

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

_____ Т.Г. Волова
подпись инициалы, фамилия

« 26 »

июня 2020_г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01— Биология

«Влияние агропрепаратов, депонированных в разрушаемую основу из П(ЗГБ)
и наполнителя, на микрофлору почвы в полевых условиях»

Руководитель

подпись, дата

д-р биол. наук

должность, ученая степень

С. В. Прудникова

инициалы, фамилия

Выпускник

подпись, дата

Д. А. Демьянчук

инициалы, фамилия

Красноярск 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. Литературный обзор	6
1.1 Пестициды в сельском хозяйстве: применение и проблемы.....	6
1.2 Адресная доставка пестицидов.....	8
1.3 Полигидроксиалканоаты в качестве разрушаемой основы для доставки пестицидов.....	9
1.3.1 Характеристика ПГА.....	9
1.3.2 Биологическая деградация ПГА.....	10
1.4 Агропрепараты с системой доставки на основе ПГА	11
2.Материалы и методы	14
2.1 Объекты исследования и план эксперимента	14
2.2 Определение численности микроорганизмов в почвенных образцах....	15
3. Результаты.....	17
3.1 Влияние различных форм метрибузина и трибенурон-метила на численность почвенных бактерий при выращивании свеклы.....	17
3.2 Влияние различных форм метрибузина и трибенурон-метила на численность микромицетов при выращивании свеклы	20
3.3 Влияние различных форм метрибузина и трибенурон-метила на численность почвенных бактерий при выращивании томатов	22
3.4 Влияние различных форм метрибузина и трибенурон-метила на численность микромицетов при выращивании томатов.....	23
3.5 Влияние различных форм метрибузина и трибенурон-метила на эколого-трофические группы бактерий при выращивании свеклы и томат/.....	25
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	29

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	30
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	31

ВВЕДЕНИЕ

Для современного сельскохозяйственного производства характерно использование большого количества химических веществ (пестицидов) для защиты урожая от вредителей, сорняков и возбудителей болезней растений. Внесение большого количества химикатов приводит к новым проблемам, требующим разрешения. Пестициды могут оказывать токсическое действие на почвенную биоту. Изменения ряда показателей, таких как, биомасса микроорганизмов, продуктивность микрофлоры, ее видовое разнообразие, оптимальное соотношение продуцентов и сапрофитов, может привести к нарушению воспроизводства гумуса и самоочищения почвы, что приводит к снижению плодородия почвы. Длительное применение пестицидов снижает биогенность почвы. Пестициды могут накапливаться в среде, включаться в пищевые цепи, чем наносят вред экосистемам и здоровью человека [9]. В связи с этим требуется сокращение внесения агрохимикатов. Данную проблему возможно решить разработкой препаратов адресной доставки [23].

В качестве основы для создания пролонгированных препаратов с адресной доставкой большое внимание уделяется полигидроксиалканоатам (ПГА) – биоразрушаемым бактериальным полимерам, обладающим полезными свойствами: экологической совместимостью, длительной сохраняемостью и контролируемой деструкцией, химической совместимостью с пестицидными веществами, снижением мобильности пестицидов в почве, которые позволяют использовать их в качестве носителей различных веществ [38]. ПГА несут потенциальную возможность создания препаратов контролируемого высвобождения пестицидов, а также сокращение количества вносимых веществ [23].

Цель работы:

Провести микробиологический анализ образцов почвы, обрабатываемых разными формами гербицидов метрибузина и трибенурон-метила: депонированными и в традиционной форме.

Для достижения цели требуется решить следующие **задачи**:

1. Определить численность бактерий и микроскопических грибов в почве при выращивании свеклы и томатов в открытом грунте с обработкой гербицидами.

2. Оценить влияние метрибузина и трибенурон-метила в растворенном виде и депонированных в смесовую основу из поли(3-гидроксибутирата) и березовых опилок, на количественный состав микрофлоры почвы при выращивании сельскохозяйственных растений.

1. Литературный обзор

1.1 Пестициды в сельском хозяйстве: применение и проблемы

Развитие химической промышленности способствовало решению ряда проблем в мировом земледелии. Для защиты сельскохозяйственных культур от вредителей, сорняков и болезней повсеместно используются пестициды. Они являются одним из важнейших средств получения неизменно высоких урожаев. Во всем мире, по данным 2015 года, при использовании пестицидов, до 40% выращиваемых культур уничтожается вредителями и болезнями [28]. Достойной альтернативы замены пестицидам пока нет, тем более при постоянно растущем населении. По прогнозам на 2050 год число людей возрастет до 9,7 млрд [27], это значит, что, потребность в продуктах только возрастет.

