижая защиту от различных антигенов. Фосфорорганические соединения вызывают супрессию основных гуморальных и клеточных иммунных реакций, снижая содержание антителообразующих клеток, нарушая основные механизмы регуляции иммуногенеза [156]. В работе [137] описано негативное влияние фосфорорганических соединений на фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов.

В работе [157] показана генотоксичность глифосата. При пероральном введении глифосата мышам в концентрациях 500, 1000 2000 мг/кг массы тела пестицид проявлял слабую мутагенную активность, вызывая разрушения ДНК в образцах костного мозга и печени. В работах [158, 159] изучено влияние 2,4-Д при концентрации 30 мг/кг на клетки гипофиза тиротропы и органы эндокринной системы. При пероральном введении в организм животных наблюдались однотипные изменения, сопровождающиеся дистрофическими и деструктивными процессами в цитоплазме клеток тиротропов, нарушение структуры гемомикроциркуляторного русла, возникновение стресс-реакций в системе аденогипофиз-щитовидная железа. Степень выраженности изменений зависит от возраста экспериментальных животных и длительности воздействия гербицидов. Кроме того, описано иммунодепрессивное воздействие 2,4-Д на лабораторных животных, которое выражается в нарушении созревания В- и Т-лимфоцитов, угнетении гуморального иммунитета, гистологических изменениях в иммунных органах, развитии аллергических реакций.

Показано [160], что аминная соль 2,4-Д вызывала гистологические изменения печени у лабораторных животных при концентрации 120 мг/кг. Авторами работы [155] представлены результаты исследований биохимических показателей в биоматериале лабораторных мышей в зависимости от времени воздействия глифосата при концентрации 2 мг/кг массы тела. Достоверные

данные получены после 72-х часов воздействия ксенобиотика. Гербицид вызывал снижение уровня гликогена в печени и мышцах лабораторных животных, оказывал влияние на активность ферментов, и на содержание липидов и холестерина в сыворотки крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ПЕРВОЙ ГЛАВЕ

На основании литературных источников можно сделать вывод, что гербициды при различных концентрациях, времени экспозиции и способах введения в организм млекопитающих способны ингибировать процессы кроветворения, проявлять канцерогенные свойства, негативно влиять на внутренние органы и репродукцию животных. В то же время влияние химических веществ в низких концентрациях и длительной интоксикации изучено недостаточно. В связи с этим представляет интерес дальнейшее изучение влияния остаточного количества пестицидов при длительной интоксикации.

2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственной технической университет», Федерального государственного бюджетного учреждения «Тверская межобластная ветеринарная лаборатория», Федерального всероссийского научно-исследовательского института мелиорированных земель - филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального исследовательского центра "Почвенный институт имени В.В. Докучаева" в период с 2018 по 2021 год.

2.1 Объекты исследования

В работе использовали: 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота), утвержденного типа стандартный образец (СО), аттестованное значение СО 98,2%, изготовитель Общество с Ограниченной Ответственностью «Научно-производственный и аналитический центр «Эколан»; клопиралид (3,6-дихлорпиколиновая кислота), стандартный образец предприятия (СОП), аттестованное значение СОП 97,6%, изготовитель Научно-производственный кооператив «БЛОК-1»; глифосат (N-фосфонометилглицин), государственный стандартный образец (ГСО), аттестованное значение ГСО 99,6%, изготовитель ФГУП «Всероссийский Научно-исследовательский институт химических средств защиты растений». Тест-культура инфузории стилонихии (*Stylonychia mytilus*), белые лабораторные мыши.

2.2 Материальная часть

Реактивы и расходные материалы: натрий хлористый (ГОСТ 4233-77); калий хлористый (ГОСТ 4234-77); кальций хлористый 2-водный (СТП ТУ КОМП 2-472-11); магний хлористый 6-водный (ГОСТ 7209-77); натрий углекислый кислый (ГОСТ 4201-79); медь сернокислая 5-водная (ГОСТ 4165-78); дрожжи хлебопекарные прессованные (ГОСТ Р 54731-2011); вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72); этиловый спирт 95-% (ГОСТ 17299-78);

ацетон (ГОСТ 2603-79); ледяная уксусная кислота (ГОСТ 18270-72); метиленовый голубой (синий) (ТУ 6-09-29-76); поваренная соль (ГОСТ 4233-77); фиксатор-красителя метиленовый синий по Май-Грюнвальду (ТУ 9398-269-27428909-02); краситель азур-эозин по Романовскому (ТУ 9398-270-27428909-02); формалин технический (ГОСТ 1625-89); эозин спиртовой 1-%; гематоксилин Эрлиха; зерно овса; почвы дерново-подзолистая легкосуглинистая, супесчаная, легкоглинистая; ацетонитрил (ТУ 6-09-3534-82); кислота соляная (ГОСТ 3118-77); натрия гидроксид (ГОСТ 4328-77); натрий тетраборнокислый (ГОСТ 4199-76); 9-флуоренилметилхлорформиат (Sigma, Германия).

Оборудование: луночные микроаквариумы из органического стекла, рабочий объем лунки 0,4 см³; весы Sartorius AC-1218 (Германия); чашки Петри (биологические) (ГОСТ 23932-90); колбы конические с пришлифованными пробками (ГОСТ 1770-74); виалы (флаконы полипропиленовые) вместимостью 50 см³ с герметично закрывающимися пластмассовыми крышками; колбы мерные вместимостью 100 мл (ГОСТ 1770-74); сушильный шкаф ED115 (Binder, Германия); дозатор механический одноканальный с варьируемым объемом ВЮНИТ (Sartorius, Германия); термостат электрический суховоздушный ТС-80М-2 (Одесское производственное объединение "Медлабприбор техника"); сито лабораторное С20/50 (Вибротехник, Россия); шейкер медицинский S-3-02М (Elmi, Латвия); водяная баня с перемешиванием Shaking water bath GFL 1092 (GFL, Германия); баня ультразвуковая УЗВ-28 ТТЦ «Сапфир» (Россия); стекло предметное 25x75 мм (ГОСТ 9284-75); биологический микроскоп ВХ43 OLYMPUS (Япония), оснащенный USB-камерой DCM310 с программным обеспечением «Микро-Анализ база изображений»; пипетка прямая стеклянная (типа Сали); микроскоп Olympus CX21 (Япония), оснащенный камерой Olympus U-TV1X-2 (Филиппины); термоэлектрический охлаждающий столик ТОС-1 (Россия); микротом

замораживающий МЗ-2 (Россия); микроскоп с системой видео документирования LeicaDM 1000 (Германия); масс-спектрометр Autoflex (модификация MICROFLEX) (BRUKER DALTONIC GmbH, Германия); хроматограф жидкостной с диодно-матричным и флуоресцирующими детекторами Agilent Technologies 1200 Series (AGILENT, США).

2.3 Методы исследования

2.3.1 Культивирование стилонихий

Культивирование стилонихий и подготовку суточной культуры осуществляли по ГОСТ 31674-2012 «Корма, комбикорма, кормовое сырье. Методы определения общей токсичности». Средой для выращивания клеток служил рабочий раствор Лозино-Лозинского, модельный токсикант - 5-водная сернокислая медь. Стилоники культивировали в чашках Петри, чашки помещали в термостат при температуре от $(23\pm 0,5)$ °С, в качестве корма использовали свежие хлебопекарные дрожжи, высушенные при температуре от $(53\pm 0,5)$ °С.

2.3.2 Проведение биотестирования со стилонихиями

Для проведения биотестирования готовили основной стандартный раствор глифосата с содержанием 200 мг/л. Виалы помещали на водяную баню. Время и температуру подбирали экспериментально. Стандартные растворы готовили непосредственно перед проведением опыта. Аналогичным образом готовили растворы стандартов клопиралида, 2,4-Д.

Анализ цитотоксичности производился при помощи биотестирования на стилонихиях (*Stylonychia mytilus*). Из основных стандартных растворов каждого вещества готовили рабочие растворы методом последовательного разведения. В лунки микроаквариума при помощи дозатора вносили по 100 мкл питательной среды с определенным количеством суточной культуры инфузорий, учет численности клеток производили при помощи микроскопа. После подсчета в лунки добавляли по 100 мкл рабочих растворов с гербицидом, в контрольную

лунку добавляли 100 мкл дистиллированной воды. Блок лунок микроаквариума накрывали стеклом для предотвращения испарения. Время экспозиции составляло до 72 часов при температуре $(23 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. Кратность проведения для каждого гербицида составляла 12 раз.

2.3.3 Подготовка почвы для биотестирования

2.3.3.1 Заражение почвы гербицидом

Для биотестирования готовили почву с необходимыми концентрациями глифосата. Почву ссыпали на полимерную поверхность, разравнивали тонким слоем от 0,5 до 1 см без просветов. Водный раствор гербицида вносили трехкратной обработкой почвы. Аккуратно распыскивали посредством пульверизатора 1/3 часть рабочего раствора гербицида. Почву сушили в течение суток в защищенном от солнца месте при температуре окружающей среды до воздушно - сухого состояния. Высушенную почву тщательно перемешивали, повторно формировали слой, и снова обрабатывали водным раствором гербицида.

Подготовленную пробу почвы в воздушно - сухом состоянии хранили в полимерном пакете при комнатной температуре.

2.3.3.2 Приготовление водной вытяжки гербицидов

Почву растирали в ступке пестиком, и просеивали через сито с диаметром отверстий 1 мм. Навеску почвы помещали в колбу, приливали дистиллированную воду, выдерживали на водяной бане от 1 до 3 часов, интенсивно перемешивая при температуре $(60 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$. Колбу с содержимым охлаждали до комнатной температуры. Раствор декантировали, центрифугировали в течении 5 минут при скорости 5000 оборотов в минуту, и использовали при биотестировании.

2.3.4 Определение концентрации глифосата методом ВЭЖХ

Определение остаточного количества глифосата в водной вытяжке и водных растворов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

осуществляли по методики МУК 4.1.1978-05 «Определение остаточных количеств глифосата в зерне и масле сои, семенах и масле подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии».

Подготовку, очистку реактивов и растворителей, приготовление растворов, подготовку подвижной фазы для ВЭЖХ, кондиционирование колонки, приготовление стандартных растворов глифосата, построение калибровочного графика, подготовку анионообменной смолы и колонки, подготовку катионообменной смолы осуществляли по МУК 4.1.1978-05 [161].

Водную вытяжку в количестве 25 мл центрифугировали 10 минут при скорости 5000 оборотов в минуту. Из супернатанта отбирали 5 мл водной вытяжки, помещали в мерную колбу емкостью 100 мл, приливали 80 мл деионизированной воды. Водную фазу подщелачивали 1 М NaOH pH 11,0 и доводили деионизированной водой до объема 100 мл.

Очистку на ионообменных колонках, дериватизацию и условия хроматографирования осуществляли в соответствии с МУК 4.1.1978-05 [161].

При определении содержания глифосата, растворенного в воде, водный раствора в количестве 5 мл переносили в мерную колбу емкостью 100 мл, доводили деионизированной водой до объема 100 мл. Аликвоту в количестве 12 мл упаривали досуха на ротаторном испарителе при температуре 40 °С.

Дериватизацию, условия хроматографирования и расчет содержания глифосата в водных вытяжках осуществляли в соответствии с МУК 4.1.1978-05 [161].

2.3.5 Компостирование торфонавозной смеси и почвы

Исследования проводились на базе Федерального всероссийского научно-исследовательского института мелиорированных земель - филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального исследовательского центра "Почвенный институт имени В.В. Докучаева" под руководством научного сотрудника лаборатории Фомичевой

Н.В. Эксперименты ставили в соответствии с Патентом России № RU 2520144 С1 [162]. В качестве субстратов для торфонавозной смеси использовали переходный торф с влажностью 48 % и навоз крупного рогатого скота с содержанием влаги 82 %, взятых в соотношении 50:50. Исходную смесь помещали в объемные полимерные емкости, смесь тщательно перемешивали.

Глифосат предварительно растворяли в 50 мл дистиллированной воды, равномерно вносили в смесь и почву, перемешивали. Образцы загружали в параллельно работающие ферментеры объемом 1,5 л, подачу кислорода осуществляли дискретно, для установления и поддержания постоянной температуры использовали термостат. Средняя влажность полученной смеси и почвы составляла 38 - 40%, содержание гербицида - 200, 400, 600 мг/кг. В качестве контрольных образцов использовали почву и смесь свободные от гербицида. Отсутствие гербицида подтверждали исследованием водных вытяжек почвы и торфа методом ВЭЖХ.

В основу проведения ускоренной твердофазной ферментации приняты условия быстрого сбраживания торфяно-навозной смеси, описанные в патенте [162]. Смесь и почву инкубировали в течении 48 часов при температуре $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. От образцов отбирали навески для микробиологического посева. Далее подвергали пастеризации при температуре $(60 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. Через 48 часов инкубирования из каждого сосуда отбирались образцы для микробиологического посева. Далее образцы охлаждали до $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$, выдерживали в течении 24 часов, затем дальнейшее охлаждение до комнатной температуры. Изучение микробного сообщества смеси и почвы проводили методом посева в чашках Петри на мясо-пептонном агаре, с последующим подсчетом выросших колоний и идентификацией видовой принадлежности с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии.

2.3.6 Микробиологические исследование почвы, торфонавозной смеси

В стерильные чашки Петри при помощи стерильного пинцета производили точечный отбор проб почвы и смеси по всей глубине ферментера. Из объединенной пробы отбирали необходимое количество для микробиологического посева. Анализируемую пробу переносили в плоскодонную колбу со стерильной жидкостью для разведения, и помещали на гомогенизатор. Встряхивание проводили в течении 15 минут, проведение исследования, который включает приготовление разведений, приготовление питательной среды мясо-пептонного агара, проведение посева и учет количества колоний осуществляли по ГОСТ 33379-2015 «Удобрения органические. Методы определения наличия патогенных и условно-патогенных микроорганизмов». Идентификацию микроорганизмов проводили с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра.

2.3.7 Подготовка зерна овса, зараженного стандартным образцом глифосата

Готовили рабочие растворы стандартного образца глифосата с определенными концентрациями. Стандарт растворяли в течение одного часа при температуре $(60 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$. Овес помещали в чистые поддоны, разравнивали тонким слоем от 0,5 до 1 см без просветов. Гербицид вносили трехкратной обработкой зерна. Аккуратно распыскивали посредством пульверизатора 1/3 часть рабочего раствора гербицида. Зерно сушили в течение суток в защищенном от солнца месте при температуре окружающей среды до воздушно-сухого состояния. Высушенное зерно тщательно перемешивали, повторно формировали слой, и снова обрабатывали гербицидом.

Зерно на поддонах сушили в вытяжных шкафах до влажности не более 15%. Влажность определяли по ГОСТ 13586.5-2015 «Зерно. Метод определения влажности». Высушенное зерно хранили в полиэтиленовых емкостях при комнатной температуре.

2.3.8 Определение хронической токсичности на лабораторных животных

2.3.8.1 Биотестирование гербицидов на мышах

Для оценки хронической токсичности *in vivo* были использованы лабораторные мыши, предоставленные из вивария ФГБУ «Тверская МВЛ». Исследование выполнено на 48 белых беспородных лабораторных мышах, 12 самцах и 36 самках в возрасте 2-х месяцев средней стандартной массой 25 - 30г. Состояние животных оценивали визуально. Мыши содержались в соответствии с требованиями ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами», Приказа Министерства Здравоохранения СССР от 12 августа 1977 года N 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных». Условия содержания представлены на рисунке 2.1.



Рисунок 2.1 - Условия содержания лабораторных животных

Мышей содержали в специальных клетках для лабораторных животных при комнатной температуре от 20 °С до 24 °С, в условиях естественного освещения с затемненной верхней частью окна, принудительной вентиляции. В качестве подстилки использовали солому, прошедшую термообработку в сушильном шкафу при температуре не менее 80 °С в течении часа.

Эксперимент выполняли в два этапа. Первый этап предусматривал раздельное содержание самцов и самок до достижения возраста 3-х месяцев, продолжительность этапа 1 месяц. Второй этап исследования включал формирование семей из половозрелых лабораторных животных, и проведение основной части эксперимента. Семья состояла из 3 самок и 1 самца.

Для наблюдения динамики воздействия гербицида на животных по истечении 3 месяцев $\frac{1}{2}$ часть лабораторных животных умерщвлялась методом декапитации, другая часть - через 5 месяцев после содержания по схеме второго этапа.

Проводили отбор крови для морфологического анализа, визуальный осмотр внутренних органов при патологоанатомическом вскрытии, взятие патологического материала для приготовления гистологических препаратов.

В ходе эксперимента осуществлялся ежедневный визуальный осмотр состояния животных. Критериями хронической токсичности служили изменение поведенческих реакций, воспроизводство потомства, количество особей в потомстве и жизнеспособность детенышей, число павших животных и сроки их гибели, изменения в клетках крови и тканях органов.

2.3.8.2 Приготовление цитологических препаратов крови

Подсчет и расчет количества форменных элементов крови производили с помощью камеры с сеткой Горяева по стандартной методике [163]. Для подсчета лейкоцитов осуществляли отбор проб крови пипеткой прямой стеклянной (типа Сали) в количестве 0,02 мл. Кровь помещали в пробирки с раствором Тюрка. Для подсчета эритроцитов кровь объемом 0,02 мл переносили в пробирку с 3 % - ным раствором хлорида натрия. Приготовление цитологических препаратов крови осуществлялся по методике [163], окраска по Паппенгейму.

2.3.8.3 Приготовление гистологических препаратов

Для гистологического исследования от каждого животного, при патологоанатомическом вскрытии, отбиралась печень, и помещалась в раствор формалина с массовой долей формальдегида 10%, взятый в десятикратном объеме к объему фиксируемых образцов, плотно укупоривали в стеклянных емкостях. Фиксированные образцы хранили при комнатной температуре. Приготовление фиксирующего раствора и фиксацию патологического материала проводили согласно методическим указаниям [164]. Приготовление гистологических препаратов проводилось по стандартной методике [165]. Отобранные образцы перед исследованием подвергали обработке в следующей последовательности: фиксация, промывка проточной водой, уплотнение образцов, изготовление срезов, окраска срезов, заключение срезов под покровное стекло. Замораживание образцов осуществляли с помощью термоэлектрического охлаждающего столика, срезы образцов осуществляли с помощью микротомного ножа микротомы замораживающего, окрашивание гистосрезов осуществляли гематоксилин - эозином, гистологический препарат рассматривали с помощью светового микроскопа с системой видео документирования в комплекте с осветителем при 10, 20, 40-кратном увеличении.

2.3.9 Формулы расчета

2.3.9.1 Расчет изменения количества стилонихий

Оценка воздействия гербицидов при определенных концентрациях на простейшие учитывалась по изменению количества инфузорий. Изменение количества клеток стилонихий в опытных образцах $K_{(вэ)}$, %, с соответствующим временем экспозиции, рассчитывали по формуле (1):

$$K_{(вэ)} = N_{(вэ)} / N_{(но)} * 100\%, \quad (1)$$

где $N_{(вэ)}$ – средняя численность клеток в соответствующее время экспозиции, шт;

$N_{(но)}$ - средняя численность клеток в начале опыта, шт.

2.3.9.2 Расчет изменение количества лейкоцитов, эритроцитов

Цитотоксичность глифосата определяли по качественному и количественному изменению форменных клеток периферической крови. Среднее уменьшение количества лейкоцитов $\Delta K(срл)$, %, рассчитывалось по формуле (2):

$$\Delta K(срл) = 100\% - K(ло)/K(лк)*100\%, \quad (2)$$

где $K(ло)$ – количество лейкоцитов в опыте, шт;

$K(лк)$ – количество лейкоцитов в контрольной пробе, шт.