Однако применение пестицидов приводит к другим проблемам, связанным с их миграционной способностью и накоплением в биосфере посредством аккумуляции в трофических цепях [11].

Одним из неблагоприятных последствий применения пестицидов, является попадание их в почву, в воду и в продукты питания. Пестициды и их метаболиты могут передвигаться по почвенному профилю в горизонтальном и вертикальном направлениях. Процесс возможен благодаря молекулярной диффузии, нисходящего тока воды, корневой системы растений и в результате обработки почвы. На более значительные расстояния пестициды передвигаются с током воды, после дождя или орошения. Скорость и глубина вертикального перемещения зависят от растворимости препарата, особенностей его адсорбции и десорбции, летучести, а также от интенсивности испарения почвенной влаги. При продолжительном дожде или орошении слабо адсорбируемые гидрофильные вещества движутся вниз по профилю почвы вместе с водой [14, 18].

Проводились исследования гербицида метрибузина, препарата, обладающего хорошей растворимостью в воде и слабой сорбцией почвами, а следовательно, потенциально высокой миграционной способностью. Было обнаружено, что метрибузин является одним из самых подвижных гербицидов, а также установлена его способность загрязнять грунтовые воды [11]. Это говорит о возможности аккумуляции пестицидов в трофических цепях и, как следствие об их влиянии на самые разнообразные эколого-трофические группы.

Применение пестицидов может приводить к перестройке микрофлоры в почве. Одни препараты действуют, угнетая одни группы микроорганизмов и стимулируя размножение других, представители которых продуцируют фитотоксические вещества. Это обстоятельство ставит под угрозу сохранение плодородия земель на длительный период [7]. Использование пестицидов оказывает влияние на группы почвенных микроорганизмов, изменяя их соотношение, а также видовой состав. Также было установлено, что применение химических средств защиты растений в допустимых концентрациях приводит к снижению численности аммонифицирующих бактерий, сдвигу микроценоза целлюлозоразрушающих микроорганизмов в почве. Кроме того, пестициды не только обуславливают токсичность почвы, но и аккумулируются в корневой системе и конечной продукции, что приводит к получению экологически неполноценной продукции [8, 22].

Кроме того, чрезмерное использование агропрепаратов приводит к возникновению устойчивости у видов-вредителей, что приводит к накоплению в почве токсичных веществ [14, 35]. Это ведет к потере растительной биомассы и снижению биоразнообразия [5], а также к превышению допустимых норм их содержания в продуктах питания, и, следовательно, несут вред здоровью человека [33, 39].

Было обнаружено, что стабильное поступление метрибузина в организм мыши вызывало значительное снижение массы тела, потребления пищи и неблагоприятные изменения биохимических параметров, таких как

повышение уровня глюкозы в плазме, триглицеридов, мочевины, креатинина. Воздействие метрибузина приводит к физиологическим нарушениям даже при низких концентрациях. Также связывают риск возникновения дисфункции щитовидной железы с воздействием пестицидов на организм человека [25, 32].

Таким образом, пестициды способны мигрировать и оказывать влияние на все эколого-трофические группы, нарушают стабильность агросистем и несут вред для потребителя.

1.2 Адресная доставка пестицидов

Новые проблемы требуют поиска новых решений. Одним из направлений исследований в этой области является разработка новых агропрепаратов с адресной контролируемой доставкой, которая осуществляется благодаря использованию биоразрушаемой основы или покрытию [4].

Под контролируемым высвобождением имеют в виду контроль скорости высвобождения активного вещества для поддержания заданного уровня концентрации вещества за счет изменения скорости деградации полимерной основы, в которой находится данное вещество [36]. Контролируемая доставка позволяет избежать потери вещества в результате биологического или фотолитического разложения, а также вымывания [26]. Из-за быстрого вымывания пестицидов загрязняются грунтовые воды, и как было сказано выше, они накапливаются в большом количестве на разных эколого-трофических группах и несут вред. Использование депонированных в ПГА пестицидов может свести их применение к минимуму [23].

Предпосылкой к созданию депонированных препаратов также стало появление полимерных материалов, обладающих полезными свойствами: экологической совместимостью, то есть деструкцией без образования токсических веществ; длительной сохраняемостью в природе; химической совместимостью с препаратами сельскохозяйственного назначения.

Отмечаются такие преимущества использования систем контролируемого выхода пестицидов по сравнению с использованием обычных препаратов, как сокращение объемов обработки и снижение загрязнения среды благодаря пролонгированному действию препаратов и снижению их мобильности [5].

Этими характеристиками обладают активно исследуемые в настоящее время биodeградируемые полимеры — полигидроксиалканоаты (ПГА), получаемые путем прямой ферментации, которые могут найти применение в создании нового класса агропрепаратов [3].

1.3 Полигидроксиалканоаты в качестве разрушаемой основы для доставки пестицидов

1.3.1 Характеристика ПГА

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – полиэфиры, синтезируемые бактериями, в качестве внутриклеточного запасного вещества. Его мономерами является масляная кислота [26].

ПГА получают при культивировании бактерий в различных условиях питания, обычно при лимитировании азота, фосфора, серы, кислорода или магния, или при избытке предшественников полимеров. К микроорганизмам, синтезируемым ПГА, относятся некоторые грамположительные и грамотрицательные бактерии. Микроорганизмы способны накапливать ПГА и в присутствии высоких концентраций питательных веществ. Бактерии накапливают эти полиэфиры внутриклеточно в виде подвижных, жидких гранул [1].

Эти полимеры близки с синтетическими полимерам по некоторым физико-химическим свойствам. ПГА прочные, термопластичные, не растворимые в воде, но в то же время способны быстро разлагаться, не выделяя токсических веществ в окружающую среду. Как уже отмечалось, полигидроксиалканоаты бактерий биосовместимы и биоразрушаемы. В этих процессах деструкции полимеров основную роль играют микроорганизмы, которые ассимилируют органические соединения, обеспечивая их разложения

и последующее участие в круговороте веществ. Их конечными продуктами распада являются диоксид углерода и вода. Поэтому, полигидроксиалканоаты открывают возможности для создания новых препаратов для сельского хозяйства [3, 29].

Первым из семейства ПГА был обнаружен поли-3-гидроксибутират (ПЗГБ) – гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты, представляющий собой полиэфир с регулярными, повторяющимися единицами ($C_4H_6O_2$) [24]. ПЗГБ был обнаружен в *Bacillus megaterium* в 1926 году. ПЗГБ является биоразлагаемым, сильно гидрофобным термопластичным материалом, содержащим около 80% кристаллической фракции [30].

Большое внимание также уделяется изучению сополимеров 3-гидроксибутирата с 3-гидроксивалератом (ПЗГБ/ЗГВ) и другими мономерами [4]. Свойства полимеров, в том числе скорость биodeградации, варьируются в зависимости от типа мономеров и их соотношения [24]. Это позволяет создавать матрицы для депонирования с разной скоростью выхода действующего вещества. Таким образом, ПГА имеют потенциал для создания материалов в различных отраслевых областях.

1.3.2 Биологическая деградация ПГА

Как уже было замечено, биodeградация ПГА – наиболее ценное его свойство. Полигидроксиалканоаты разрушаются гидролитически при участии деполимераз с образованием диоксида углерода и воды в аэробных условиях, метана и воды в анаэробных условиях.

Деградация ПГА происходит за счет разрушения С-цепей, и степень деструкции оценивают по уменьшению молекулярной массы полимера, степени кристалличности, изменение веса полимерных изделий и их прочности. Также предполагается, что деструкция может происходить внутриклеточно при участии эндополимераз. Биodeградация зависит от состава микробиологического сообщества среды, где происходит деструкция [3].

Среди микроорганизмов, способных разрушать ПГА, обнаружены широко распространённые почвенные бактерии *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Streptomyces*, *Ilyobacter*; грибы *Deuteromycetes*, *Basidiomycetes*, *Ascomycetes* [5, 21].

Кроме того, показано увеличение микроорганизмов на поверхности полимерных образцов. Увеличение количества бактерий, обусловлено тем, что ПГА, как источник питания стимулирует развитие микроорганизмов в почве [21]. Присутствие полигидроксиалканоев в почве стимулирует развитие копиотрофов и прототрофов, что является показателем активной деструкции ПГА в почве и накопления продуктов распада ПГА в виде ди- и мономеров. Можно сделать вывод, что на поверхности полимерных образцов образуется микробиоценоз, отличающийся от микробиоценоза почвы без внесенных в нее депонированных форм пестицидов [2, 26].