Среднее уменьшение количества эритроцитов $\Delta K(срэ)$, %, рассчитывалось по формуле (3):

$$\Delta K(срэ) = 100\% - K(эо)/K(эк)*100\%, \quad (3)$$

где $K(эо)$ – количество эритроцитов в опыте, шт;

$K(эк)$ – количество эритроцитов в контрольной пробе, шт.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Обоснование концентрации гербицидов в модельных образцах

С целью определения необходимых концентраций гербицидов при биотестировании, был произведен анализ наиболее часто используемых коммерческих препаратов в сельском хозяйстве, и рассчитано фактически возможное содержание действующих веществ в почве. Содержание глифосата в коммерческих препаратах колеблется от 360 г/л, 2,4-Д - от 600 г/л, клопиралида - от 300 г/л. Расчет проводился с учетом рекомендаций к применению на основании данных регламента применения гербицидов, указанных в «Справочнике пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации 2017»:

- глифосатсодержащий препараты: «Торнадо 500, ВР» (500 г/л глифосата кислоты), норма применения препарата: 1,5 - 3 л/га при обработке паровых полей, 3 - 4 л/га при обработке полей под посев яровых культур, обрабатываемая культура – зерновые культуры;

- клопиралид содержащий препарат «Лорнет, ВР» (300 г/л), норма применения препарата – 0,16 - 0,66 л/га, обрабатываемая культура – зерновые культуры (пшеница озимая и яровая, ячмень, овес);

- 2,4-Д содержащий препарат «Дикопур Ф, ВР» (600 г/л 2,4-д кислоты), норма применения препарата – 1 - 1,6 л/га, обрабатываемая культура – зерновые культуры (пшеница яровая и озимая, ячмень, овес, рожь).

В сельскохозяйственной практике гербициды применяют двумя способами: путем опрыскиваем вегетирующих частей растений или путем непосредственной обработки почвы. Эффективность действия и расход пестицидов в первом случае зависит от ряда факторов. Расход рабочего раствора гербицидов может увеличиваться при обработке плохо смачивающихся растений, например листья с восковым налетом или

опушением, работе в сухую и жаркую погоду, а также задержки обработки посевов, которая снижает чувствительность сорняков [31].

Расчет содержания гербицидов в почве производился при условии обработки растений путем опрыскивания, проникновение в почву принималось 70 % от общего объема рабочей жидкости гербицида, данные представлены в таблице 3.1. В случае применения почвенного препарата гербицидная нагрузка на почву увеличивается. Плотность почвы зависит от минералогического и механического состава, структуры почвы и содержания органического вещества [31]. Оптимальная плотность пахотного горизонта для большинства культурных растений – 1,0 – 1,2 г/см³.

При расчете содержания действующих веществ коммерческих препаратов в почве принимаем: плотность почвы – 1,2 г/см³, глубина проникновения гербицида, равную глубине пахотного слоя – 20 см [31].

Таблица 3.1 – Расчетные концентрации гербицидов

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

С учетом расчетных концентраций первый этап биотестирования водных образцов был проведен с содержанием гербицидов от 1 до 100 мг/л.

3.2 Определение оптимальных условий растворения гербицидов

Для выбора условий пробоподготовки гербицидов был выполнен анализ растворимости пестицидов в воде. Данные по растворимости представлены в таблице 3.2 [22].

Таблица 3.2 - Справочные данные по растворимости пестицидов

Наименование гербицида	Растворимость в воде при 20 °С	
	мг/л	Пояснения
Глифосат	10500	Высокая
2,4-Д	23180	Высокая
Клопиралид	143000	Высокая

Все ГСО изготавливаются в ампулах в порошкообразном состоянии и растворяются без предварительного растирания. Представленные гербициды имеют высокую растворимость в воде, наименьший количественный показатель у глифосата. При выборе оптимальных условий пробоподготовки использовался глифосат.

Для ускорения процесса растворения глифосата применялся ультразвук (УЗ), рабочая частота ультразвуковых колебаний 35 кГц. Выбор температуры, рабочего колебания обусловлены возможностями лабораторного оборудования. Температура 60 °С является максимальной для обеих водяных бань (с и без УЗ), температура 30 °С – средняя температура для оборудования и наиболее используемая в лабораторной практике. Визуальное наблюдение осуществлялось каждые 30 минут. Полное растворение глифосата подтверждалось методом ВЭЖХ. Растворимость глифосата при различных условиях представлена в таблице 3.3.

Растворение глифосата при температуре 60 °С проводилось повторно с применением УЗ и без УЗ, визуальное наблюдение осуществлялось каждые 15 минут.

Наименьшее время растворения глифосата без применения УЗ при температуре 60 °С составило 1 час 30 мин, с применением ультразвука – 45 минут.

Таблица 3.3 - Время растворения глифосата при различных условиях

Длительность опыта	Условия проведения опыта			
	30 °С	30 °С УЗ	60 °С	60 °С УЗ
30 минут	в/н ¹⁾	в/н	в/н	в/н
1 час	в/н	в/н	в/н	н/н
1 час 30 минут	в/н	в/н	н/н	-
2 часа	в/н	н/н ²⁾	-	-
2 часа 30 минут	в/н	н/н	-	-
Масса навесок глифосата, г/10 мл	M ₁ = 0,0021	M ₁ = 0,0020	M ₁ = 0,0022	M ₁ = 0,0020
	M ₂ = 0,0022	M ₂ = 0,0021	M ₂ = 0,0021	M ₂ = 0,0021
Концентрация глифосата в водных растворах, метод ВЭЖХ, мг/мл	-	-	C _{1cp} = 0,22 ± 0,007	C _{1cp} = 0,20 ± 0,006
	-	-	C _{2cp} = 0,21 ± 0,006	C _{2cp} = 0,21 ± 0,006
<p>¹⁾ Твердые частицы глифосата визуально наблюдаются.</p> <p>²⁾ Твердые частицы глифосата визуально не наблюдаются.</p>				

3.3 Применение инфузорий при биотестировании на клеточном уровне

В настоящее время инфузории, как тест-объекты, используют специалисты различных областей науки [166 - 170].

Для определения уровня токсичности гербицидов, в качестве тест-объектов было выбрано биотестирование на стилонихиях (*Stylonychia mytilus*) при суточной экспозиции инфузорий. Использование простейших при биотестировании объясняется наличием стандартных методик культивирования, возможностью проверки чувствительности к токсичным

веществам, размножение происходит делением клетки, что обеспечивает генетическую однородность.

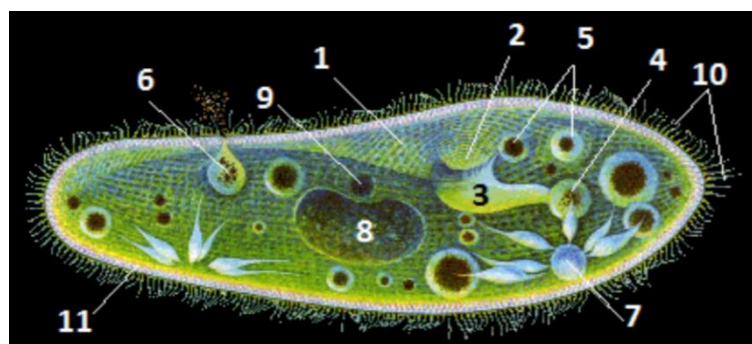
Естественной средой обитания простейших являются почва и водоемы. Инфузории являются важнейшим звеном в пищевых цепях биосферы. Размножаясь в огромных количествах, простейшие влияют на формирование и плодородие почв, на химический состав океанических вод. Изменение количества или уничтожение простейших влияет на естественный биоценоз.

Стилонихии – ресничные инфузории, имеющие наиболее сложное строение, по сравнению с простейшими других классов. Строение инфузории представлено на рисунке 3.1. В ходе изучения характеристики простейших установлено, что в качестве пищи для них служат органические частицы, микроорганизмы и растворенные в окружающей среде питательные вещества. Одноклеточные обладают способностью отличать друг от друга различные пищевые частицы. Однако избирательность такого рода у них редка, когда захватывается только перевариваемая пища. Процесс питания у стилонихий происходит, как за счет фагоцитоза, с образованием пищеварительной вакуоли («клеточное заглатывание»), так и путем поглощения жидкости и ионов поверхностью тела.

При фагоцитозе окологротовые реснички создают направленный ток воды, иногда мощный, который направляет пищевые частицы в сторону цистома. От клеточного рта идет узкий канал – цитофаринкс. Вследствие постоянства формы тела, у инфузории отсутствуют «запасные участки» плазматической мембраны, которые могли бы использоваться при образовании пищевых вакуолей. Поэтому составные части, очень мелкие везикулы, транспортируются из цитоплазмы вдоль лент микротрубочек к цистому. Здесь они сливаются с мембраной пищевой вакуоли, способствуя ее росту. При достижении необходимой величины вакуоль отрывается от глотки, и увлекается круговыми движениями цитоплазмы. Везикулы содержат пищеварительные ферменты, которые попадают таким образом в пищеварительные вакуоли. В процессе

движения в вакуолях происходит переваривание пищи, выделяя источники энергии и питания в цитоплазму [171].

Таким образом, токсичные вещества попадают внутрь клетки двумя способами: заглатыванием клеточным ртом и всасыванием поверхностью тела. Одновременное попадание токсичных веществ в полость клетки дает в биотестировании ряд преимуществ. Во-первых, увеличивается скорость проникновения веществ внутрь клетки. Скорость поглощения пищи и вместительная способность пищеварительной структуры у стилонихий высокая – до 70-80 % объема клетки. Во-вторых, химические изменения веществ, протекающие в процессе пищеварения, могут способствовать увеличению токсичности исследуемого вещества [169].



1 – перистом, 2 – цитостом, 3 – цитофаринкс, 4 – образующая пищеварительная вакуоль, 5 – пищеварительные вакуоли, 6 – порошица, 7 – сократительная вакуоль, 8 – макронуклеос, 9 – микронуклеус, 10 – реснички, 11 – пелликула

Рисунок 3.1 - Строение инфузории

Кроме того, инфузории интересны как тест-организмы вследствие того, что имеют малый жизненный цикл и высокую скорость размножения. Это позволяет оценить воздействие химических веществ на ряд поколений.

В процессе фагоцитоза инфузории способны поглощать как пищевые, так и непищевые частицы. Подобный механизм пищеварения позволяет оценить токсичность как растворимых веществ, так и нерастворимых. Стилонихии обладают высокой чувствительностью к различным химическим веществам при

различных концентрациях. Благодаря относительно большим размерам клеток, этот визуальный метод позволяет оценить состояние простейших, а также является удобным, информативным, недорогим [167].

Простейшие являются эукариотическими организмами, обладающими свойствами отдельного организма. Это качество позволяет результаты, полученные на простейших, с высокой достоверностью сопоставлять с подобными исследованиями, результатами на лабораторных животных [166, 167].

При проведении биотестирования учитывалось физическое состояние клеток на момент исследования. Важным показателем является стадия жизненного цикла инфузории. Установлено [169], что наибольшей чувствительностью к токсичным веществам обладает только что разделившаяся клетка. По мере развития и дальнейшего деления устойчивость клетки к токсичным веществам возрастает до следующего деления.

Для оценки результата биотеста была выбрана реакция ингибирования размножения или гибель инфузорий. Так как, инфузории поглощают все присутствующие в среде обитания растворимые вещества и мелкодисперсные частицы, это позволяет количественно определить ответную реакцию инфузорий на действие различных токсичных веществ [172].

3.4 Определение оптимального числа клеток простейших при биотестировании

Для исследования использовалась суточная культура стилонихий, количество клеток в лунке варьировалось от 2 до 15 штук. Большое количество инфузорий (более 20 шт) в лунке затрудняет подсчет клеток, что делает его недостоверным в ходе дальнейшего исследования.

Определение оптимального числа клеток стилонихий для проведения исследований путем тестирования, проводилось с растворами глифосата и временем экспозиции 24 часа. Для поискового эксперимента были выбраны

концентрации глифосата 120, 140, 160 мг/л, с учетом двукратного разведения концентрации в лунках при биотестировании составляли 60, 70, 80 мг/л.

Опыт показал, что при концентрациях гербицида 70, 80 мг/л единичные клетки инфузорий погибали, при этом происходил полный лизис клеток (таблица 3.4). В объективе не были обнаружены опорного комплекса клетки простейших (пелликулы). При количестве клеток от 5 до 9 шт происходила частичная гибель изучаемых организмов, при большом количестве - увеличивался рост числа клеток практически в 1,5 раза. Данные эксперимента не давали однозначной интерпретации о токсичности гербицидов. При концентрации гербицида 60 мг/л ответная реакция при различной численности стилонихий была одинакова, в среднем рост клеток увеличился вдвое.

Таблица 3.4 - Численность стилонихий в зависимости от концентрации глифосата в растворе (экспозиция 24 часа)

Концентрация глифосата, мг/л	Количество стилонихий в микролунке, шт						
	2	3	5	6	8	9	15
Исходное значение простейших, шт							
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

Исходя из вышеуказанных данных, оптимальное количество клеток для проведения исследования биомониторинга - 6-9 шт.

С целью исключения возможного воздействия УЗ на результаты биотестирования, было проведено предварительное поисковое исследование при следующих условиях: глифосат растворяли с и без применения УЗ, концентрация - 60 мг/л, количество простейших в лунке от 6 до 9 клеток. Результаты исследования представлены в таблице 3.5.

Разные условия растворения глифосата не оказали существенного влияния на результаты биотестирования. Исходя из опытных данных, были выбраны следующие условия растворения гербицидов: время – 45 минут, температура - 60 °С, рабочая частота ультразвуковых колебаний - 35кГц.

Таблица 3.5 - Результаты биотестирования глифосата при различных условиях растворения

Условия растворения глифосата	Количество стилонихий при различном времени экспозиции, шт				
	0 часов	2 часа	6 часов	24 часа	72 часа
Время растворения 45 мин при температуре 60 °С с применением УЗ	6	7	7	11	22
Время растворения 1 час 30 мин при температуре 60 °С без применения УЗ	8	8	9	16	31

Разные условия растворения глифосата не оказали существенного влияния на результаты биотестирования. Исходя из опытных данных, были выбраны следующие условия растворения гербицидов: время – 45 минут, температура - 60 °С, рабочая частота ультразвуковых колебаний - 35кГц.

Для оценки воздействия гербицидов на простейшие учитывались следующие тест-реакции: изменение количества инфузории (выживаемость, размножение). В зависимости от выживаемости стилонихий можно выделить следующие критерии токсичности: «нетоксичный», «токсичный». При выживаемости инфузорий в количестве менее 50% и времени экспозиции 24 часа концентрацию гербицидов следует считать «токсичной», при выживаемости инфузорий в количестве более 50% и суточной экспозиции - «нетоксичной».

В работе для определения уровня токсичности были выбраны следующие химические вещества: клопиралид, глифосат, 2,4-Д. В качестве источников пестицидов использованы государственные стандартные образцы.

3.5 Биотестирование глифосата

Из основного раствора глифосата готовились модельные растворы с концентрациями от 2 до 200 мг/л, с учетом двукратного разбавления концентрации при биотестировании составляли от 1 до 100 мг/л. Изменение количества особей простейших в зависимости от концентрации глифосата и времени экспозиции представлены в таблице 3.6.

Таблица 3.6 - Зависимость изменения количества простейших от времени экспозиции и концентрации гербицида глифосата

Концентрация глифосата, мг/л	Среднее количество стилонихий при различном времени экспозиции, шт				
	0 часов	2 часа	6 часов	24 часа	72 часа
100	6	0	0	0	0
90	6	0	0	0	0
80	7	1	1	2	5
70	8	3	3	5	12
60	8	8	8	15	31
50	9	9	10	19	38
40	6	7	7	14	29
30	7	8	8	16	34
20	6	6	7	14	30
10	8	8	8	19	38
1	7	7	7	17	33
Контроль	7	9	9	16	29

Глифосат при концентрации 90, 100 мг/л показывает высокую токсичность по отношению к инфузориям, происходит полная гибель клеток,

выживаемость составляет 0%. Ингибирующая концентрация (частичная гибель клеток) составляет 70, 80 мг/л при времени экспозиции 24 часа, выживаемость инфузорий составляет 66, 25 % соответственно. Таким образом, концентрацию глифосата 70 мг/л можно интерпретировать «нетоксичной», прирост клеток через 72 часа увеличивался в 1,5 раза.

Минимальная концентрация гербицида, которая не подавляет рост клеток 60 мг/л. При концентрациях глифосата от 10 до 60 мг/л и времени экспозиции 24, 72 часа наблюдается интенсивный рост клеток, в среднем количество клеток увеличилось по сравнению с началом опыта в 4,7 раза (время экспозиции 72 часа).

Количество клеток на конец опыта при концентрации гербицида 1 мг/л и в контрольном опыте составляют одинаковое количество, увеличение в 4,2 раза (время экспозиции 72 часа).

3.6 Определение токсичности 2,4-Д

Путем последовательных разведений из основного раствора 2,4-Д были получены рабочие растворы с содержанием гербицида от 2 до 200 мг/л, концентрации при биотестировании от 1 до 100 мг/л. Изменения числа клеток стилонихий в зависимости от концентрации гербицида 2,4-Д и времени экспозиции представлены в таблице 3.7.

При тестировании растворов гербицида 2,4-Д зафиксированы летальные концентрации от 60 до 100 мг/л, выживаемость составляет 0%. Содержание гербицида 2,4-Д в количестве 50 мг/л также токсично, выживаемость составляет 42,8%. Ингибирующая концентрация, при которой происходит частичная гибель инфузорий, составляет 40 мг/л. В тоже время, данная концентрация не является токсичной, численность клеток при суточной экспозиции увеличивается в 1,3 раза. При дальнейшем исследовании, время проведения опыта 72 часа, наблюдается увеличение клеток в 1,9 раз.

Таблица 3.7 - Зависимость изменения численности инфузорий от времени экспозиции и концентрации гербицида 2,4-Д

Концентрация 2,4-Д, мг/л	Среднее количество стилонихий при различном времени экспозиции, шт				
	0 часов	2 часа	6 часов	24 часа	72 часа
100	8	0	0	0	0
90	8	0	0	0	0
80	8	0	0	0	0
70	7	0	0	0	0
60	6	0	0	0	0
50	7	1	1	3	4
40	8	6	6	10	15
30	8	8	9	16	22
20	6	7	7	12	18
10	9	9	9	18	27
1	7	8	8	14	21
Контроль	8	8	9	15	34

Минимальная концентрация гербицида, которая не подавляет рост клеток - 30 мг/л. При концентрациях от 1 до 30 мг/л и суточной экспозиции численность стилонихий увеличивается в 2 раза. Данное содержание гербицида в водных растворах не является токсичным. Кроме того, при увеличении времени экспозиции до 72 часов наблюдался дальнейший прирост клеток. Количество клеток, по отношению к началу опыта (0 часов) увеличилось в среднем в 2,9 раза. Количество инфузорий в контрольном опыте увеличилось в 4,3 раза.

3.7 Оценка токсичности клопиралида

Клопиралид показывает достаточно высокую токсичность для тест-объекта *Stylonychia mytilus*. Результаты исследования токсичности клопиралида сопоставимы с результатами исследования токсичности 2,4-Д. Результаты проведенного исследования представлены в таблице 3.8.

Таблица 3.8 - Зависимость изменения количества клеток от времени экспозиции и концентрации гербицида клопиралида

Концентрация клопиралида, мг/л	Среднее количество стилонихий при различном времени экспозиции, шт				
	0 часов	2 часа	6 часов	24 часа	72 часа
100	7	0	0	0	0
90	8	0	0	0	0
80	8	0	0	0	0
70	6	0	0	0	0
60	6	0	0	0	0
50	7	3	3	6	9
40	9	8	8	13	20
30	9	9	10	14	20
20	7	7	7	12	21
10	6	7	7	12	20
1	7	7	7	15	23
Контроль	6	6	7	14	24

Растворы с содержанием клопиралида в количестве от 60 до 100 мг/л вызвали полную гибель клеток. Концентрации, подавляющие рост клеток, составляют 40, 50 мг/л. Выживаемость простейших при концентрации 50 мг/л и суточной экспозиции - 86 %, при содержании клопиралида в количестве 40 мг/л наблюдается увеличение количества инфузорий в 1,4 раза. Минимальная концентрация гербицида, которая не ингибирует рост клеток 30 мг/л. При концентрациях от 1 до 30 мг/л и суточной экспозиции увеличение количества стилонихий составляет более чем в 1,6 раза. Из опытных данных можно сделать вывод, что клопиралид при концентрациях менее 50 мг/л и при времени выдержки в течении 24 часов не является токсичным для *Stylonychia mytilus*, при дальнейшем увеличении времени биотестирования увеличение клеток составляет 1,3 раза. При продлении опыта до 72 часов, при концентрациях не ингибирующих рост инфузорий, наблюдался дальнейший прирост клеток.

Количество клеток, по отношению к началу опыта (0 часов) увеличилось в среднем в 2,9 раза. Количество инфузорий в контрольном опыте увеличилось в 4 раза.

3.8 Сравнительная оценка токсичности гербицидов

При сравнении результатов исследований можно сделать вывод, что наибольшую токсичность для выбранных тест-организмов показывают гербициды 2,4-Д и клопиралид. Данные представлены в таблице 3.9.

Таблиц 3.9.- Сравнительная характеристика гербицидов

Показатели для сравнения	Наименование гербицида					
	Глифосат	Контроль	2,4-Д	Контроль	Клопиралид	Контроль
Минимальная концентрация, которая не является токсичной С, мг/л	70	-	40	-	50	-
Минимальная концентрация, которая не ингибирует рост инфузорий C_{min} , мг/л	60	-	30	-	30	-
Среднее увеличение количества клеток при C_{min} и суточной экспозиции	в 2,2 раза	в 2,3 раза	в 2 раза	в 2,8 раза	в 1,8 раза	в 2,9 раза

Среднее увеличение количества инфузорий при концентрации C_{min} , не подавляющей рост простейших, и суточной экспозиции является сопоставимым для всех гербицидов.

Результаты проведенного исследования показывают, что ответная реакция простейших наблюдалась не только в больших, но в малых концентрациях пестицидов. Кроме того, ответная реакция наблюдалась для всех гербицидов различного строения. Это позволяет использовать *Stylonychia mytilus* в качестве тест-объекта для оценки воздействия различных токсичных

веществ на клеточный организм, как при высоких, так и при низких концентрациях.

С учетом опытных данных при биотестировании токсичности водных образцов дальнейшее увеличение концентраций гербицидов не проводилось.

3.9 Влияние гербицидов на размер и форму клеток стилонихий

В ходе проведения опыта при подсчете клеток инфузорий, было выявлено изменение размеров стилонихий. Микроскопические исследования проводили при увеличении окуляра $\times 10$, объектива $\times 40$. Данные представлены на рисунках 3.2, 3.3.

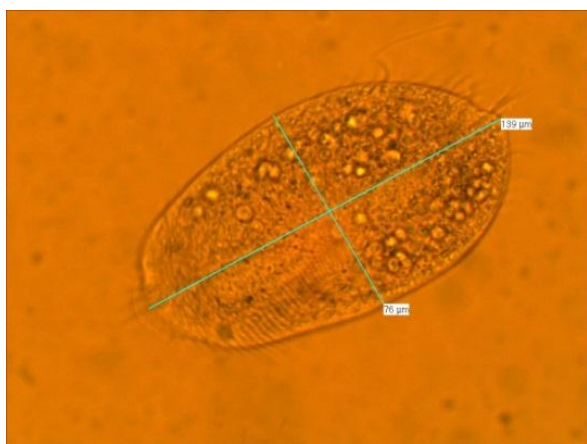


Рисунок 3.2 – Форма и размер клетки инфузории в начале опыта

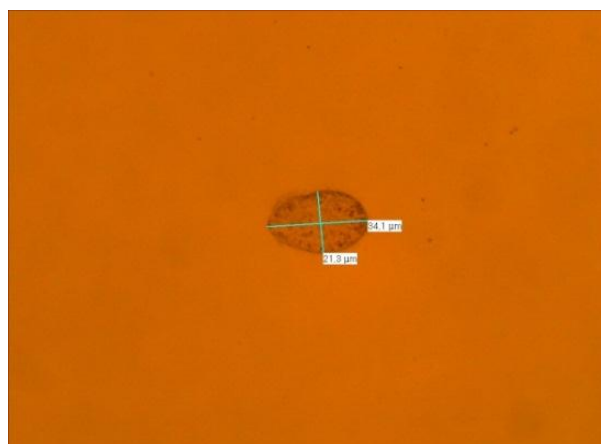


Рисунок 3.3 – Форма и размер клетки инфузории с временем экспозиции 72 часа в глифосате при концентрации 40 мг/л

При подсчете количества клеток в разное время экспозиции было обнаружено, что при времени экспозиции 72 часа в лунках микроаквариума наблюдалось большое количество особей стилонихий в 10 - 15 раз меньше, чем материнские. Изменение размера клеток инфузорий происходило при добавлении всех гербицидов (глифосата, клопиралида, 2,4-Д) при концентрациях от минимальной, не подавляющей рост клеток, и до 1 мг/л.

Особенностью инфузорий является относительно быстрая изменчивость, что позволяет простейшим адаптироваться к различным условиям. В процессе адаптации к условиям среды простейшие перестраивают свои жизненные

функции, что влияет на скорость размножения, движения, форму и размеры тела клетки [173]. Черемных Е.Г., в статье [168] при биотестировании пищевого сырья на инфузориях, отметила морфологические изменения простейших в сторону увеличения размера клеток.

Фосфорорганические соединения (ФОС) способны образовывать комплексы с ферментами, локализованными во внутренней мембране митохондрий. Ингибируя энзимы, ФОС нарушают процесс окислительного фосфорилирования, негативно влияя на процесс дыхания клетки, т.е. нарушается синтез молекул АТФ [174].

В работах [64, 116] изучена ингибирующая активность гербицидов в отношении НАФН-оксидоредуктазы. Установлено, что глифосат содержащие препараты способны неконкурентно ингибировать фермент, уменьшая скорость ферментативной реакции. Клопиралид, входящий в состав коммерческого препарата Лонтрел, способен конкурентно ингибировать редуктазу, с образованием непродуктивного комплекса. В результате, нарушаются биологические окислительные и восстановительные процессы, происходящие в организме (перенос атомов, водорода и электронов). Это приводит к блокировке жизненно важных процессов в клетке. Кроме того авторы показали, что гербициды и их соли способны к комплексообразованию с АТФ и ДНК клетки, проявляя техногенную токсичность. Химические связи в комплексах между гербицидами и ДНК могут вызывать генные мутации. Таким образом, на клеточном уровне токсичность гербицидов выражается в снижении репродуктивной способности инфузорий, энергодефиците в клетке и мутагенном эффекте.

Можно предположить, что гербициды при более высоких концентрациях подавляли энергетический метаболизм и окислительно-восстановительные процессы в клетке, вызывая ее гибель. Более низкие концентрации токсикантов не оказывали летального воздействия. Вследствие адаптивных процессов, в условиях дефицита энергии в организме, стилоухии перестраивали свои

жизненные функции, в результате чего произошло изменение морфологических параметров клетки.

Минимальная концентрация, которая является нетоксичной по отношению к инфузориям, для 2,4-Д и клопиралида составляет 40, 50 мг/л соответственно, для глифосата – 70 мг/л. Таким образом, клопиралид и 2,4-Д являются более токсичными, чем глифосат. Можно предположить, что больший токсический эффект 2,4-Д и клопиралида связан с конкурентным ингибированием фермента с образованием неактивного комплекса.

3.10 Биотестирование почвы

3.10.1 Обоснование выбора гербицида для биотестирования почвы

В ходе проведенного биотестирования гербицидов выявлено, что инфузории обладают ответной реакцией на содержание токсикантов, находящихся в различных концентрациях. В связи с этим представляет интерес о возможности использования *Stylonychia mytilus* в качестве тест-объекта для оценки токсичности почвы зараженной гербицидом.

Ранее, в п. 3.1 расчетным путем было определено содержание гербицидов в почве. При применении в сельскохозяйственной практике глифосата и 2,4-Д содержание их в почве превышает «нетоксичные» концентрации в 3 - 4 и 4 – 7 раз соответственно. Содержание клопиралида в почве, при добросовестной практике с учетом требований к применению, сопоставимо с «нетоксичной» концентрацией.

ФГБУ «Россельхозцентр» опубликовало данные [175] о наиболее востребованных гербицидсодержащих препаратах в России в 2018 году. Из пяти коммерческих препаратов три содержат глифосат в качестве активного ингредиента, а один - 2,4-Д. По общему объему использования глифосатсодержащие препараты почти вдвое превышают объем использования 2,4-Д.

Длительное применение 2,4-Д способствовало изменению видового сообщества сорных растений. В результате естественной селекции в регионах южнее Московской области из 30 наиболее часто встречающихся сорняков 19 устойчивы к 2,4-Д. Таким образом, в России есть регионы, где применять 2,4-Д либо не целесообразно, либо его применяют в смесях с другими гербицидами [176]. В тоже время, глифосатсодержащие препараты являются неселективными. Его применяют в паровых полях, при вводе залежных земель и непосредственно перед посевом. Для повышения эффективности препарата его можно использовать несколько раз в сезон. Кроме того, глифосат применяют в качестве десиканта в предуборочный период [177]. Агентство по охране окружающей среды США (US EPA) классифицирует его как «мало токсичен», что также способствует более широкому применению гербицида. Дальнейшее биотестирование почвы проводили с использованием глифосата.

3.10.2 Биотестирование почвы различного гранулометрического состава

Анализ литературных данных показал, что взаимосвязь глифосата с почвой сложна, варьируется от почвы к почве. Глифосат растворим в воде, но он так же связывается с частицами почвы при определенных условиях, особенно в глинах. Гербицид способен взаимодействовать с катионами поливалентных металлов, образуя комплексы (хемосорбция), либо взаимодействовать с разнородной поверхностью твердой фазы почвы в результате молекулярной сорбции (физическое поглощение). Поэтому глифосат может вымываться водой из песчаных почв или годами храниться в почвах с высоким содержанием глины. Даже связанный с частицами почвы, он может диссоциировать назад в грунтовые воды позже, а также быть доступным для коневой системы растений, оказывая губительное воздействие, либо накапливаться в частях растений.

На основании литературного обзора представляет интерес проведение биотестирования почвы различного гранулометрического состава. Опытные

образцы почвы предоставлены ФГБУ «Тверская МВЛ», механический состав почвы определялся по ГОСТ 12536-2014 «Грунты. Методы лабораторного определения гранулометрического (зернового) и микроагрегатного состава».

По агрохимическим показателям образцы представляют собой три типа почвы:

- I тип почвы дерново-среднеподзолистая легкосуглинистая, наиболее часто встречающийся тип почвы в сельском хозяйстве при возделывании культурных растений, содержание физической глины 28,1 %;

- II тип почвы супесчаная, по гранулометрическому составу представляет собой осадочную горную породу, содержание физической глины 15,8 %;

- III тип почвы, содержащая процент глинистых включений 57,2 %, легкоглинистая.

Биотестирование проводилось на образцах почвы, зараженной глифосатом с концентрацией 200 мг/кг. Результаты исследований водных вытяжек, полученных из легко суглинистой почвы, представлены в таблице 3.10.

Таблица 3.10 - Численность стилонихий при биотестировании почвы I типа

Времени выдержки почвы на водяной бане, ч	Среднее количество стилонихий при различном времени экспозиции, шт				
	0 часов	2 часа	6 часа	24 часа	72 часа
1	8	8	8	14	27
2	6	7	7	10	19
3	9	9	10	15	27
Контроль 1	6	6	6	13	22
Контроль 2**	7	7	8	15	28

* - Контрольная лунка с дистиллированной водой.
** - Контрольная лунка с водной вытяжкой почвы, свободной от глифосата.

Согласно экспериментальным данным, численность стилонихий при суточной экспозиции в опытных образцах в среднем увеличилась в 1,6 раз, в контрольных - в 2 раза. При увеличении времени экспозиции до 72 часов происходит интенсивный рост инфузорий как в опытных, так и контрольных образцах.

Результаты исследований водных вытяжек, приготовленных из супесчаной почвы, представлены в таблице 3.11.

Таблица 3.11 - Количество простейших при биотестировании почвы II типа

Времени выдержки почвы на водяной бане, ч	Среднее количество стилонихий при различном времени экспозиции, шт				
	0 часов	2 часа	6 часа	24 часа	72 часа
1	6	7	7	10	20
2	7	7	9	12	24
3	7	7	8	11	23
Контроль 1*	9	10	10	18	31
Контроль 2**	8	8	10	17	26

* - Контрольная лунка с дистиллированной водой.
 ** - Контрольная лунка с водной вытяжкой почвы, свободной от глифосата.

При исследовании водных вытяжек супесчаной почвы получены следующие результаты. Прирост клеток при суточной экспозиции в опытных образцах увеличился в среднем 1,7 раза, в контрольных – в 2 раза. Дальнейшее увеличение времени эксперимента способствовало интенсивному росту клеток.

Опытные данные при биотестировании легкоглинистой почвы, представлены в таблице 3.12.

Таблица 3.12 - Численность инфузорий при биотестировании почвы III типа

Времени выдержки почвы на водяной бане, ч	Среднее количество стилонихий при различном времени экспозиции, шт				
	0 часов	2 часа	6 часа	24 часа	72 часа
1	8	8	9	13	28
2	6	7	7	10	20
3	6	6	6	11	20
Контроль 1*	6	6	8	11	21
Контроль 2**	8	8	9	14	28

* - Контрольная лунка с дистиллированной водой.
 ** - Контрольная лунка с водной вытяжкой почвы, свободной от глифосата.

Аналогичные результаты были получены при биотестировании легкоглинистой почвы. Численность клеток в опытных образцах увеличилась в 1,7 раз, в контрольных – 1,8 раз при времени проведения опыта 24 часа. При времени экспозиции 72 часа, также наблюдался интенсивный рост инфузорий.

Опытные данные, полученные в ходе биотестирования, наглядно показывают, что почвы различного гранулометрического состава с концентрацией глифосата 200 мг/ кг не являются токсичными. В тоже время, предполагаемая концентрация гербицида в водной вытяжке при биотестировании почв составляла 200 мг/л, с учетом двукратного разбавления 100 мг/л, которая является токсичной, согласно ранее проведенным исследованиям.

3.10.3 Алгоритмы подготовки проб водных вытяжек почв и биотестирование на инфузориях

Культивирование простейших, способы подготовки проб водных вытяжек, биотестирование, изложенные в предыдущих разделах, сформулированы, и представлены в алгоритмах подготовки проб (рисунок 3.4).

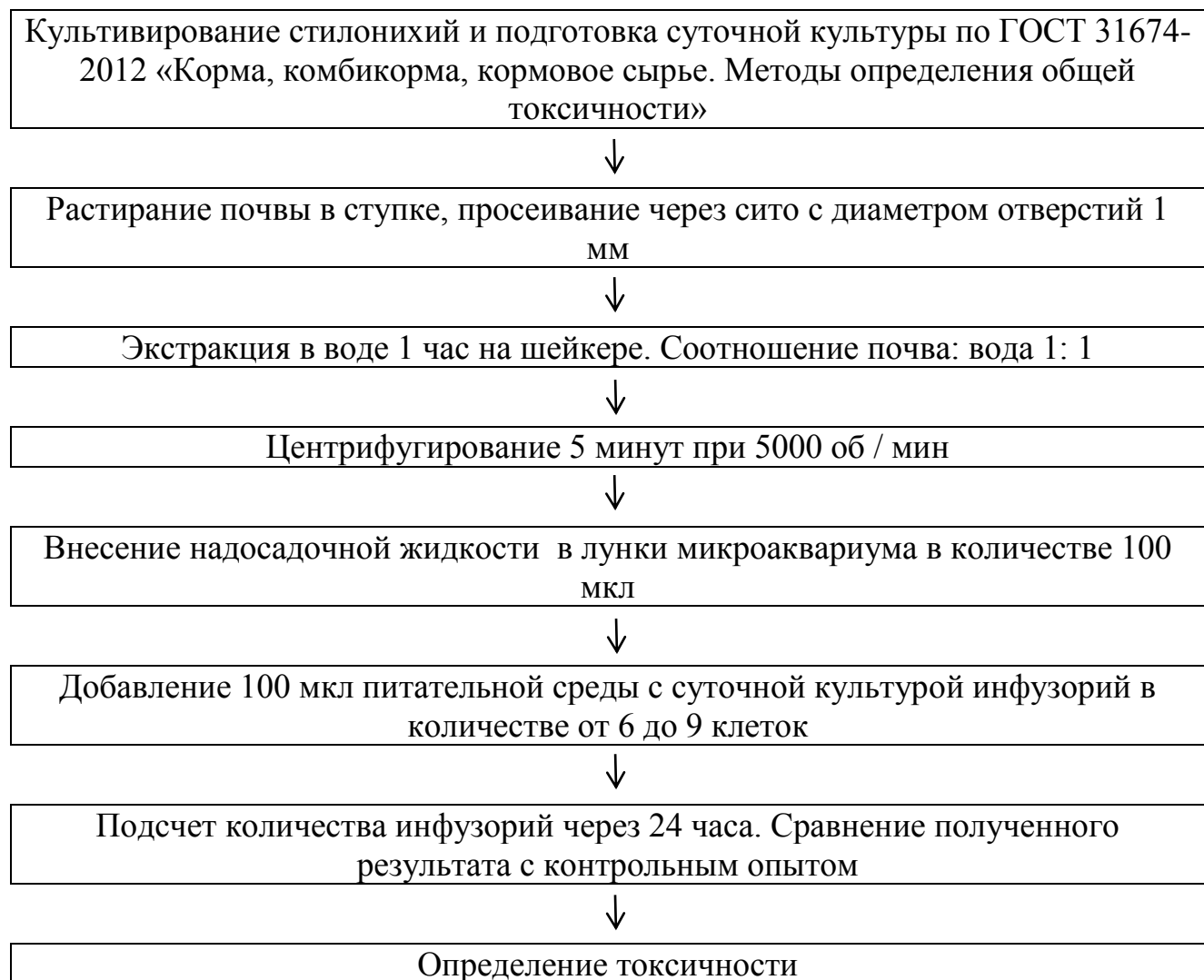


Рисунок 3.4 – Алгоритм подготовки водных вытяжек почвы и биотестирования

3.10.4 Определение концентрации глифосата в вытяжках методом ВЭЖХ

Для дальнейшего проведения исследования были приготовлены повторно водные вытяжки со всех типов почв, зараженных глифосатом при концентрации 200 мг/кг, и различном времени экспозиции. Количественное определение глифосата в водных вытяжках проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в обращено-фазовом режиме с флуоресцентным детектором. Результаты представлены в таблице 3.13.

Экспериментальные данные показали, что благодаря способности почвы связывать гербицид, концентрация глифосата, в результате диссоциации в

водные вытяжки, не является токсичной. С учетом двукратного разбавления вытяжки при биотестировании, ответная реакция простейших в опытных образцах практически совпадала с ответной реакцией инфузорий в контрольных образцах при постановки опыта в течении 24 часов.

Таблица 3.13 - Содержание глифосата в водных вытяжках

Тип почвы	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 на 1 кг почвы составляет от 200 до 600 мг, 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. Результаты биотестирования представлены в таблице 3.14.

При анализе экспериментальных данных видно, что в условиях данного опыта и с учетом высокой сорбционной способности глифосата, ответная реакция стилонихий наблюдается при концентрации гербицида в почве от 600 мг/кг.

Таблица 3.14 - Численность простейших при биотестировании почв

Тип почвы	Содержание глифосата в почве, мг/кг	Численность клеток (шт) при времени экспозиции, (ч)				
		0	2	6	24	72
Легко суглинистая	400	8	8	10	14	22
	600	8	5	5	7	12
Контроль 1*	-	7	7	8	15	23
Контроль 2**	-	6	6	8	14	29
Супесчаная	400	7	7	9	13	21
	600	9	5	5	7	14
Контроль 1*	-	9	9	10	18	33
Контроль 2**	-	8	8	10	15	28
Легкоглинистая	400	7	7	7	13	22
	600	9	6	6	7	12
Контроль 1*	-	8	8	8	16	23
Контроль 2**	-	6	7	8	14	31

* - Контрольная лунка с дистиллированной водой.
 ** - Контрольная лунка с водной вытяжкой почвы, свободной от глифосата.