Также есть данные о влиянии ультрафиолетового облучения на степень деструкции ПГА, что делает ПГА перспективным материалом в качестве биоразлагаемой основы для различных изделий сельскохозяйственного применения [5].

1.4 Агропрепараты с системой доставки на основе ПГА

Сравнительно недолгое время ведутся разработки современных агропрепаратов, которые бы оказывали повышенные защитные свойства и при том не оказывали на них токсическое действие и не подавляли бы рост сельскохозяйственных культур.

Важным направлением исследований является разработка агропрепаратов против фитопатогенных грибов, которые являются причиной около 10% потеря урожая. Среди современных фунгицидов триазолы занимают особое место. Одним из них является тебуконазол, используемый для защиты таких сельскохозяйственных культур, как кукуруза, пшеница, рис, ячмень, рапс, виноград против гнили, мучнистой росы. Данный препарат потенциально фитотоксичен, применение фунгицида препятствует росту

растений и создает угрозу здоровью людей и окружающей среде. Исследования, направленные на разработку препаратов с контролируемой доставкой тебуконазола были начаты совсем недавно. В качестве основы для депонирования препарата в разных исследованиях представлены микрочастицами и микрокапсулами из полиметилметакрилата и поли (стирол-малеинового ангидрида), этилцеллюлозы; кремнеземные наносферы, пленки микрогранулы и пеллеты из ПГА [20, 34, 43]. В исследованиях, где в качестве основы для препарата был выбран поли-3-гидроксibuтират в форме пленок и микрогранул, наблюдалась большая эффективность подавления фузариума, провоцирующего корневую гниль, на более поздних стадиях его развития по сравнению с коммерческим препаратом, не загруженного в полимерную основу. Также в этом исследовании отмечается увеличение длительности действия препарата, депонированного в основу из поли-3-гидроксibuтирата. Продолжительное действие препарата связано с деградацией полимера и постепенным выходу из него препарата [37, 40].

Эффективность медленно высвобождаемого препаратов проверялась уже при исследовании гербицидов, 47,5% которых, от общего числа используемых пестицидов каждый год в борьбе с сорными растениями, вызывающими от 10 до 15% потерь урожая [19]. Исследование показывает, что высвобождение метрибузина, встроенного в полимерную матрицу поли-3-гидроксibuтирата в форме микрочастиц, пленки, гранул и микрогранул, можно контролировать с помощью различных методов конструирования составов и путем изменения количества гербицида, а накопление его в почве происходит постепенно, так как полимер разрушается со временем. Стоит отметить, что было обнаружено повышение сапротрофных микроорганизмов. Это свидетельствует об участии микроорганизмов в деструкции полимерной основы, то есть она является дополнительным источником питания [42]. Открывается возможность регулирования скорости высвобождения пестицидов. Биodeградация ПГА является важным преимуществом при

создании современных агропрепаратов с адресной доставкой, которая позволит решить проблему сверхнагруженности экосистем пестицидами.

Помимо количества химического вещества, содержащегося в полимерной основе, на скорость высвобождения влияет форма основы - гранулы или пеллеты. Гербицидные составные препараты в основе из ПГА позволили медленно высвобождать активные ингредиенты в почву. Гербицид также значительно повлиял на скорость его высвобождения, которая в данном случае зависит от растворимости химиката. Так, трибенурон-метил высвобождается из полимерной основы с большей скоростью, чем менее легко растворимый феноксапроп-П-этил. Поскольку наиболее растворимые пестициды высвобождаются быстрее из основы, а также подвергаются более быстрому вымыванию, проверялось влияние на скорость высвобождения метрибузина за счет дополнительных наполнителей, таких как торф, глина и древесные опилки. Использование подобных агропрепаратов привело к длительному, до 3 месяцев, высвобождению и длительному действию неустойчивых сильно растворимых пестицидов, таких как метрибузин и трибенурон-метил [31].

Таким образом, скорость выпуска целевого вещества может регулироваться изменением его количества в полимерной основе, а также за счет добавления дополнительных наполнителей. При производстве следует учитывать растворимость пестицида, которая также обуславливает скорость его высвобождения. Главным преимуществом ПГА в создании сельскохозяйственных препаратов является то, что они подвергаются деструкции в почве при участии бактерий, что способствует их постепенному высвобождению в почву.