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

При биотестировании почвы с содержанием гербицида 600 мг/кг, время эксперимента 24 часа, 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. При дальнейшем проведении опыта во все лунках наблюдался прирост клеток.

На основании экспериментальных данных можно сделать вывод, что глифосат при содержании в почве на уровне 600 мг/кг оказывает ингибирующее воздействие на развитие инфузорий. Кроме того, при биотестировании почвы при различных концентрациях (200, 400, 600 мг/кг) наблюдались морфологические изменения дочерних клеток инфузорий в сторону уменьшения размеров.

По расчетам, в зависимости от назначения поля, разовое внесение гербицида может составлять от 313 до 833 мг/кг. В условиях современной сельскохозяйственной практики, при ежегодном и многократном применении гербицида (до двух раз в сезон), а также зависимости количества применяемых препаратов от погодных условий, содержание глифосата в почве увеличивается в несколько раз.

3.11 Изучение влияния глифосата на микробное сообщество почвы и торфонавозной смеси

Для обработки почвы и торфонавозной смеси использовали минимальную и максимальную рабочие концентрации глифосата, используемые в сельском хозяйстве. Содержание гербицида в почве и смеси составляло 200, 400, 600 мг/кг. В качестве контрольных образцов использовали почву и смесь свободные от гербицида.

Остатки гербицидов в почве относят к загрязняющим веществам, но их влияние на почвенные бактерии малоизучено. Интересно изучение воздействия глифосата на микробное биоразнообразие в почве и торфонавозной смеси. Исследование торфонавозной смеси проводилось с учетом видового разнообразия микробного сообщества.

В целях максимально возможного получения видового разнообразия почвенной микроорганизмов на первой стадии процесса почву и смесь инкубировали 48 часов при температуре $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. Микробиологическое исследование почвы и смеси проводили согласно [178].

При анализе посевов, опытных и контрольных образцов, торфонавозной смеси наблюдается активный (сплошной) рост многих представителей мезофильных микроорганизмов. Микробное сообщество было представлено бактериями семейства *Enterococcaceae*, *Escherichia coli*, плесневыми грибами 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 небольшим количеством колоний плесневые грибы рода *Aspergillus spp.*, единичными колониями *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. В результате процесса пастеризации часть микробного сообщества погибло, включая патогенную микрофлору. Установление пастеризационного периода в процессе ускоренной твердофазной ферментации способствовало уменьшению общей численности микроорганизмов в смеси. Микробное сообщество почвы и смеси 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 ферментирования приведен в таблице 3.15.

Опытные данные показывают, что глифосат при различных концентрациях не оказывал выраженной негативной реакции на видовой состав и численность микроорганизмов. Подобное воздействие на микробное сообщество представлено в ряде исследований [69, 179]. Горленко М.В. В работе [69] отмечается, что глифосат в количестве от 0,5 до 50 мг/кг в опытных

образцах почвы не оказывал токсического воздействия по отношению к сообществу почвенных микроорганизмов.

Таблица- 3.15 - 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
	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 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
	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 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.		

С учетом ранее полученных данных при биотестировании почвы, и определения содержания глифосата в водной вытяжке, можно предположить,

что свободный глифосат в остаточных количествах не оказывал негативного воздействия на микробное сообщество почвы и торфонавозной смеси. Кроме того, в работах [38, 39, 180] представлены данные о способности бактерий рода *E. coli*, *Proteus*, *Bacillus spp.* к биодegradации фосфорорганических гербицидов. Кононова С.В. [180] описала механизм разрушения фосфорорганических соединений по С-Р лиазному пути различными штаммами *E. coli*.

3.12 Лабораторная мышь как тест-объект при биотестировании на организменном уровне

Исследования при помощи лабораторных животных является одним из важнейших видов исследований. Существует широкий спектр животных для научных (лабораторных) экспериментов, который включает млекопитающих (крысы, мыши, хомяки, кошки, собаки, свиньи, морские свинки, приматы), лягушек, птиц и др. Исследования на организменном уровне позволяют определить воздействия токсикантов на отдельные органы, организм в целом, а также возможность наблюдать за несколькими поколениями животных при постановке опыта [181].

Классическими тест-объектами для лабораторного биомоделирования являются мыши. Использование лабораторных мышей объясняется наличием стандартных требований к размещению, содержанию и уходу за лабораторными грызунами, используемых в экспериментальных целях. Лабораторная мышь обладает высоким уровнем метаболизма (обменом веществ), малой массой тела, высокой интенсивностью развития организма. Кроме того, грызуны адаптируются к условиям жизни в неволе, дают многочисленное потомство, отличаются непродолжительным сроком беременности и выкармливания детенышей [182]. При постановке опыта с помощью лабораторных мышей можно визуально наблюдать поведенческие реакции животных без причинения беспокойства.

Выведение инбредных (чистых) линий лабораторных грызунов позволило проводить исследования по выявлению наследственных нарушений функций организма, и выявлять основные закономерности болезни, характерные для животных, в том числе и для человека [181, 183].

3.13 Изучение влияния-остаточных количеств глифосата на лабораторных животных

Следующим этапом работы было определение хронической токсичности глифосата путем биотестирования на белых мышах. Присутствие глифосата в остаточных количествах в продуктах питания и кормах для животных объясняет актуальность изучения воздействия остаточного количества гербицида на млекопитающих.

Хроническую токсичность гербицида исследовали на лабораторных животных, содержащихся по схеме № 1, 2. На первом этапе животные были распределены на 16 групп, и помещались в индивидуальные клетки следующим образом: четыре клетки по 3 самца, двенадцать клеток по 3 самки. Схема №1 кормления и содержания животных представлена в таблице 3.16. Вода подавалась из поилок, кормление осуществлялось раз в сутки без ограничения.

Таблица 3.16 - Схема №1 кормления и содержания животных

№ клетки	Схема содержания животного	Схема кормления
1	Самцы	Зерно овса, необработанное препаратом
2	Самцы	Зерно овса, обработанное препаратом (7 мг/кг)
3	Самцы	Зерно овса, обработанное препаратом (14 мг/кг)
4	Самцы	Зерно овса, обработанное препаратом (28 мг/кг)
5-7	Самки	Зерно овса, необработанное препаратом
8-10	Самки	Зерно овса, обработанное препаратом (7 мг/кг)
11-13	Самки	Зерно овса, обработанное препаратом (14 мг/кг)
14-16	Самки	Зерно овса, обработанное препаратом (28 мг/кг)

На втором этапе исследования мыши были распределены на 12 групп (семей) и помещены в индивидуальные клетки. Схема кормления № 2 представлена в таблице 3.17. Вода подавалась из поилок, кормление осуществлялось раз в сутки без ограничения.

Таблица 3.17 - Схема №2 кормления и содержания животных

№ клетки	Схема содержания животного	Схема кормления
К(1)	1 самец, 3 самки	Зерно овса необработанное глифосатом
К(2)	1 самец, 3 самки	Зерно овса необработанное глифосатом
К(3)	1 самец, 3 самки	Зерно овса необработанное глифосатом
7(1)	1 самец, 3 самки	Зерно овса, содержание гербицида 7 мг/кг
7(2)	1 самец, 3 самки	Зерно овса, содержание гербицида 7 мг/кг
7(3)	1 самец, 3 самки	Зерно овса, содержание гербицида 7 мг/кг
14(1)	1 самец, 3 самки	Зерно овса, содержание гербицида 14 мг/кг
14(2)	1 самец, 3 самки	Зерно овса, содержание гербицида 14 мг/кг
14(3)	1 самец, 3 самки	Зерно овса, содержание гербицида 14 мг/кг
28(1)	1 самец, 3 самки	Зерно овса, содержание гербицида 28 мг/кг
28(2)	1 самец, 3 самки	Зерно овса, содержание гербицида 28 мг/кг
28(3)	1 самец, 3 самки	Зерно овса, содержание гербицида 28 мг/кг

На всем протяжении эксперимента гибель мышей не зарегистрирована. За время проведения опыта животные всех групп были активные, хорошо поедали корм. Клиническая картина у мышей не имела признаков отравления, изменения в поведении животных не наблюдалось.

3.13.1 Изучение влияния гербицида на репродуктивную систему мышей

Фертильность мышей в контрольных и опытных подгруппах существенно отличались. Рождение первого потомства в контрольных подгруппах зарегистрировано в период от 20-23 дней после начала второго этапа

эксперимента. Количество детенышей варьировало от 6 до 9 особей, выживаемость потомства составляло 100%. Жизнеспособное потомство самки опытной группы представлено на рисунке 3.5.



Рисунок 3.5 - Потомство самки из клетки № 14(2)

В ходе исследования было отмечено снижение фертильности и жизнеспособности потомства опытных животных по сравнению с контрольными. В подгруппе лабораторных животных, кормление которых осуществлялось зерном овса, содержащим гербицид 7 мг/кг, потомство воспроизвела одна самка. Количество детенышей в потомстве зафиксировано 6 особей, продолжительность жизни составила от 1 до 3 дней, период до воспроизводства потомства составил 68 дней, с задержкой от 48 до 46 дней по сравнению с контрольной подгруппой лабораторных животных.

При наблюдении за лабораторными животными, кормление которых осуществлялось зерном овса, содержащим глифосат 14 мг/кг, зарегистрированы следующие данные. Потомство воспроизвела одна самка, количество детенышей в потомстве составило 7 особей, продолжительность жизни от 1 до 4 дней, период до воспроизводства потомства составил 80 дней, с задержкой от

60 до 58 дней по сравнению с контрольной подгруппой лабораторных животных. Гибель потомства составляла 100 процентов.

В ходе дальнейшего исследования при патологоанатомическом вскрытии обнаружено 7 эмбрионов в рогах матки самки, кормление которой осуществлялось зерном овса, содержащим глифосат 28 мг/кг. Вскрытие данного животного осуществляло по истечении 5 месяцев после начала второго этапа эксперимента.

В результате выполненных исследований изучено действие хронической интоксикации гербицида глифосат на репродуктивную систему белых мышей. Установлено, что гербицидная интоксикация вызывает угнетение функции репродуктивной системы опытных животных, негативно воздействует на жизнеспособность потомства. Продолжительность жизни потомства в опытной группе лабораторных животных составляла от 1 до 4 дней.

3.13.2 Изучение влияния гербицида на органы мышей

В ходе эксперимента осуществлялся ежедневный визуальный осмотр состояния животных, проводилось наблюдение поведенческих реакций. Клиническая картина у мышей не имела признаков отравления, изменения в поведении животных не наблюдалось. При патологоанатомическом вскрытии мышей, перенесших хроническую интоксикацию, наблюдались основные изменения печени, тонкого и толстого отделов кишечника. Результаты патологоанатомического вскрытия представлены в таблице 3.18. Вскрытие животных и патологоанатомическое исследование проводилось согласно рекомендациям [164]. При осмотре паренхиматозных органов учитывались следующие параметры: положение органа, цвет, консистенция, размер, форма, рисунок поверхности.

Таблица 3.18 - Описание паренхиматозных органов

Номер опыта	Печень	Почки	Селезенка	Тонкий и толстый отделы кишечника
Контрольный опыт	Бордово-коричневого цвета, консистенция упругая, края тонкие, орган естественного размера, капсула легко снимается, рисунок строения на поверхности и при разрезе отчетливо виден	Бобовидной формы, светло вишневого цвета, капсула хорошо отделяется, на разрезе гладкая паренхима, граница мозгового и коркового слоев отчетливо видна без видимых изменений, накопления жировой ткани умеренные	Ланцетовидной формы, края острые, капсула легко снимается	Серозная оболочка тонкого отдела кишечника кремового цвета, толстого отдела кишечника кремового цвета, слоистость строения хорошо просматривается, слизистая оболочка светло розового цвета, упругая, без видимых изменений
4 месяца				
Зерно овса, обработанное препаратом (7 мг/кг)	Капсула печени хорошо отделяется. Печень коричневого цвета, консистенция дряблая, края закруглены, размер существенно	Почки бобовидной формы, светло вишневого цвета. Граница мозгового и коркового слабо различимы. Поверхность разреза сочная, светло вишневого цвета. Накопления жировой ткани в капсуле умеренные	Селезёнка правильной формы, уменьшена в размерах капсула вишневого цвета. Консистенция дряблая. Поверхность разреза ровная.	Стенка тонких отделов кишечника упругая. Серозная оболочка его светло серого цвета. Слизистая оболочка слегка набухшая, светло коричневого цвета, без повреждения целостности.

Продолжение таблицы 3.18

Номер опыта	Печень	Почки	Селезенка	Тонкий и толстый отделы кишечника
	не изменился, рисунок строения с поверхности и на разрезе различим. Соскоб с поверхности разреза обильный, вязкий коричневого цвета		Рисунок строения различим. Соскоб скудный	Стенка толстого кишечника не истончена, не просматривается слоистость её строения, слизистая оболочка без повреждения целостности, светло коричневого цвета
Зерно овса, обработанное препаратом (14 мг/кг)	Капсула печени хорошо отделяется. Печень светло коричневого цвета, консистенция дряблая, края закруглены, размер существенно не изменился. Рисунок строения с поверхности и на разрезе	Почки шаровидной формы, светло вишневого цвета. Граница мозгового и коркового не различимы. Поверхность разреза сочная, светло вишневого цвета. Накопления жировой ткани в капсуле умеренные	Селезёнка правильной формы, уменьшена в размерах капсула вишневого цвета. Консистенция дряблая. Поверхность разреза ровная. Рисунок строения различим. Соскоб скудный	Стенка тонких отделов кишечника упругая. Серозная оболочка его светло серого цвета. Слизистая оболочка слегка набухшая, светло коричневого цвета, без повреждения целостности. Стенка толстого кишечника истончена, не просматривается слоистость её

Продолжение таблицы 3.18

Номер опыта	Печень	Почки	Селезенка	Тонкий и толстый отделы кишечника
	различим. Соскоб с поверхности разреза обильный, вязкий коричневого цвета			строения, слизистая оболочка без повреждения целостности, светло коричневого цвета
Зерно овса, обработанное препаратом (28 мг/кг)	Капсула печени хорошо отделяется. Печень светло коричневого цвета, консистенция дряблая, края закруглены, размер существенно не изменился. Рисунок строения с поверхности и на разрезе различим. Соскоб с поверхности разреза обильный,	Почки шаровидной формы, светло вишневого цвета. Граница мозгового и коркового не различимы. Поверхность разреза сочная, светло вишневого цвета. Накопления жировой ткани в капсуле умеренные	Селезёнка правильной формы, уменьшена в размерах капсула вишневого цвета. Консистенция дряблая. Поверхность разреза ровная. Рисунок строения различим. Соскоб скудный	Стенка тонких отделов кишечника дряблая. Серозная оболочка его серого цвета. Слизистая оболочка набухшая, светло коричневого цвета, местами слущивается. Стенка толстого кишечника истончена, не просматривается слоистость её строения, слизистая оболочка местами слущивается, светло

Продолжение таблицы 3.18

Номер опыта	Печень	Почки	Селезенка	Тонкий и толстый отделы кишечника
	вязкий коричневого цвета			коричневого цвета
6 месяцев				
Зерно овса, обработанное препаратом (7 мг/кг)	Капсула печени хорошо отделяется. Печень светло коричневого цвета, консистенция дряблая, края закруглены, размер существенно не изменился. Рисунок строения с поверхности и на разрезе не различим. Соскоб с поверхности разреза обильный, вязкий коричневого цвета	Почки шаровидной формы, светло коричневого цвета. Граница мозгового и коркового не различимы. Поверхность разреза сухая, светло коричневого цвета. Накопления жировой ткани в капсуле отсутствуют	Селезёнка правильной формы, уменьшена в размерах. Консистенция дряблая. Поверхность разреза вогнутая. Рисунок строения различим. Соскоб скудный	Стенка тонких отделов кишечника дряблая. Серозная оболочка его серого цвета. Слизистая оболочка набухшая, светло коричневого цвета, местами слущивается. Стенка толстого кишечника истончена, не просматривается слоистость её строения, слизистая оболочка местами слущивается, светло коричневого цвета
Зерно овса,	Капсула	Почки шаровидной	Селезёнка	Стенка тонких

Продолжение таблицы 3.18

Номер опыта	Печень	Почки	Селезенка	Тонкий и толстый отделы кишечника
обработанное препаратом (14 мг/кг)	печени хорошо отделяется. Печень светло коричневого цвета, консистенция дряблая, края закруглены, размер существенно не изменился. Рисунок строения с поверхности и на разрезе не различим. Соскоб с поверхности разреза обильный, вязкий коричневого цвета	формы, светло коричневого цвета. Граница мозгового и коркового не различимы. Поверхность разреза сухая, светло коричневого цвета. Накопления жировой ткани в капсуле отсутствуют	правильной формы, уменьшена в размерах. Консистенция дряблая. Поверхность разреза вогнутая. Рисунок строения различим. Соскоб скудный	отделов кишечника дряблая. Серозная оболочка его серого цвета. Слизистая оболочка набухшая, светло коричневого цвета, местами слущивается. Стенка толстого кишечника истончена, не просматривается слоистость её строения, слизистая оболочка местами слущивается, светло коричневого цвета
Зерно овса, обработанное препаратом (28 мг/кг)	Капсула печени хорошо отделяется. Печень светло коричневого	Почки шаровидной формы, светло коричневого цвета. Граница мозгового и коркового не различимы.	Селезёнка правильной формы, уменьшена в размерах. Консистенция	Стенка тонких отделов кишечника дряблая. Серозная оболочка его серого цвета.

Продолжение таблицы 3.18

Номер опыта	Печень	Почки	Селезенка	Тонкий и толстый отделы кишечника
	цвета, консистенция дряблая, края закруглены, размер существенно не изменился. Рисунок строения с поверхности и на разрезе не различим. Соскоб с поверхности разреза обильный, вязкий коричневого цвета	Поверхность разреза сухая, светло коричневого цвета. Накопления жировой ткани в капсуле отсутствуют	дряблая. Поверхность разреза вогнутая. Рисунок строения различим. Соскоб скудный	Слизистая оболочка набухшая, светло коричневого цвета, местами слущивается, на подслизистом слое имеются отдельные точечные кровоизлияния. Стенка толстого кишечника истончена, не просматривается слоистость её строения, слизистая оболочка местами слущивается, светло коричневого цвета

В ходе патологоанатомического исследования наибольшие изменения обнаружены в печени, тонком и толстом отделе кишечника. У лабораторных животных контрольного опыта паренхиматозные органы соответствуют здоровому животному. Печень без видимых изменений, цвет - бордово-коричневый, консистенция – упругая, края тонкие, естественного размера. Серозная оболочка тонкого и толстого отделов кишечника кремового цвета,

слоистость строения хорошо просматривается, слизистая оболочка светло розового цвета, консистенция упругая, без видимых изменений. У всех опытных лабораторных животных при визуальном осмотре наблюдалось изменение цвета, консистенции печени и кишечника. Печень слегка увеличена, края слегка закруглены, ровные, четкие, цвет – светло коричневый, консистенция – дряблая. Стенки тонкого и толстого отделов кишечника серого цвета, консистенция дряблая, слизистая оболочка светло коричневого цвета, циркулярно расположенные складки не просматриваются, местами слизистая оболочка слущивается. 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.

3.13.3 Изучение гематоксичности глифосата

В дальнейшем были проведены микроскопические исследования препаратов крови. Результаты подсчета форменных элементов крови представлены в таблице 3.19. За средний показатель состава крови у здоровых животных приняты справочные данные [184].

Таблица 3.19 - Результаты подсчета форменных клеток крови

Время исследования	4 месяца		6 месяцев	
	Количество эритроцитов (млн)	Количество лейкоцитов (тыс)	Количество эритроцитов (млн)	Количество лейкоцитов (тыс)
Номер образца крови	Средний показатель: 9,5; предел колебаний: 8,0-11,0	Средний показатель: 9,5; предел колебаний: 6,0-13,0	Средний показатель: 9,5; предел колебаний: 8,0-11,0	Средний показатель: 9,5; предел колебаний: 6,0-13,0
К(1)-1	9,16	7,0	8,91	7,8

Продолжение таблицы 3.19

Время исследования	4 месяца		6 месяцев	
	Количество эритроцитов (млн)	Количество лейкоцитов (тыс)	Количество эритроцитов (млн)	Количество лейкоцитов (тыс)
Номер образца крови	Средний показатель: 9,5; предел колебаний: 8,0-11,0	Средний показатель: 9,5; предел колебаний: 6,0- 13,0	Средний показатель: 9,5; предел колебаний: 8,0- 11,0	Средний показатель: 9,5; предел колебаний: 6,0- 13,0
К(1)-2	9,03	6,6	9,15	6,5
К(2)-1	8,09	7,7	9,01	7,05
К(2)-2	10,05	8,0	9,2	6,93
К(3)-1	8,37	7,4	9,16	7,31
К(3)-2	9,0	6,4	9,75	7,21
Среднее значение	8,95	7,18	9,2	7,13
7(1)-1	6,42	4,6	5,35	2,6
7(1)-2	7,37	5,23	6,23	2,8
7(2)-1	7,18	4,8	5,28	2,2
7(2)-2	6,2	4,89	6,08	1,95
7(3)-1	6,54	5,62	5,67	2,39
7(3)-2	7,4	4,93	5,43	2,53
Среднее значение	6,85	5,01	5,67	2,41
14(1)-1	6,0	5,4	5,25	2,8
14(1)-2	5,37	4,4	4,3	1,9
14(2)-1	5,18	4,2	4,05	1,6
14(2)-2	6,26	5,8	5,57	3,6
14(3)-1	5,98	5,21	5,31	3,21
14(3)-2	5,54	5,14	5,0	2,98

Продолжение таблицы 3.19

Время исследования	4 месяца		6 месяцев	
	Количество эритроцитов (млн)	Количество лейкоцитов (тыс)	Количество эритроцитов (млн)	Количество лейкоцитов (тыс)
Номер образца крови	Средний показатель: 9,5; предел колебаний: 8,0-11,0	Средний показатель: 9,5; предел колебаний: 6,0-13,0	Средний показатель: 9,5; предел колебаний: 8,0-11,0	Средний показатель: 9,5; предел колебаний: 6,0-13,0
Среднее значение	5,72	5,03	4,91	2,68
28(1)-1	5,03	4,6	5,01	2,0
28(1)-2	5,31	4,68	4,21	2,9
28(2)-1	4,91	4,4	3,03	1,4
28(2)-2	5,40	4,86	2,75	2,4
28(3)-1	5,2	4,31	3,83	1,6
28(3)-2	4,98	3,95	3,68	1,4
Среднее значение	5,14	4,47	3,75	1,95

Данные опыта показали количественное изменение форменных клеток периферической крови. Уменьшение количества лейкоцитов в крови. Лейкопения, наблюдается у животных в ходе всего опыта. Токсическое воздействие гербицида выразилось в подавлении лимфоцитобразования. Результаты опыта представлены на рисунке 3.6.

Среднее уменьшение количества лейкоцитов в крови в группе у животных кормление, которых осуществлялось зерном с содержанием гербицида 7 мг/кг, составило 30% и 66% через 4 и 6 месяцев соответственно, у животных кормление, которых осуществлялось зерном с содержанием

гербицида 14 мг/кг, составило 30% и 62% через 4 и 6 месяцев соответственно, у животных кормление, которых осуществлялось зерном с содержанием гербицида 28 мг/кг, составило 38% и 73% через 4 и 6 месяцев соответственно.

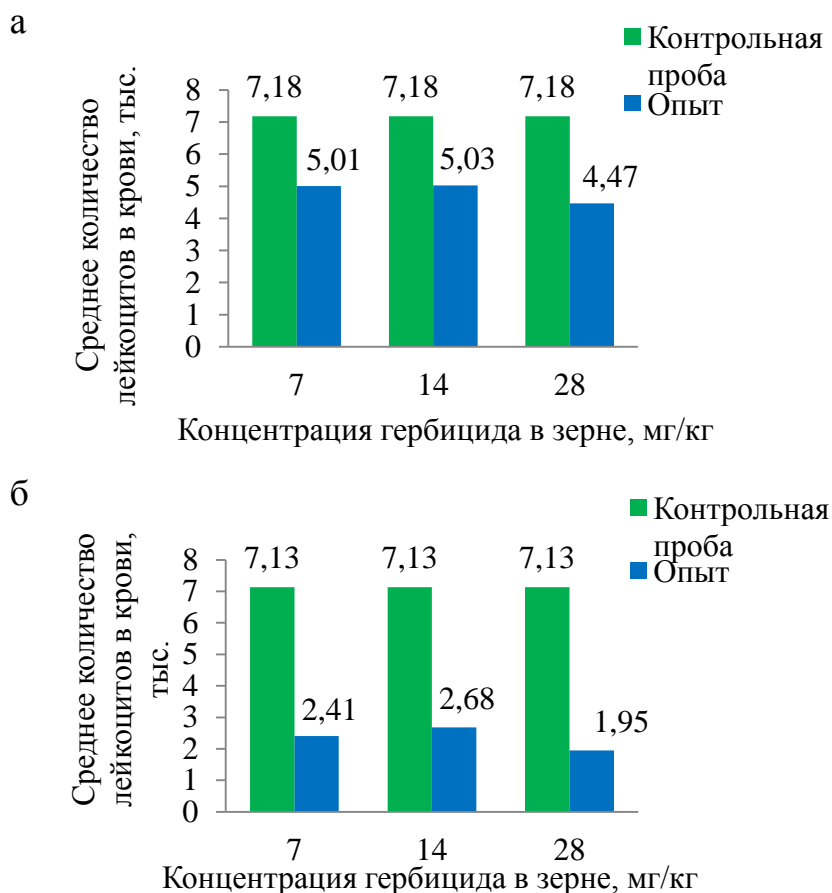


Рисунок 3.6 - Количество лейкоцитов в крови у животных период кормления 4 месяца (а) и период кормления 6 месяца (б).

Количественное уменьшение эритроцитов крови у животных, анемия, также наблюдалась в ходе всего опыта. Результаты опыта наглядно представлены на рисунках 3.7, 3.8. Микроскопические исследования препаратов крови проводили при увеличении окуляра x10, объектива x40.

Среднее уменьшение количества эритроцитов в крови в группе у животных кормление, которых осуществлялось зерном с содержанием гербицида 7 мг/кг, составило 23% и 38% через 4 и 6 месяцев соответственно, у животных кормление, которых осуществлялось зерном с содержанием



Рисунок 3.7 - Количество эритроцитов в крови контрольных животных в сетке камеры Горяева (номер образца крови К(1)-1)



Рисунок 3.8 - Количество эритроцитов в крови подопытных животных в сетке камеры Горяева (номер образца крови 28(2)-2)

гербицида 14 мг/кг, составило 36% и 47% через 4 и 6 месяцев соответственно, у животных кормление, которых осуществлялось зерном с содержанием гербицида 28 мг/кг, составило 43% и 59% через 4 и 6 месяцев соответственно. Результаты экспериментальных данных в виде диаграмм представлены на рисунке 3.9. Наблюдается отклонение количественных и качественных показателей крови лабораторных животных от физиологических норм. В ряде работ так же показано, что одним из негативных эффектов глифосата при острой интоксикации лабораторных животных, является отклонение гематологических и биохимических показателей крови [145 - 147].

При исследовании цитологических препаратов крови получены следующие результаты. Большинство эритроцитов нормохромные, имеют одинаковую форму, центральную зону просветления. В тоже время в мазках крови опытных животных наблюдались качественные изменения эритроцитов. Анизоцитоз и пойкилоцитоз выражаются в изменениях величины и формы эритроцитов.

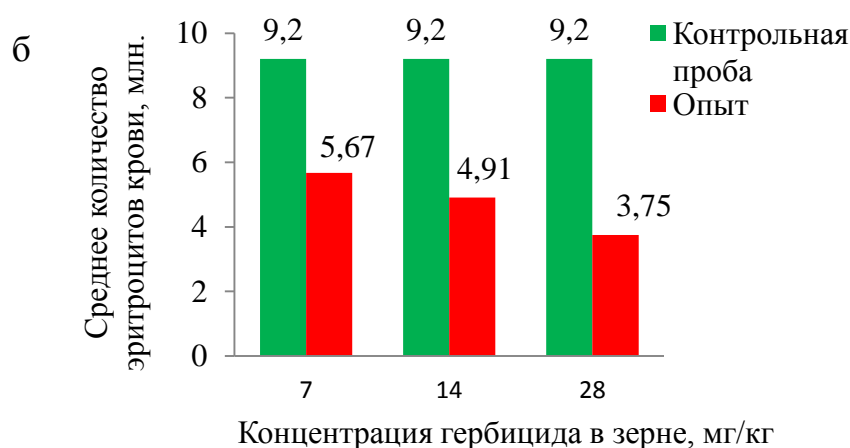
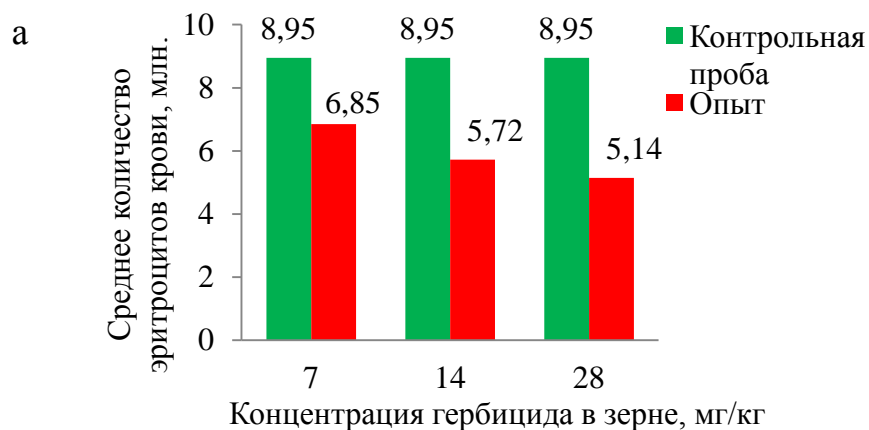


Рисунок 3.9 - Количество эритроцитов в крови у животных, период кормления 4 месяца (а) и период кормления 6 месяца (б).

В крови животных, кормление которых осуществлялось зерном с концентрацией гербицида 28 мг/кг, анизоцитоз проявляется более интенсивно 15-35 анизоцитов в поле зрения (п.з.) с более выраженным изменением формы эритроцитов 5-15 пойкилоцитов в п.з., при кормлении животных зерном с концентрацией гербицида 14мг/кг – 3-18 анизоцитов в п.з., при кормлении животных зерном с концентрацией гербицида 7 мг/кг наблюдалась небольшая вариация анизоцитов 0-5 в п.з., в мазках крови всех подопытных животных наблюдались незрелые эритроциты, полихроматофилы, 5-25 в п.з. Микроскопические препаратов крови представлены на рисунках 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, исследования проводили при увеличении окуляра х10, объектива х40.

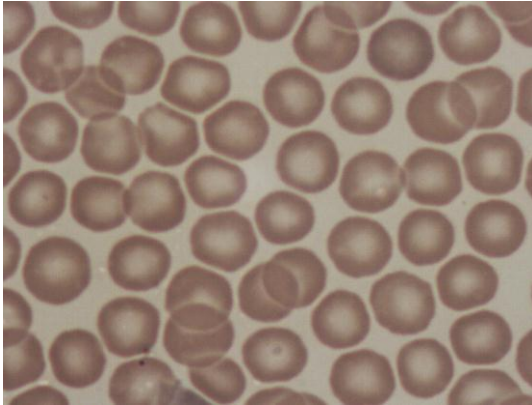


Рисунок 3.10 - Эритроциты нормальные контрольные животные, номер образца крови К(2)-2, период кормления 4 месяца

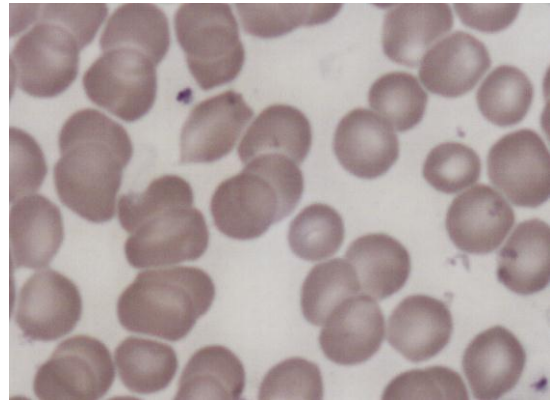


Рисунок 3.11 - Эритроциты патологические, номер образца крови 7(3)-1, концентрация гербицида в зерне 7 мг/кг, период кормления 4 месяцев

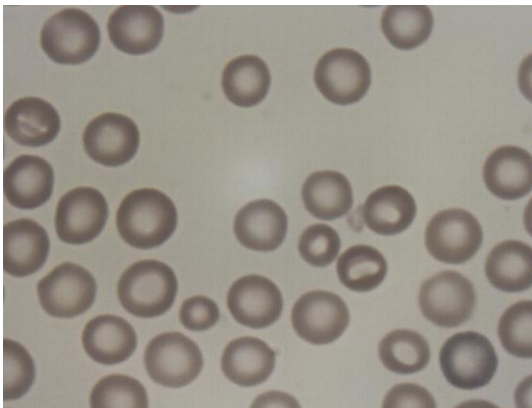


Рисунок 3.12 - Эритроциты патологические, номер образца крови 14(1)-1, концентрация гербицида в зерне 14 мг/кг, период кормления 4 месяца

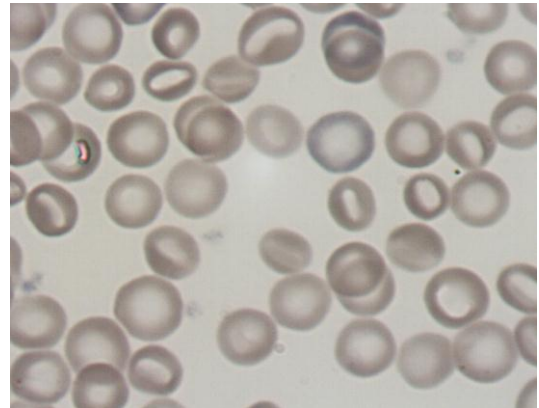


Рисунок 3.13 - Эритроциты патологические, номер образца крови 28(3)-2, концентрация гербицида в зерне 28 мг/кг, период кормления 4 месяца

Снижение лейкоцитов в крови опытных животных показало слабую зависимость «доза-эффект». При кормлении опытных животных зерном, обработанным препаратом с концентрациями гербицида 7 и 14 мг/кг, существенных отличий между результатами исследований не обнаружено на протяжении всего периода эксперимента.

Снижение количества лейкоцитов при периоде кормления 4 месяца составило 30% и 30%, при периоде кормления 6 месяцев составило 66% и 62% соответственно. При повышении концентрации гербицида в зерне до 28 мг/кг наблюдалось незначительное снижение количества лейкоцитов в крови по сравнению с вышеуказанными концентрациями, и составило 38% при периоде кормления 4 месяца, 73% при периоде кормления 6 месяцев.

Снижение эритроцитов в крови опытных животных показало большую зависимость «доза-эффект» по сравнению с лейкоцитами. При увеличении содержания гербицида в зерне и времени кормления животных происходит существенное снижение эритроцитов в крови мышей.

3.13.4 Гистологические исследования печени экспериментальных животных

Результаты гистологических исследований представлены в таблице 3.20. В ходе эксперимента установлено, что глифосат при концентрации в зерне 28 мг/кг оказывал наибольшее негативное воздействие. В гистологических препаратах органов животных, скармливание которых осуществлялось зерном с содержанием гербицида 7, 14 мг/кг, наблюдалось расширение синусоидных капилляров, в протоках просматривались единичные лимфоциты. Балочно-радиальное строение печеночных долек сохранено, прослеживается четко, полигональная форма клеток естественного размера. В гистологических препаратах органов животных, скармливание которых осуществлялось зерном с содержанием гербицида 28 мг/кг, в протоках капилляров наблюдалось значительное количество лейкоцитов, балочно-радиальное строение печеночных долек не четкое, прослеживается, форма гепатоцитов изменена - полигональная, вытянутая, клетки увеличены в размерах.

Таблица 3.20 - Описание гистологических препаратов

Номер опыта	Описание гистологического препарата
Контрольный опыт	Состояние синусоидных капилляров в норме, соответствует здоровому животному. Балочно-радиальное строение печеночных долек сохранено, четкое, прослеживается. Цитоплазма гепатоцитов зернистого вида, вакуолей не обнаружено, форма клеток – полигональная. Гепатоциты имеют выраженную сохранную мембрану. Портальные тракты не расширены. Количество двухъядерных гепатоцитов в поле зрения +.
4 месяца	
Зерно овса, обработанное препаратом (7 мг/кг)	Состояние синусоидных капилляров – слегка расширены. Балочно-радиальное строение печеночных долек сохранено, четкое, прослеживается. Цитоплазма гепатоцитов зернистого вида, без видимых изменений, вакуолей не обнаружено, форма клеток – полигональная. Гепатоциты имеют выраженную сохранную мембрану. Портальные тракты не расширены. Количество двуядерных гепатоцитов в поле зрения +.
Зерно овса, обработанное препаратом (14 мг/кг)	Состояние синусоидных капилляров – слегка расширены. В поле зрения просматриваются единичные лимфоциты. Балочно-радиальное строение печеночных долек сохранено, четкое, прослеживается. Цитоплазма гепатоцитов зернистого вида, без видимых изменений, вакуолей не обнаружено, форма клеток – полигональная. Гепатоциты имеют выраженную сохранную мембрану. Портальные тракты не расширены. Количество двуядерных гепатоцитов в поле зрения ++.
Зерно овса, обработанное препаратом (28 мг/кг)	Состояние синусоидных капилляров – расширены, в поле зрения значительное количество лимфоцитов. Балочно-радиальное строение печеночных долек не четкое, слабо прослеживается. Форма клеток изменена - полигональная, вытянутая. Портальные тракты не расширены. Количество двуядерных гепатоцитов в поле зрения +++.
6 месяцев	
Зерно овса, обработанное	Состояние синусоидных капилляров – расширены, в поле зрения значительное количество лимфоцитов. Балочно-радиальное строение

Продолжение таблицы 3.20

Номер опыта	Описание гистологического препарата
препаратом (28 мг/кг)	печеночных долек не четкое, слабо прослеживается. Форма клеток изменена - полигональная, вытянутая. Портальные тракты не расширены. Количество двуядерных гепатоцитов в поле зрения +++.
6 месяцев	
Зерно овса, обработанное препаратом (7 мг/кг)	Состояние синусоидных капилляров – слегка расширены. В поле зрения просматриваются единичные лимфоциты. Балочно-радиальное строение печеночных долек сохранено, четкое, прослеживается. Цитоплазма гепатоцитов зернистого вида, без видимых изменений, вакуолей не обнаружено, форма клеток – полигональная. Гепатоциты имеют выраженную сохранную мембрану. Портальные тракты не расширены. Количество двуядерных гепатоцитов в поле зрения +.
Зерно овса, обработанное препаратом (14 мг/кг)	Состояние синусоидных капилляров – расширены. В поле зрения просматриваются единичные лимфоциты. Балочно-радиальное строение печеночных долек сохранено, четкое, прослеживается. Цитоплазма гепатоцитов зернистого вида, без видимых изменений, вакуолей не обнаружено, форма клеток – полигональная. Гепатоциты имеют выраженную сохранную мембрану. Портальные тракты не расширены. Количество двуядерных гепатоцитов в поле зрения +.
Зерно овса, обработанное препаратом (28 мг/кг)	Состояние синусоидных капилляров – расширены, в протоках капилляров значительное количество лейкоцитов. Балочно-радиальное строение печеночных долек не четкое, прослеживается. Форма клеток изменена - полигональная, вытянутая. Портальные тракты не расширены. Количество двуядерных гепатоцитов в поле зрения +++.
<p>_____</p> <p>+ - Количество двухъядерных гепатоцитов в поле зрения от 1 до 3.</p> <p>++ - Количество двухъядерных гепатоцитов в поле зрения от 3 до 6.</p> <p>+++ - Количество двухъядерных гепатоцитов в поле зрения от 6 до 10.</p>	

Микроскопические исследования гистологических препаратов проводили при увеличении окуляра x10, объектива x40 методом фазового контраста. Изображения гистосрезов представлены на рисунках 3.14, 3.15, 3.16, 3.17.