2. Материалы и методы

2.1 Объекты исследования и план эксперимента

Объектом исследования была почвенная микрофлора, взятая с опытных участков, на которых выращивали свеклу и томаты (рис. 1). Депонированные препараты гербицидного действия – гранулы метрибузина и трибенурон-метила – вносили в почву при высадке растений. Состав гранул: ПЗГБ/древесные опилки/гербицид, процентное соотношение компонентов 50/40/10. В качестве положительного контроля препараты вносили традиционным способом, рекомендованным для полевого применения. Для этого проводили послевсходовую обработку растений раствором соответствующего гербицида после появления сорняков. В отрицательном контроле обработку почвы и растений гербицидами не проводили.



Рисунок 1 – Опытные участки для испытаний экспериментальных форм гербицидов

Таким образом, всего было 5 вариантов, далее обозначенных следующим образом:

- "К(-)" – отрицательный контроль, без обработки гербицидами;
- "МЕТ К(+)" и "ТРБ К(+)" – положительные контроли, послевсходовая обработка соответствующими гербицидами методом опрыскивания;

- "МЕТ гран" и "ТРБ гран" – экспериментальные формы долговременных гербицидов, вносимые в почву в виде гранул.

Отбор образцов почвы проводили в момент высадки растений (исходная почва) и далее в динамике через 15, 35, 49 и 120 суток на опытных участках со свеклой и через 14 и 28 суток – на участках с томатами. График отбора образцов представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Схема отбора образцов почвы на опытных участках

22 мая	6 июня	27 июня	10 июля	20 сентября
Исходная почва	Свекла, 15 суток	Свекла 35 суток Томаты 14 суток	Свекла 49 суток Томаты 28 суток	Свекла 120 суток

2.2 Определение численности микроорганизмов в почвенных образцах

Подсчет общей численности микроорганизмов проводили методом Коха [15]. Количество аммонифицирующих копиотрофных бактерий определяли на мясопептонном агаре (Nutrient agar, HiMedia), прототрофных – на крахмало-аммиачном агаре (КАА), олиготрофных – на почвенном агаре (ПА), азотфиксирующих – на среде Эшби, численность микромицетов – на агаре Сабуро.

Состав сред из расчета на 1 л воды:

- КАА: растворимый крахмал – 10г, $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ – 2г, K_2HPO_4 – 1г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1г, NaCl – 1г, CaCO_3 – 3г, агар – 15г.
- ПА: 500 г почвы заливали 1,5 л водопроводной воды и автоклавировали 30 минут при 1 атм. Полученный экстракт фильтровали через бумажный фильтр, добавляли CaCO_3 - 0,5г, K_2HPO_4 - 0,2г, агар - 15г на литр.
- Среда Эшби: маннит – 20г, K_2HPO_4 – 0.2г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2г, NaCl – 0.2г, K_2SO_4 – 0.1г, CaCO_3 – 5г, агар – 20г.

Производили посев почвенной суспензии из разведений 10^{-5} , 10^{-6} и 10^{-7} в трёхкратной повторности. Чашки инкубировали в термостате при температуре 30°C в течение 3-7 суток.

Общую численность микромицетов определяли посевом на агар Сабуро (Sabouraud agar, HiMedia) с бензилпенициллином для подавления роста бактерий. Посев производили из разведений почвенной суспензии до 10^{-3} в трехкратной повторности. Чашки инкубировали при температуре 25°C в течение 7-10 суток.

3. Результаты

3.1 Влияние различных форм метрибузина и трибенурон-метила на численность почвенных бактерий при выращивании свеклы

Численность копитрофных бактерий в исходной почве составляла $(57,67 \pm 10,57) \times 10^6$ КОЕ/г.

На рисунке 3 представлены данные, демонстрирующие изменение численности бактерий в ризосфере растений свеклы с течением времени. На 15 сутки наблюдается снижение численности бактерий до $(1,15 \pm 0,40) \times 10^6$ КОЕ/г по сравнению с исходной почвой. Это связано с отсутствием дождей и низкой влажностью почвы. Тем не менее, в варианте с внесением гранул с трибенуроном количество бактерий в почве превышало численность в отрицательном контроле и в варианте с гранулами МЕТ.

На 35 сутки в отрицательном контроле наблюдали прирост до $(12,46 \pm 4,15) \times 10^6$ КОЕ/г, обусловленный увеличением влажности почвы. Достоверное увеличение численности бактерий в 3,5-6 раз по сравнению с контролем наблюдали на всех экспериментальных участках с внесением гербицидов.