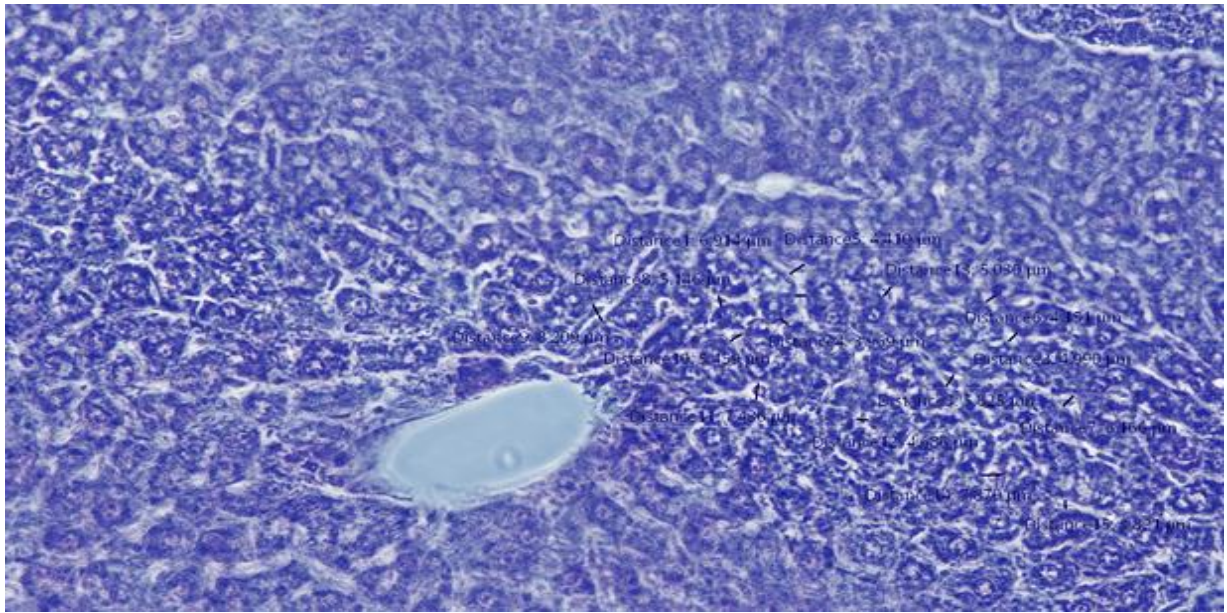


Рисунок 3.14 - Гистологический препарат печени, контрольные животные (номер образца К(3)-1), период кормления 4 месяца

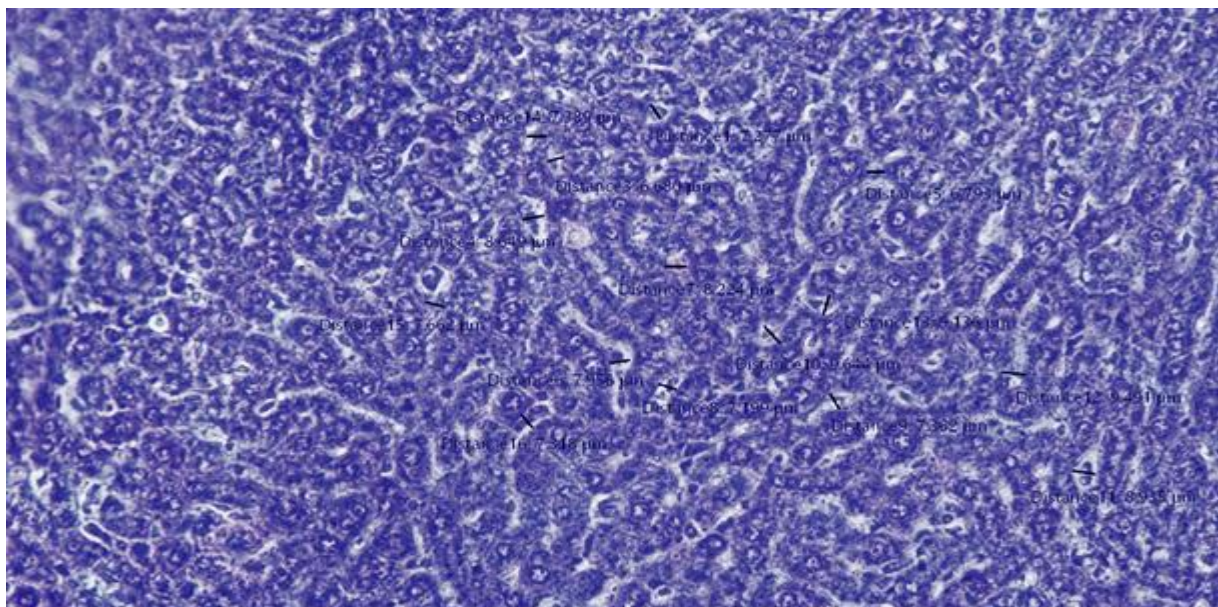


Рисунок 3.15 - Гистологический препарат печени, (номер образца 7(3)-1), концентрация гербицида в зерне 7 мг/кг, период кормления 4 месяцев

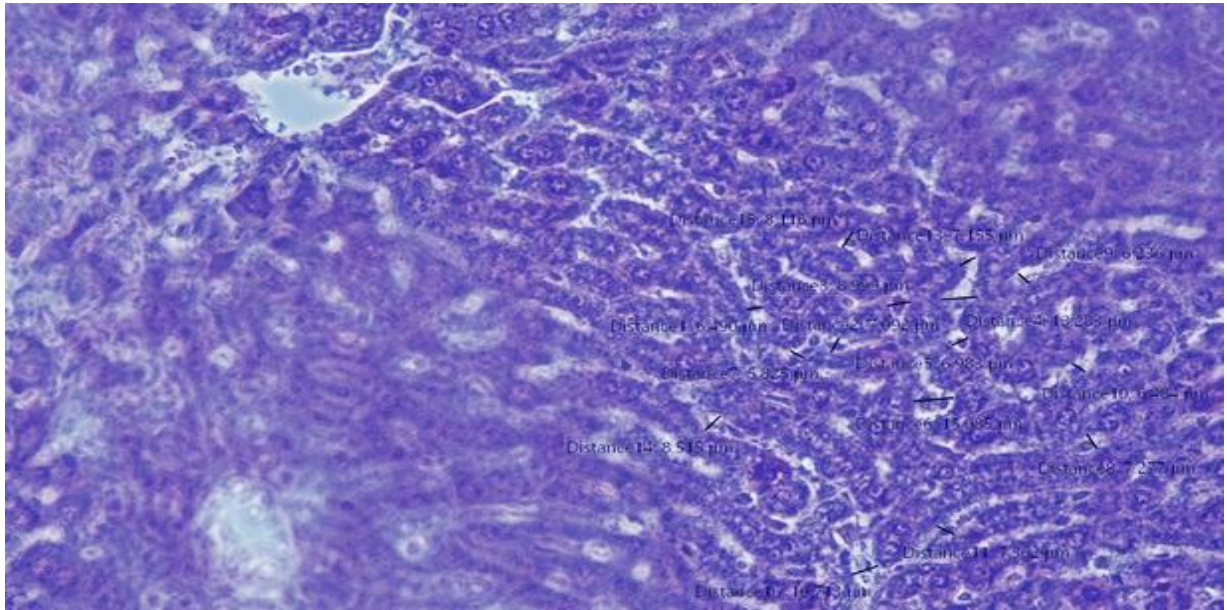


Рисунок 3.17 - Гистологический препарат печени, (номер образца 14(1)-2), концентрация гербицида в зерне 14 мг/кг, период кормления 4 месяца

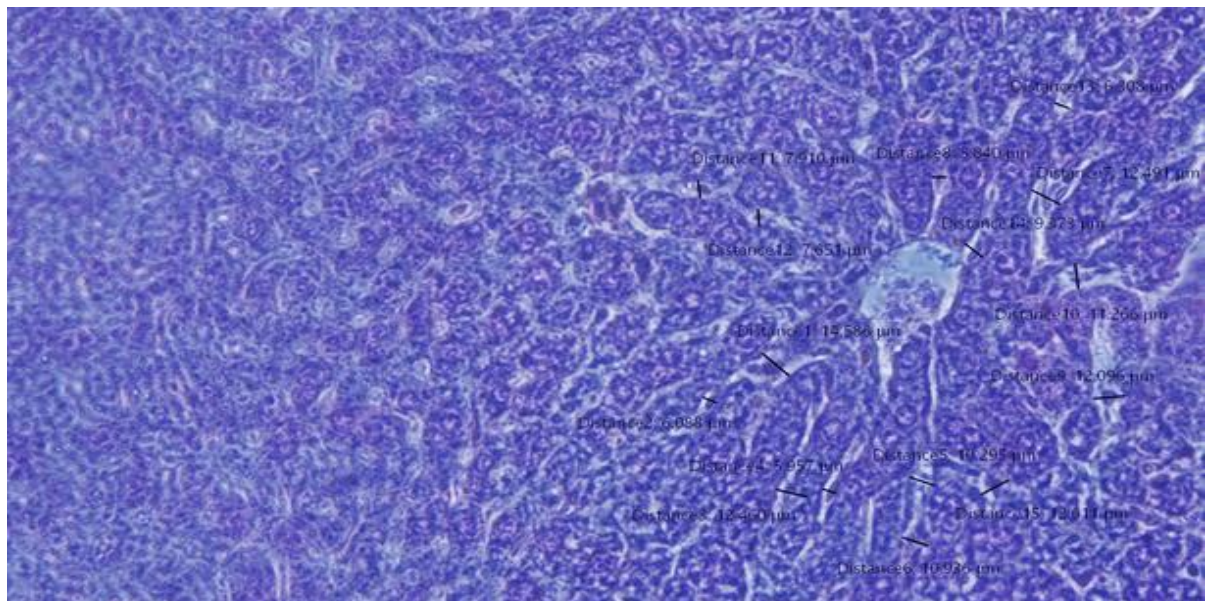


Рисунок 3.17 - Гистологический препарат печени, (номер образца 28(3)-2), концентрация гербицида в зерне 28 мг/кг, период кормления 4 месяца

Для определения ширины синусоидных капилляров использовали биологический микроскоп с программным обеспечением «Микро-Анализ база изображений». В таблице 3.21 приведены некоторые значения ширины синусоидных капилляров лабораторных животных различных групп.

Таблица 3.21 – 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 низких концентрациях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкое применение гербицидов способствовало накоплению их в объектах окружающей среды. Основная опасность химических веществ заключается в конкурентном необратимом ингибировании ферментов. Так например, глифосат ингибирует холинэстеразные центры, вызывая поражения нервной системы [134]. В тоже время, глифосат содержащие препараты способны неконкурентно ингибировать ферменты клеток, уменьшая скорость ферментативных реакций [116, 185].

Гербицид угнетает активность микросомальных монооксидаз внутреннего эндоплазматического ретикулума. Оксидазы участвуют в окислительно-восстановительном метаболизме ксенобиотиков и катаболизме стероидных гормонов. Нарушение функционирования ферментов негативно воздействует на репродуктивную систему организма [174].

Фосфорорганические соединения являются митохондриальными ингибиторами, нарушающие механизм окислительного фосфорилирования, аккумуляирования энергии в клетках АТФ [116, 174]. Снижение активности митохондриальной электронно-транспортной системы и развитие энергодефицита в клетке приводит к развитию более 40 заболеваний [186].

На основании полученных опытных данных можно сделать следующие 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 в 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 биодеградацию 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 и эритроцитов у опытных животных на всем протяжении опыта. Качественные изменения клеток крови выражались в виде анизоцитоза и пойкилоцитоза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов А.И., Гринько А.В. Влияние гербицидов на засорённость и урожайность ярового ячменя // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. - 2014. - № 6(50). - С. 35-37.
2. Спиридонов Ю.Я., Жемчужин С.Г. Современные проблемы изучения гербицидов (2006-2008 гг.) // Агрохимия. – 2010. - № 7. - С. 73-91.
3. Липский С.И., Пантюхов И.В., Ивченко В.К. Эффективность гербицидов АО «Байер» в борьбе с сорными растениями в посевах зерновых культур // Вестник КрасГАУ. – 2018. - № 3. – С. 12-19.
4. Долматов А.А., Стецов Г.Я. Химическая борьба с молочаем лозным (*Euphorbia Virgata* Waldst & Kit) в посевах яровой пшеницы на черноземе, выщелоченном Алтайского края. // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2016. - № 11 (145). - С. 15-20.
5. Meriel Watts, Peter Clausing, Angeliki Lyssimachou, Gesine Schutte, Rina Guadagnini, Emily Marquer. Glyphosate, Journal of PAN. - 2016. – 20 с.
6. Ларина Г.Е. Эффективность комбинированных гербицидов на основе 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и ее производных // Агрохимия. – 2014. - №1. - С. 45-56.
7. Кириленко Е.И., Долженко В.И., Маханькова Т.А. Меняется состав сорняков – менять надо и подбор гербицидов // Защита и карантин растений. – 2007. - № 8. - С. 53.
8. Спиридонов Ю.Я., Ларина Г.Е., Протасова Л.Д., Абубикеров В.А., Жариков М.Г. Многолетнее применение общеистребительного гербицида Раундап в центральном регионе Нечерноземья // Агрохимия. – 2010. - № 2. - С. 29-36.
9. Немченко В.В., Замятин А.А. Эффективность предуборочного применения гербицида Ураган Форте (десикация) на посевах яровой пшеницы в курганской области // Аграрный вестник Урала. – 2011. - № 5 (84). - С. 14-15.

10. Куликова Н.А., Лебедева Г.Ф. Гербициды и экологические аспекты их применения [Текст] : учебное пособие. - М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ». – 2010. - 152 с.

11. Эмирова Д.Э. Анализ пестицидной нагрузки на агроценозы Крыма // Ученые записки Крымского инженерно-педагогического университета. Выпуск 158, Биологические науки. Симферополь: НИЦ КИПУ. – 2008. - С. 69-71.

12. Шубина А.Г., Синютина С.Е., Шубин Р.А. Содержание пестицидов в зерне злаковых культур и пахотных почвах ряда районов Тамбовской области // Вестник ТГТУ. – 2009. – Т. 15. - № 1. - С. 208-212.

13. Михайликова В.В., Алехин В.Т., Стребкова Н.С., Наумова Е.Н. Использование действующих веществ в составе химических средств защиты растений в Российской Федерации //Агрохимия. – 2013. - № 12. - С. 10-14.

14. Жантасов К.Т., Шалатаев С.Ш., Кадирбаева А.А., Алтеев Т.А, Жантасов М.К., Жантасова Д.М., Кочеров Е.Н. Современное состояние и перспективы производства глифосата // Современные наукоемкие технологии. – 2014. - № 12. - С.156-159.

15. Спиридонов Ю.Я., Никитин Н.В. Глифосатсодержащие гербициды – особенности их применения в широкой практике растениеводства // Вестник защиты растений. – 2015. - № 4(86). - С. 5-11.

16. Hoagland RE & Duke SE. Biochemical effects of glyphosate. In: *Biochemical Responses Induced by Herbicides*; Moreland DE, St. John JB & Hess FD (Eds.) ACS Symposium Series 181. – 1982. - pp. 175-205.

17. Jeff Schuette, Environmental fate of glyphosate, Environmental Monitoring & Pest Management, Department of Pesticide Regulation Sacramento, CA 95824-5624. – 1998. – 13 p.

18. Caroline Cox. Glyphosate (Roundup) // Journal of pesticide reform. - 1998. - Vol. 18. - № 3. – P. 3-17.

19. Glyphosate Weed Control Methods Handbook. The Nature Conservancy // [Tu M., Hurd C., Robinson R., Randall J.M.]. – 2001. - P. 701-710.

20. Masoud Tohidfar, Solmaz Khosravi. Focus on: Transgenic crops with an improved resistance to biotic stresses. A review // Biotechnology, Agronomy, Society and Environment. – 2015. - Vol. 19(1). - P. 62-70.

21. Медведев О. Глифосат и его потенциальное влияние на здоровье человека // Комбикорма. – 2017. - № 4. - С. 61-63.

22. Список пестицидов с описанием RuPest (по дв) : официальный сайт. - PPDB: <http://rupest.ru/ppdb/spisok-pestitsidov-s-opisaniem-po-dv.html> (дата обращения 25.05.2018). – Текст : электронный.

23. Monsanto International and Monsanto Europe. The agronomic benefits of glyphosate in Europe - benefits of glyphosate per market use REVIEW. – 2010. - pp 1-82.

24. The environmental impacts of glyphosate. Journal of Friends of the Earth Europe. – 2013. – P. 1-20.

25. Брызгалина Е.В., Рудь В.Л., Зыгин Д.А., Беломытцев М.К. Исследование процессов трансформации фосфорсодержащих органических веществ в окружающей среде // Теоретическая и прикладная экология. – 2014. - № 4. - С. 75-77.

26. Canadian water quality guidelines. - Ottawa, Ontario, Environmental Canada: Canadian Council of Ministers of the Environment. – 1989. – 106 p.

27. Кузнецова Е.М., Чмиль В.Д., Глифосат: поведение в окружающей среде и уровни остатков // Современные проблемы токсикологии. – 2010. - №1. - С. 87-94.

28. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 10 мая 2018 г. № 33 "Об утверждении гигиенических нормативов ГН 1.2.3539-18 "Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды" : утверждено постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 10 мая 2018 года N 33. – 109 с.

29. Каспаров В.А., Промоненков В.К. Применение пестицидов за рубежом // М.: Агропромиздат. – 1990. – 224 с.

30. Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms isolated from Brazilian contaminated soil / С. О. Martinez [et al.] // Brazilian Journal of Microbiology. – 2007. - Vol. 38. - No. 3. - P. 522-525.

31. Почвоведение / И.С. Кауричев, Н.П. Панов, Н.Н. Розов и др.; Под ред. И.С. Кауричева. - 4-е изд., перераб. и доп. - М.: Агропромиздат, 1989. - 719 с.: ил.- 51000 экз. - (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений). – ISBN 5-10-000571-8.

32. Жариков М.Г. Эколого-токсикологическая оценка воздействия глифосата при многолетнем применении на элементы агроценоза и биоремедиации загрязненных территорий : специальность 06.01.07 «защита растений» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Жариков Михаил Геннадьевич; Государственное научное учреждение Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии Россельхозакадемии. - Москва, 2010. – 20 с. – Место защиты: Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева.

33. Кравцов И.С., Янов С.Н., Дармов И.В., Ковтун А.Л. Выделение из окружающей среды микроорганизмов, способных разлагать фосфонаты // Химическая и биологическая безопасность. – 2006. - № 6(30). С. 3-9.

34. Свиридов А.В., Шушкова Т.В., Ермакова И.Т., Иванова Е.В., Эпиктетов Д.О., Леонтьевский А.А. Микробная деградация гербицида глифосата (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51. - № 2. - С. 183-190.

35. Stephen O. Duke. Glyphosate Degradation in Glyphosate-Resistant and -Susceptible Crops and Weeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2010. - P. 5835-5841.

36. Матыс С.В. Деградация метилфосфонатов *E. coli*: физиологические

и биохимические аспекты : специальность 03.00.04 «Биохимия» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Матыс Светлана Владимировна ; Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН. Пушино, 2003. – 22 с. – Место защиты: Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН

37. S. V. Kononova and M. A. Nesmeyanova. Phosphonates and Their Degradation by Microorganisms // *Biochemistry (Moscow)*. – 2002. - Vol. 67. - No. 2. - pp. 184-195.

38. Товстик Е.В., Огородникова С.Ю., Ашихмина Т.Я., Широких И.Г. Влияние метилфосфоновой кислоты на реакцию почвенных актиномицетов // *Агрохимия*. – 2016. - № 5. - С. 47-54.

39. Бакулин М.К., Овсянников Ю.С., Туманов А.С., Бакулин В.М. Деградация гербицида глифосат бактериями родов *Pseudomonas* и *Proteus* // *Фундаментальные исследования*. – 2014. - № 8. - С. 1377-1382.

40. Кузнецова Е.М., Гринько А.П., Чмиль В.Д. Методы определения глифосата в сельскохозяйственном и продовольственном сырье и продуктах питания // *Проблемы харчування*. – 2008. - № 3-4. - С. 55-68.

41. Лепешкин И.В., Медведев В.И., Багацкая Е.Н., Гринько А.П., Кузнецова Е.М. Токсиколого-гигиеническая оценка остаточных количеств глифосата в сельскохозяйственной продукции // *Environment & Health*. – 2013. - № 4. - С. 45-49.

42. Сафаров М.Г. Гербициды: 2,4-D // *Соросовский образовательный журнал*. – 2001. – Т. 7. - №9. - С. 57-62.

43. Цыганкова В.А., Галкина Л.А., Мусатенко Л.И., Сытник К.М. Генетический и эпигенетический контроль роста и развития растений. Молекулярно-генетический контроль проведения и реализации сигналов ауксинов // *Біополімери і клітина*. – 2005. - Т. 21. - № 1. - С. 187-219.

44. Ладонин В.Ф., Рачинский В.В., Кретова Л.Г., Самойлов Л.Н. Проникновение, передвижение и разложение ^{14}C -2,4-Д в ячмене при комплексном применении средств химизации // Известия ТСХА. – 1988. - № 2. - С. 103-108.

45. Хмелевская М.С., Ахрамович Т.И., Игнатовец О.С., Леонтьев В.Н., Феськова Е.В. Естественные пути деградации пестицидов на основе 2,4-дихлорфеноксиуксусных кислот // Труды БГТУ. – 2016. - № 4. - С. 175-181.

46. Arora P. K., Bae H. Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives // Microb Cell Fact. – 2014. - Vol. 13. - No. 1. - P. 31–47.

47. Халимова Л.Х., Хасанов И.Р., Петухова Н.И., Зорин В.В. Исследование деградации фенола, хлорфенолов и 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты консорциумом микроорганизмов-деструкторов // Башкирский химический журнал. - 2006. – Т. 13. - № 1. - С. 71-73.

48. Игнатовец О.С., Феськова Т.И., Ахрамович Т.И., Леонтьев В.Н. Изучение микробной деградации 2,4-Д и пестицидов группы сульфонилмочевины в модельных системах // Труды БГТУ. – 2018. - № 2. - С. 161-166.

49. Применение микроорганизмов-деструкторов для биоремедиации почв, загрязненных 2,4-Д и пестицидами группы сульфонилмочевины. О. С. Игнатовец, Е. В. Феськова, В. Н. Леонтьев, Т. И. Ахрамович // Сахаровские чтения 2017 года: экологические проблемы XXI века = Sakharovreadings 2017: environmental problems of the XXI century: материалы 17-й Междунар. науч. конф., 18–19 мая 2017 г., г. Минск: в 2 ч. / Междунар. гос. экол. ин-т им. А. Д. Сахарова Бел. гос. ун-та; редкол.: С. Е. Головатый [и др.]; под ред. д-ра ф.-м. н., проф. С. А. Маскевича, д-ра с.-х. н., проф. С. С. Позняка. Минск: ИВЦ Минфина. – 2017. - Ч. 2. - С. 27–28.

50. Bae H. S., Lee J. M., Lee S. T. Biodegradation of 4-chlorophenol via a hydroquinone pathway by *Arthrobacter ureafaciens* CPR706 // FEMS Microbiol. Lett. - 1996. - Vol. 145. - No. 1. - P. 125–129.

51. Tatiane M. Silva, Maria I. Stets, André M. Mazzetto, Fabiana D. Andrade, Sônia A. V. Pileggi, Paulo R. Fávero, Marcelo D. Cantú, Emanuel Carrilho, Paulo I.B. Carneiro, Marcos Pileggi. Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms from Brazilian contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2007. - P. 522-525.

52. G. Rasu Chaudhry and G. H. Huang. Isolation and Characterization of a New Plasmid from a *Flavobacterium* sp. Which Carries the Genes for Degradation of 2,4-Dichlorophenoxyacetate, *Journal of Bacteriology*. – 1988. - Vol. 170. - No. 9. - P. 3897-3902.

53. R. H. Don and J. M. Pemberton. Properties of Six Pesticide Degradation Plasmids Isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*, *Journal of Bacteriology*. – 1981. - Vol. 145. - No. 2. - P. 681-686.

54. Центер И.М. Деградация 2,4-дихлорфенола иммобилизованными и суспендированными клетками *Bacillus cereus* : специальность 03.00.23 «Биотехнология» : автореферат на соискание ученой степени кандидата технических наук / Центер Ирина Михайловна ; Байкальский институт природопользования Сибирского отделения Российской академии наук. - г. Улан Уде, 2007. – 20 с. – Место защиты: Восточно-Сибирский государственный университет.

55. Почерней И.М. (И.М. Центер), Матафонова Г.Г., Ширапова Г.С., Инешина Е.Г., Батоев В.Б., Цыренов В.Ж.. Деструкция 2,4-дихлорфенола иммобилизованными клетками *Bacillus cereus* // II Материалы Международной научной конференции "Трансграничные аспекты использования природно-ресурсного потенциала бассейна реки Селенги в новой социально-экономической и геополитической ситуации".- Улан-Удэ: Изд-во ГУЗ РЦМП МЗ РБ. – 2006. - С. 170-173.

56. Центер И. М., Матафонова Г.Г. Деградация 2,4-дихлорфенола клетками *Bacillus cereus*, иммобилизованными на природных цеолитах // Всероссийская конференция молодых ученых "Экология в современном мире:

взгляд научной молодежи". - Улан- Удэ: Изд-во ГУЗ РЦМП МЗ РБ. – 2007. - С. 332-333.

57. Центер И.М., Матафонова Г.Г., Батоев В.Б. Исследование токсичности продуктов биодegradации 2,4-дихлорфенола клетками *Bacillus cereus* // ШИШ Школа-семинар молодых ученых России "Проблемы устойчивого развития региона". - Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН. – 2007. - С.165-166.

58. Вершинин Н.О. Дegradация гербицида 2,4-Д и 2,4-дихлорфенола в воде при действии ультрафиолетового излучения // Вода: химия и экология. – 2013. - № 4. - С. 84-91.

59. Julie V. Reimer. Complicated Composting: Persistent Pyridine Carboxylic Acid Herbicides. Project Report submitted to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Agriculture and Life Sciences In Crop and Soil Environmental Sciences College of Agriculture and Life Sciences. - 2013. – 29 p.

60. Андрияшина Т.В., Саратовских Е.А., Чепегин И.В., Чижова М.А. Исследование содержания техногенных загрязняющих веществ в почвах Орловской области // Вестник Казанского технологического университета – 2013 .- Т. 16. - №4 - С. 67 - 72.

61. Спиридонов Ю.Я., Спиридонова И.Ю. Применение гербицида Горчак, ВГР в борьбе с горчаком ползучим и другими корнеотпрысковыми видами сорняков на различных сельскохозяйственных объектах. - [http://sah.ru>downloads/gorchak_for_web.pdf](http://sah.ru/downloads/gorchak_for_web.pdf) (дата обращения 17.10.2018). – Текст : электронный.

62. Dr E Jane Gilbert, Josef Barth, Enzo Favoino and Dr Robert Rynk. An investigation of clopyralid and aminopyralid in commercial composting systems. WRAP. – 2010. - P. 44.

63. Саратовских Е.А., Полякова О.В., Рощупкина О.С., Лебедев А.Т. Продукты фотолиза 3,6 – дихлорпиколиновой кислоты (гербицида лонтрел) в

водных растворах // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. - Т. 43. - №2. - С. 252 – 256.

64. Саратовских Е.А., Козлова Н.Б., Байкова И.С. Штамм Е.В. Корреляция между токсическими свойствами загрязняющих веществ и их константами комплексообразования с АТФ //Химическая физика. – 2008. – Т. 27. - № 11. - С. 87-92.

65. Саратовских Е.А., Козлова Н.Б., Папин В.Г., Штамм Е.В. Разложение гербицида лонтрел биологическими и фотохимическими методами // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. - Т. 42. - №1. - С. 44 – 51.

66. Жариков М.Г., Спиридонов Ю.Я. Изучение влияния глифосатсодержащих гербицидов на агроценоз // Агрохимия. – 2008. - № 8. - С. 81-89.

67. Кондакова Л.В., Домрачева Л.И., Огородникова С.Ю., Олькова А.С., Кудряшов Н.А., Ашихмина Т.Я. Биоиндикационные и биотестовые реакции организмов на действие метилфосфонатов и пирофосфата натрия // Теоретическая и прикладная экология. – 2014. - № 4. - С. 62-68.

68. Ашихмина Т.Я., Кондакова Л.В., Домрачева Л.И., Огородникова С.Ю. Метилфосфоновая кислота как регулятор биологических процессов в экологических системах: действие н микроорганизмы, ферментативную активность и высшие растения // Теоретическая и прикладная экология. – 2007. - № 2. - С. 78-87.

69. Горленко М.В., Якименко О.С., Голиченко М.В., Костина Н.В. Функциональное разнообразие почвенных микробных сообществ при внесении органических субстратов различной природы // Вестник Московского университета. Серия 17. Почвоведение. – 2012. - № 2. - С. 20-27.

70. Спиридонов Ю.Я., Ларина Г.Е., Шестаков В.Г. Методическое руководство по изучению гербицидов, применяемых в растениеводстве. М.: Печатный город. – 2009. - С. 252.

71. Амелин В.Г., Лаврухин Д.К., Третьяков А.В. Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция при определении гербицидов – природных мочевины в природных водах методом ВЭЖХ // Журнал аналитической химии, - 2013. - том 68. - №9. - С. 908-916.

72. Бондаренко Е.П., Голуб А.А. Определение остаточного количества гербицида трибенурон-метила в объектах окружающей среды методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Здоровье и окружающая среда. – 2016. - № 26. - С. 268-270.

73. Хроматографические методы определения остаточных количеств 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты (2,4-Д) в воде, почве, фураже, продуктах питания растительного и животного происхождения № 1541-76 : утверждено зам. Гл. гос. санитар. врача СССР 20 декабря 1976.

74. МУК 4.1.1978-05 Определение остаточных количеств глифосата в зерне и масле сои, семенах и масле подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г.Онищенко 21 апреля 2005 г. : введены впервые : дата введения 1 июля 2005.

75. МУК 4.1.2022-05 Методические указания по определению остаточных количеств трибенурон-метила в воде, почве, зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии : утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г.Онищенко 17 октября 2005 г. : дата введения: с момента утверждения.

76. Заяц М.Ф., Заяц М.А. Лещев С.М., Петрашкевич Н.В. Определение остаточных количеств гербицида аденго в кукурузе методом диссоциативной экстракции // Известия национальной академии наук Беларуси. – 2015. - № 3. - С. 27-33.

77. Piotr Kaczyński, Bożena Łozowicka. Liquid chromatographic determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in rapeseed with MS/MS detection or derivatization/fluorescence detection. *Open Chem.* – 2015. - № 13. - P. 1011–1019.

78. Laganà A. Occurrence and determination of herbicides and their major transformation products in environmental waters / A. Laganà, A. Bacaloni, I. De Leva, A. Faberi, G. Fago, A. Marino // *Anal. Chim. Acta.* – 2002. - Vol. 462. - P. 187-198.

79. Зеленкова Н.Ф., Винокурова Н.Г. Определение глифосата и продуктов его биodeградации хроматографическими методами // *Журнал аналитической химии.* – 2008. - № 9. - С. 958-961.

80. Determination of chlorophenoxy acid herbicides and their esters in soil by capillary high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, using large volume injection and temperature gradient / N. Rosales-Cornado [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2002. - Vol. 470. - P. 147–154.

81. Горячева Л.В., Егорченкова О.Е. Метод многокомпонентного определения гербицидов класса карбоновых кислот в атмосферном воздухе // *Научно-медицинский вестник Центрального Черноземья.* – 2018. - № 73. - С. 37-42.

82. Петрук Е.А. Определение хлорорганических пестицидов и гербицидов методом газовой хроматографии // *Научный форум. Сибирь.* – 2017. - Т. 3. - №1. - С. 26-27.

83. Patnaik P., Khoury J. N. Determination of acid herbicides in water by GC-MS: a modified method using single extraction and methanol esterification // *American Laboratory.* – 2005. - Vol. 37. - No. 7. - P. 12–14.

84. Комарова Н.В., Карцова Л.А. Определение гербицидов класса хлорфеноксикарбоновых кислот в природных и питьевых водах методом капиллярного зонного электрофореза // *Журнал прикладной химии.* – 2003. - Т. 76. - С. 246-251.

85. Зацепина О.Е., Шукшина Е.И. Электрофоретическое определение гербицидов // Сборник материалов Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспектив-2016», посвященной Году образования в Содружестве Независимых государств, Красноярск, - Сибирский федеральный университет. - 2016 г. - С. 26-28.

86. Multiresidue determination of chlorophenoxy acid herbicides in human urine samples by use of solid-phase extraction and capillary LC-UV detection / N. Rosales-Conrado [et al.] // Anal. Bioanal. Chem. – 2008. - Vol. 390. - No. 2. - P. 759–768.

87. Аветисян К.В., Аджемян Л.А. Определение остатков гербицида гранстар методом тонкослойной хроматографии // Биологический журнал Армении. – 2010. - № 3 (62). - С. 98-99.

88. Загребин А.О., Румянцев В.А., Тонкопий В.Д. Использование методов биотестирования и биоидентификации ксенобиотиков для оценки состояния водных экосистем // Общество. Среда. Развитие. – 2014. - № 1 (30). - С. 157-160.

89. Цаценко Л.В. Оценка фитотоксичности почвы на посевах подсолнечника с помощью биотеста ряски малой (*Lemna minor L.*) // Научный журнал КубГАУ. – 2010. - № 59(05) .- с. 1-9.

90. Олькова А.С. Особенности биотестирования компонентов окружающей среды // Актуальные проблемы региональной экологии и биодиагностика живых систем: Материалы XI Всероссийской научно-практической конференции-выставки инновационных экологических проектов с международным участием.- Киров: Изд-во ООО «Веси». – 2013. - С.96-98.

91. Захаров И.С, Алешин И.В. Методы и средства микробиотестирования токсичности водных сред // Фундаментальная и прикладная гидрофизика. – 2015. - Т. 8. - № 2. - С. 75-95.

92. Олькова А.С., Фокина А.И., *Daphnia magna Straus* в биотестировании природных и техногенных сред // Успехи современной биологии. – 2015. - Т. 135. - № 4. - С. 380-389.

93. Жиденко А.А. Влияние гербицидов на структурный метаболизм карпа (*Cyprinus carpio L.*) разного возраста // Вісник Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна. – 2007. - № 788. - С. 86-92.

94. Влияние глифосата на энергетический обмен в органах карпа // Укр. біохім. журн. – 2013. - Т. 85. - № 3. - С. 22-30.

95. Кузьмина В.В., Тарлева А.Ф., Шептицкий В.А. Влияние гербицида Раундап на активность пептидаз в кишечнике у рыб разных видов // Вопросы ихтиологии. – 2017. - Т. 57. - № 5. - С. 607-613.

96. Барбухо Е.В., Жиденко А.А. Повышение жизнеспособности личинок карпа в условиях действия гербицида Раундап пробиотическим препаратом БПС-44 // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина. – 2011. - Т. 1. - № 2. - С. 3-11.

97. Эмирова Д.Э. Сравнительный анализ фитотоксического действия рекомендуемых к применению доз пестицидов на морфологические показатели *Helianthus Fnnuus L.* // Ученый XXI века. – 2015. - № 9-10 (10-11), С. 20-22.

98. Голованова И.Л., Аминов А.И. Капшай Д.С., Голованов В.К. Влияние гербицида Раундап на активность гликозидаз в кишечнике молодых теплолюбивых видов рыб в зависимости от температуры акклимации // Вестник АГТУ. – 2015. - № 2. - С. 90-97.

99. Голованова И.Л., Аминов А.И. Влияние некоторых экологических факторов на чувствительность гликозидаз рыб к действию гербицида Раундап *in vitro* // Труды Карельского научного центра РАН. – 2016. - № 12. - С. 96-105.

100. Аминов А.И. Влияние гербицида Раундап на активность гликозидаз в кишечнике молодых рыб при различных значениях рН и температуры // Вестник Мордовского университета. – 2013. - № 3-4. - С. 58-62.

101. Полуян А.Я. Оценка пестицидной интоксикации некоторых рыб и амфибий в период раннего онтогенеза : специальность 03.00.16 «Экология» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Полуян Анна Яковлевна ; ФГУП «Азовский научно-

исследовательский институт рыбного хозяйства». Ростов-на-Дону, 2006, - 26 с.
– Место защиты: Ростовский государственный университет.

102. Терещенко П.В. Действие гербицидов на дождевых червей // Известия ТСХА. – 1997. - № 3. - С. 99-107.

103. Эмирова Д.Э., Баличиева Д.В. Биотестирование острой токсичности препарата ДНОК с использованием дождевых червей. // Ученые записки Таврического национального университета имени В.И. Вернадского. – 2011. - Т. 24. - № 1(63). - С. 159-163.

104. Воронцов В.В. Исследование влияния модельного загрязнения почвы пестицидами на дождевых червей в лабораторных условиях // Фундаментальные исследования. – 2012. - № 9 (часть1). - С. 26-32.

105. Ганин Г.Н. Биотестирование некоторых ксенобиотиков почвенными олигохетами // Агрохимия. – 2008. - № 11. - С. 79-85.

106. Sara C. Novais, Amadeu M. V. M. Soares and Monica J. B. Amorim. *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta) Exposed to Several Toxicants: Effects on Survival, Reproduction and Avoidance Behaviour. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry — Biological Responses to Contaminants*, Eds., N. Hamamura, S. Suzuki, S. Mendo, C. M. Barroso, H. Iwata and S. Tanabe. – 2010. - P. 237–242.

107. Monica J.B. Amorim, Sara C. Novais, Jörg Römbke, Amadeu M.V.M. Soares. *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae): A test organism in a standardised avoidance test? Effects of different chemical substances. *Environment International* 34. -2008. - P. 363–371.

108. Monica J.B. Amorim, Jörg Römbke, A. Scheffczyk, Amadeu M.V.M. Soares. Effect of different soil types on the enchytraeids *Enchytraeus albidus* and *Enchytraeus luxuriosus* using the herbicide Phenmedipham. *Chemosphere*, 61. – 2005. - P. 1102–1114.

109. Monica J. B. Amorim, M. J. B., J. Römcke and A. M. V. M. Soares. Avoidance behaviour of *Enchytraeus albidus*: Effects of benomyl, carbendazim, phenmedipham and different soil types. *Chemosphere*. - 2005. - No. 59. - P. 501–510.

110. Cornelia Bandow, Anja Coors and Jörg Römcke. *Enchytraeus bigeminus* (Enchytraeidae, Oligochaeta) as a new candidate for ecotoxicological laboratory tests. *Soil organisms*. – 2013. - No.85 (2). - P. 103–112.

111. Susana Loureiro, Monica J.B. Amorim, Bruno Campos, Sandra M.G. Rodrigues, Amadeu M.V.M. Soares. Assessing joint toxicity of chemicals in *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae) and *Porcellionides pruinosus* (Isopoda) using avoidance behaviour as an endpoint. *Environmental Pollution*. – 2009. - No. 157. - P. 625–636.

112. Ганин Г.Н., Влияние олигохет на содержание поллютантов в осадке сточных вод и использование их для биотестирования компостов на основе ОСВ // *Агрохимия*. – 2011. - № 1. - С. 75-80.

113. Эмирова Д.Э. Оценка острой токсичности пестицида БИ-58 на люмбрицид в условиях искусственного загрязнения почв // *Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского*. – 2014. - Т. 27(66). - № 1. - С. 241-246.

114. Ковалева Е.И., Яковлев А.С., Николаенко (Кегиян) М.Г., Макаров А.О., Макаров А.А. Экологическая оценка нефтезагрязненных почв с использованием энхитреид (о. Сахалин) // *Почвоведение*. – 2017. - № 3. - С. 360-369.

115. Эмирова Д.Э., Ибрагимова Э.Э. Определение острой токсичности препарата Актеллик с использованием дождевых червей в качестве биотеста // *Труды IX Международной крымской конференции «Космос и биосфера»*. - 2011. – С. 292-294.

116. Саратовских Е.А. Процессы комплексообразования в механизме токсического действия загрязняющих веществ техногенного происхождения : специальность 03.00.02 «Биофизика», 03.00.16 «Экология» : автореферат

диссертации на соискания ученой степени доктора биологических наук / Саратовских Елена Анатольевна ; Институт проблем химической физики РАН, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова. - Москва, 2008. – 45 с. – Место защиты: Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова.

117. Aboulkacem Lemtiri, Florine Degruene, Sophie Barbieux, Marie-Pierre Hiel, Marie Chelin, Nargish Parvin, Micheline Vandebol, Frédéric Francis, Gilles Colinet. Crop residue management in arable cropping systems under temperate climate. Part 1: Soil biological and chemical (phosphorus and nitrogen) properties. A review // *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. – 2016. - Vol. 20(S1). - P. 236-244.

118. Биотест-системы для задач экологического контроля : Методические рекомендации по практическому использованию стандартизированных тест-культур / Терехова В.А., Воронина Л.П., Гершкович Д.В. [и др.]. - Москва: Доброе слово. – 2014. - 48с.

119. Гаранина С.В. Изучение токсичности пестицидов с использованием тест-объекта *Daphnia magna Straus (Crustaceae, Cladocera)* // *Вісник ОНУ*. – 2003. - Т. 8. - № 1. – С. 103-109.

120. Zeynep Sarigül, Süleyman Bekcan. Herbisit Glifosatın *Daphnia magna* Üzerine Akut Toksisitesi. *Tarım Bilimleri Dergisi*. – 2009. - № 15 (2). - P. 204-208.

121. Кулагина К.В., Коровина Е.В., Шроль О.Ю., Пантелеев С.В. Чувствительность *Daphnia magna* к действию пестицидов биогенного происхождения *in vivo* // *Фундаментальные исследования*. – 2011. - № 10. - С. 99-102.

122. Кулагина К.В., Каменек В.М. Морфофизиологические особенности *Daphnia magna* в условиях влияния биологического пестицида на основе *Bacillus Thuringiensis* // V Міжнародна наукова конференція, Україна, Дніпропетровськ, ДНУ. – 2009. - С. 63-65.

123. Панченкова Г.А. Исследование хронической токсичности гербицида Раундап в ряду поколений *Daphnia magna* // Токсикологический вестник. – 2007. - № 5. - С. 14-17.

124. Буркова Е.А., Канарская З.А., Канарский А.В. Влияние токсикантов на физиологические свойства ряски малой *Lemna minor L.* // Вестник Казанского технологического университета. – 2014. - Т. 17. - № 24. - С. 129-132.

125. Ибрагимова Э.Э. *Lemna minor L.* – фитотест для определения токсичности Раундапа // Человек-Природа-Общество: Теория и практика безопасности жизнедеятельности, экологии и валеологии. – 2015. - № 1. - С. 28-32.

126. Ruth Müller, Rüdiger Berghahn and Sabine Hilt. Herbicide effects of metazachlor on duckweed (*Lemna minor and Spirodela polyrhiza*) in test systems with different trophic status and complexity // Journal of Environmental Science and Health. – Part B (Environmental Health; Pesticides). – 2010. - № 45. - P. 95–101.

127. R. Baudo, M. Foudoulakis, G. Arapis, K. Perdaen, W. Lanneau, A.-C.M. Paxinou, S. Kouvdou, G. Persoone. History and sensitivity comparison of the *Spirodela polyrhiza* microbiotest and *Lemna* toxicity tests // Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems. – 2015. - № 416. - P. 23.

128. Зубкова Т.В. Оценка последствий гербицидов Лир, ВГР и Берилл, ВГР на тест культуры: кормовую свеклу и сою // Сборник научных трудов Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства. – 2015. - Т. 1. - № 8. - С. 901-904.

129. Содбоева Ю.Ю., Батудаев А.П., Соболев В.А., Цыбиков Б.Б. Влияние гербицидов избирательного действия на биологическую активность и токсичность почвы в условиях степной зоны Бурятии // Вестник КрасГАУ. – 2018. - № 6. - С. 17-20.

130. Эмирова Д.Э. Скрининг фитотоксического действия пестицида БИ-58 на проростки *Allium cepa L* и *Zea Mays L.* // Самарский научный вестник. – 2015. - № 2(11). - С. 133-136.

131. Звягина А.С. Показатель фертильности мужского гаметофита как критерий в биотестировании влияния гербицидов на репродуктивную систему озимой мягкой пшеницы // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2014. - № 98. - С. 658-664.

132. Эмирова Д.Э., Баличиева Д.В., Ибрагимова Э.Э. Показатель стерильности мужского гаметофита *Zea Mays* как критерий палинотоксического влияния ксенобиотиков // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2010. - № 2. - С. 200-205.

133. Эмирова Д.Э. Актуальные подходы к методам биотестирования пестицидов // Человек-Природа-Общество: Теория и практика безопасности жизнедеятельности, экологии и валеологии. – 2015. - № 1. - С. 47-49.

134. Биологическая активность метилфосфонатов : влияние метилфосфоновой кислоты на гомеостаз, методы исследования : монография / О.М. Плотникова, С.Н. Лунева, А.М. Корепин [и др.] ; Министерство образования и науки Российской Федерации, Курганский государственный университет. – Курган : Курганский государственный университет, 2011. - 120с. – Библиогр.: с. 98-119. – ISBN 978-5-4217-0113-2.

135. Старостина В.К., Дегтева С.А. Холинэстераза: методы анализа и диагностическое значение : информационно-методическое пособие / В.К. Старостина, С.А. Дегтева. – Новосибирск : ЗАО «Вектор-Бест», 2008. - 35 с. – Библиогр.: с. 32-34. – 1000 экз.

136. Плотникова О.М., Корепин А.М., Матвеев Н.Н, Лунева С.Н., Биохимические показатели крови в оценке влияния метилфосфоната на лабораторных мышей в долговременном эксперименте // Теоретическая и прикладная экология. – 2011. - № 3. - С. 65-70.

137. Запорожец Т.С., Иванушко Л.А., Гажа А.К., Михеев Е.В., Ковалев Н.Н. Влияние фосфорорганических соединений на факторы врожденного иммунитета мышей // Биомедицина. – 2013. - № 1. - С. 36-47.

138. Камилов Ф.Х. Патохимия токсического действия хлорорганических и ароматических соединений // Медицинский вестник Башкортостана. – 2007. – Т. 2. - № 6. - С. 76-80.

139. Плотника О.М., Рыкова А.И., Зернова Е.Е. Проблемы применения гербицида глифосата // В книге: XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Тезисы докладов в 5 томах. Уральское отделение Российской академии наук. – 2016. – С. 537.

140. Саратовских Е.А., Козлова Н.Б. Изучение аккумуляции пестицидов в жирной фазе // Токсикологический вестник. – 2008. - № 1. - С. 29-34.

141. Саратовских Е.А., Психа Б.Л., Гвоздев Р.И., Скурлатов Ю.И. Кинетическая модель процесса переноса техногенных загрязняющих веществ через липосомальные мембраны // Химическая физика. – 2008. – Т. 27. - № 7. - С. 59-65.

142. Саратовских Е.А., Глазер В.М., Костромина Н.Ю., Котелевцев С.В. Генотоксичность пестицидов в тесте Эймса и их способность к образованию комплексов с ДНК // Экологическая генетика. – 2003. – Т. V. - № 3. - С. 46-54.

143. Карамова Н.С., Денисова А.П., Сташевски З. Оценка мутагенной активности пестицидов: актара, зенкор, моспилан, пенкоцеб, фастак в тесте Эймса // Экологическая генетика. – 2008. – Т. VI. - № 4. - С.29-33.

144. Максимовских С.Ю., Кудрин Б.И., Евдокимов А.Н., Плотникова О.М. Исследование острой токсичности глифосата // Материалы LIV международной научно-технической конференции «Достижения науки – агропромышленному производству», часть V, Челябинск. – 2015. - С. 140-144.

145. Мирошникова Д.И., Кирюшин В.А., Моталова Т.В. Вопросы применения гербицидов на основе глифосата // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2018. – Т. 6. - № 2. - С. 318-325.

146. Дмухальская Е.Б. Состояние иммунной системы в крыс разного возраста при действии тяжелых металлов и Раундапа // Universum: Химия и биология. – 2018. - № 9(51). – С. 4-6.

147. Максимовских С.Ю., Кудрин Б.И., Плотникова О.М. Изменение морфологических и биохимических параметров крови мелких млекопитающих под влиянием глифосата // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2015. - № (54). - С. 93-95.

148. Ахметченко З.А., Муфазалова Н.А., Муфазалова Л.Ф., Ремезова А.Д., Мухаметзянова А.Я. Функциональное состояние нейтрофилов при интоксикации аминной солью 2,4-дихлорфениоксиуксусной кислотой // Казанский медицинский журнал. – 2013. – Т. 95. - № 5. - С. 649-651.

149. Муфазалова Н.А., Ахметченко З.А., Камилов Ф.Х., Муфазалова Л.Ф., Гильманова Э.А. Эффективность применения тактивина, миелопида и токоферола для коррекции иммуотоксических эффектов гербицида 2,4-ДА // Башкирский экологический вестник. – 2010. - № 1. - С. 14-15.

150. Музафалова Н.А. Фармакологическая коррекция иммуно- и гепатотоксических эффектов ксенобиотиков : специальность 14.00.25 «Фармакология, клиническая фармакология» : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Мурзафалова Наталья Альбертовна ; Башкирский государственный медицинский университет. - Уфа, 2002. – 52 с. - Место защиты: Башкирский государственный медицинский университет.

151. Ахметченко З.А., Муфазалова Н.А., Муфазалова Л.Ф., Ремезова А.Д., Мухаметзянова А.Я. Эффективность тактивина и токоферола для коррекции гепатотоксического действия аминной соли 2,4-дихлорфениоксиуксусной кислоты // Казанский медицинский журнал. – 2013. – Т. 94. - № 5. - С. 651-655.

152. Чеснокова Л.А., Михайлова И.В., Карманова Д.С. Влияние органических и неорганических экотоксикантов на некоторые показатели иммунной системы крыс // Известия Оренбургского государственного университета. – 2015. - № 6(56). - С. 252-254.

153. Плотникова О.М., Корепин А.М., Матвеев Н.М., Лунева С.Н. Маркеры эндогенной интоксикации в крови лабораторных мышей при

интоксикации различными дозами метилфосфоната // Челябинский государственный педагогический институт. – 2011. - № 2. - С. 346-353.

154. Зернова Е.Е., Плотникова О.М. Изменение показателей перекисного окисления белков и липидов у лабораторных мышей под влиянием N-(фосфонометил)-глицина // Актуальные проблемы региональной экологии и биодиагностика живых систем : Материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Книга 1. (г. Киров, 1-2 декабря 2015г.). - Киров: Изд-во ООО «Веси». – 2015. - С. 193-196.

155. Плотникова О.М., Матвеев Н.Н., Корепин А.М., Дуплякина И.В. Биохимические показатели лабораторных мышей в зависимости от времени интоксикации метилфосфонатом // Теоретическая и прикладная экология. – 2010. - № 1. - С. 81-86.

156. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г. Иммунотоксикология ксенобиотиков : [монография] / Павел Франкович Забродский, Владимир Григорьевич Мандыч. - СВИБХБ, 2007. - 420 с. – Библиогр.: с. 384-435.- 500 экз. - ISBN 978-5-91272-254-7.

157. Илюшина Н.А., Масальцев Г.В., Аверьянова Н.С. Оценка повреждений ДНК в клетках млекопитающих *in vivo* при действии глифосата // Научно-медицинский вестник Центрального Черноземья. – 2018. - № 73. - С. 31-36.

158. Редька О.Г. Морфологічні аспекти реакції тиротропів аденогіпофіза, явнаслідок хронічної інтоксикації малими дозами пестициду 2,4 Д // Таврический медико-биологический вестник. – 2010. – Т. 13. - № 1(49). – С. 161-164.

159. Редька О.Г. Деякі особливості виникнення структурно-функціональних змін в системі аденогіпофіз – щитовидна залоза при дії на організм хлорфеноксігербіциду 2,4 Д // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского серия «Биология, химия». – 2010. – Т. 23(62). - № 1. - С. 100-104.

160. Цветкова Я.А., Костиленко Ю.П. Морфологічні зміни в печінці щурів при хронічній інтоксикації пестицидом аміної сіллю 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти та корекція їх комплексом антиоксидантів // Світ медицини та біології. – 2010. - № 1. - С. 67-69.

161. МУК 4.1.1978-05 Определение остаточных количеств глифосата в зерне и масле сои, семенах и масле подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии : утвержден Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г.Онищенко 21 апреля 2005 г. : дата введения 2005-07-01. – Москва.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008.

162. Патент № RU 2520144 С1 Российская Федерация, МПК С05F 3/00 (2006.01), С05F 11/02 (2006.01). Способ получения жидкого гуминового удобрения : № 2013101108/13 ; заявл. 09.01.2013 : опубликовано 20.06.2014 / Фомичева Н.В., Рабинович Г.Ю. ; заявитель ГНУ ВНИИМЗ Россельхозакадемии. - 11 с. : ил.

163. Симонян Г.А., Хисамутдинов Ф.Ф. Ветеринарная гематология. – Москва : Колос, 1995. - 256с. – ISBN 5-10-002948-X.

164. Методические указания по патоморфологической диагностике болезней животных, птиц и рыб в ветеринарных лабораториях № 13-7-2/2137 : издание официальное : Утв. Департаментом ветеринарии МСХ России 11.09.00г.

165. Методические указания по патогистологической технике : Утв. Управлением ветеринарии МСХ РФ 04.10.2005.

166. Хребтова О.М. Биотестирование глауконита на инфузориях // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Сер.: Естественные и медицинские науки. – 2016. - № 2. - С. 73-76.

167. Черемных Е.Г., Кулешин А.В., Кулешина О.Н. Биотестирование пищевых добавок на инфузориях // Вестник РУДН. Сер.: Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2011. - № 3. - С. 5-12.

168. Черемных Е.Г., Тихомирова Н.А., Игнатъева О.Н. Биотестирование пищевых добавок и молочных продуктов // Молочная промышленность. – 2009. - № 10. - С. 36-38.

169. Потапов П.П., Рулева Т.Н., Мезенова О.Я. Исследование реакций инфузории *Stylonychia mytilus* на факторы безопасности стерилизованных консервов по содержанию бенз(а)пирена // Известия ВУЗов. Пищевая технология. – 2010. - № 5-6. - С. 88-91.

170. Виноходов Д.О. Научные основы биотестирования с использованием инфузорий : специальность 03.00.23 «Биотехнология» : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук / Виноходов Дмитрий Олегович ; Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования. Санкт-Петербург, 2007. – 40 с. – Место защиты: Санкт-Петербургский Государственный технологический институт (технический университет).

171. Серавин Л.Н. Простейшие... Что это такое? – Ленинград: Наука, 1984. - 176 с. – Библиогр.: с. 170-173. - 26200 экз.

172. Гроздов А. Методы определения общей токсичности кормов и сырья // Комбикорма. – 2000. - №4. - С. 28-30.

173. Двухватская К.П., Плотникова О.М. Экотоксикологическая оценка растворов глифосата с помощью инфузорий как тест-объекта // Актуальные проблемы региональной экологии и биодиагностика живых систем: Материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Книга 2. (г. Киров, 1-2 декабря 2015 г.). Киров: Изд-во ООО «Веси». – 2015. С. 262-263.

174. Жилияков Е.В. Основы токсикологии. Учебно-методическое пособие к выполнению практических работ / Е.В. Жилияков, В.П. Скипин, В.П. Латенков – Тюмень: РИО ФГБОУ ВПО «ТюмГАСУ», 2015. - 171 с.

175. Применение пестицидов в 2018 году // Информационный листок Россельхозцентра. – 2019. - № 9.

176. Спиридонов Ю. Этому гербициду пора памятник ставить... // Поле Августа. – 2004. - № 3 (14). - С. 5.

177. Столяр Л. Глифосаты: как применять правильно? // Поле Августа. - 2016. - № 6 (152). - С. 10 - 11.

178. ГОСТ 33379-2015. Удобрения органические. Методы определения наличия патогенных и условно-патогенных микроорганизмов = Organic fertilizers Methods for determining the presence of pathogenic and potentially pathogenic microorganisms : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 ноября 2015 г. N 1802-ст : введен впервые : дата введения 2017-01-01 / разработан Федеральным государственным бюджетным научным учреждением "Всероссийский научно-исследовательский институт органических удобрений и торфа" (ФГБНУ "ВНИИОУ") и Федеральным государственным бюджетным научным учреждением "Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии" (ФГБНУ "ВНИИВСГЭ"). – Москва : Стандартинформ, 2016. – 27 с.

179. Pereira J.L., Picanco M.C., Silva et al. Effects of glyphosate and endosulfan on soil microorganisms in Soybean crop // Planta Daninha. – 2008. - Vol. 26. - № 4. - P. 825-830.

180. Кононова С.В., Несмеянова М.А. Фосфонаты и их деградация микроорганизмами // Биохимия. – 2002. - Т. 67. - № 2. - С. 220-233.

181. Чадаев В.Е. Модельные объекты в медицине и ветеринарии // Вісник проблем біології і медицини. – 2012. - Т. 2 (95). - № 3. - С. 140-144.

182. Тепаева В.А., Жерихова Я.Н., Колотова А.А., Лапаева А.А., Цыбина А.Н. Лабораторная мышь, как модельный объект в биологии и медицине // Актуальные вопросы биологических исследований: X Международная студенческая конференция. г. Волгоград: Волгоградский государственный медицинский университет. - 2018.

183. Попова Н.А. Модели экспериментальной онкологии // Соросовский образовательный журнал. – 2000. - Т. 6. - № 8. - С. 33-38.

184. Показатели крови и костного мозга у здоровых животных / Учебное пособие для ветеринарных врачей. Справочные таблицы составлены Кудрявцевым А.А., Кудрявцевой Л.А. - Москва: Типография Московской ветеринарной академии, 1968. - 46с.

185. Прозоровский В.Б., Скопичев В.Г. Дистантное действие в патогенезе отравлений фосфорорганическими соединениями // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2004. – Т. 3. - № 3. – С. 56 – 67.

186. Пономарева А.А., Рахматуллина Д.Ф., Газизова Н.И., Минибаева Ф.В. Динамические преобразования митохондрий при действии митохондриальных ядов // Научный журнал «Известия КГТУ». – 2014. - № 34. - С. 175 – 180.