На 49 сутки отмечено очередное снижение численности бактерий во всех вариантах. Такие колебания, возможно, связаны с повышением температуры атмосферы, нагревом и иссушением почвы.

В дальнейшем наблюдается повышение количества бактерий в отрицательном контроле до $(271,04 \pm 57,29) \times 10^6$ КОЕ/г на 120 сутки. Аналогичная тенденция роста численности бактерий прослеживается и при внесении гербицидов, что связано с сезонными явлениями: высокой влажностью почвы в осенний период, поступлением растительного опада и корневых выделений, привлекающих микрофлору ризосферы.

Зависимость численности микроорганизмов от внешних условий можно увидеть при сравнении графика изменения температуры и влажности (рис. 2) с графиком численности (рис. 3).

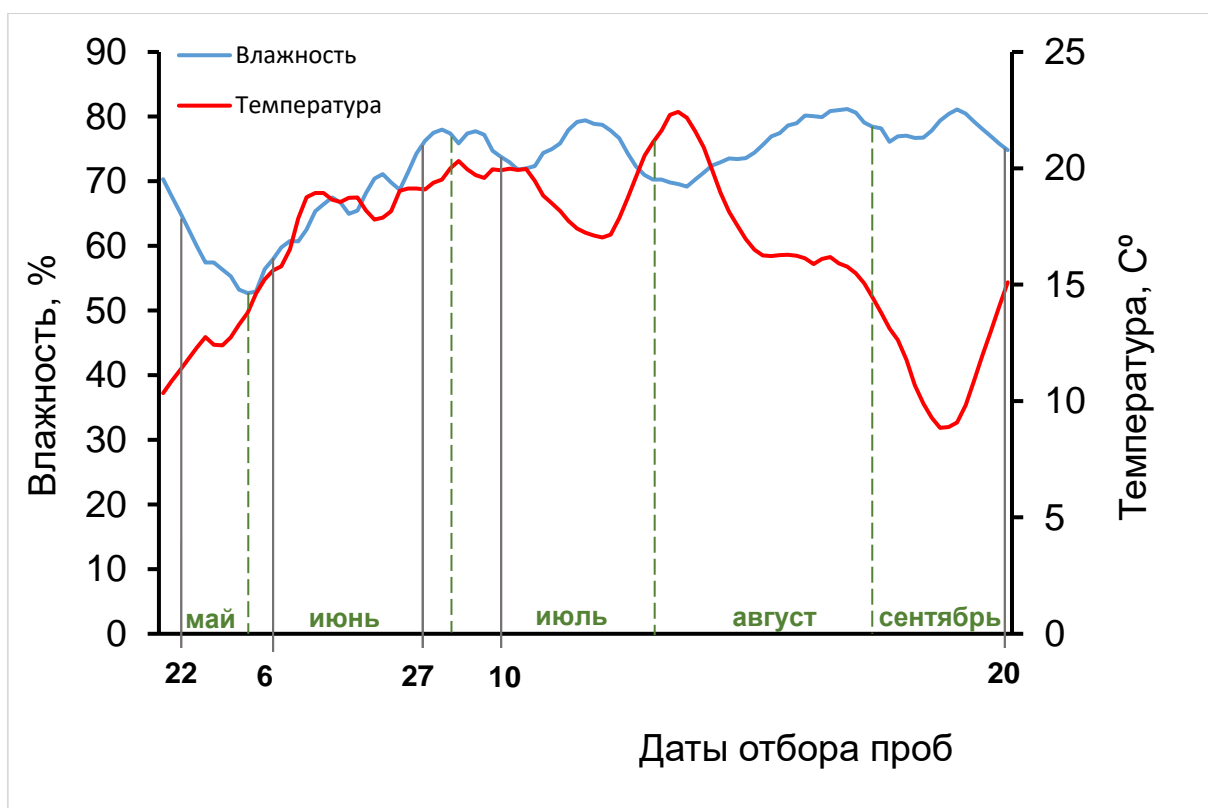


Рисунок 2 – Изменение температуры и влажности во время эксперимента

При внесении метрибузина в почву в чистом виде спустя 35 и 49 суток не наблюдается значительного изменения численности бактерий в сравнении с отрицательным контролем. На 120 сутки наблюдается снижение численности бактерий в 6,2 раза по сравнению с контролем отрицательным. Можно предположить, что гербицид метрибузин угнетает жизнедеятельность копиотрофов.

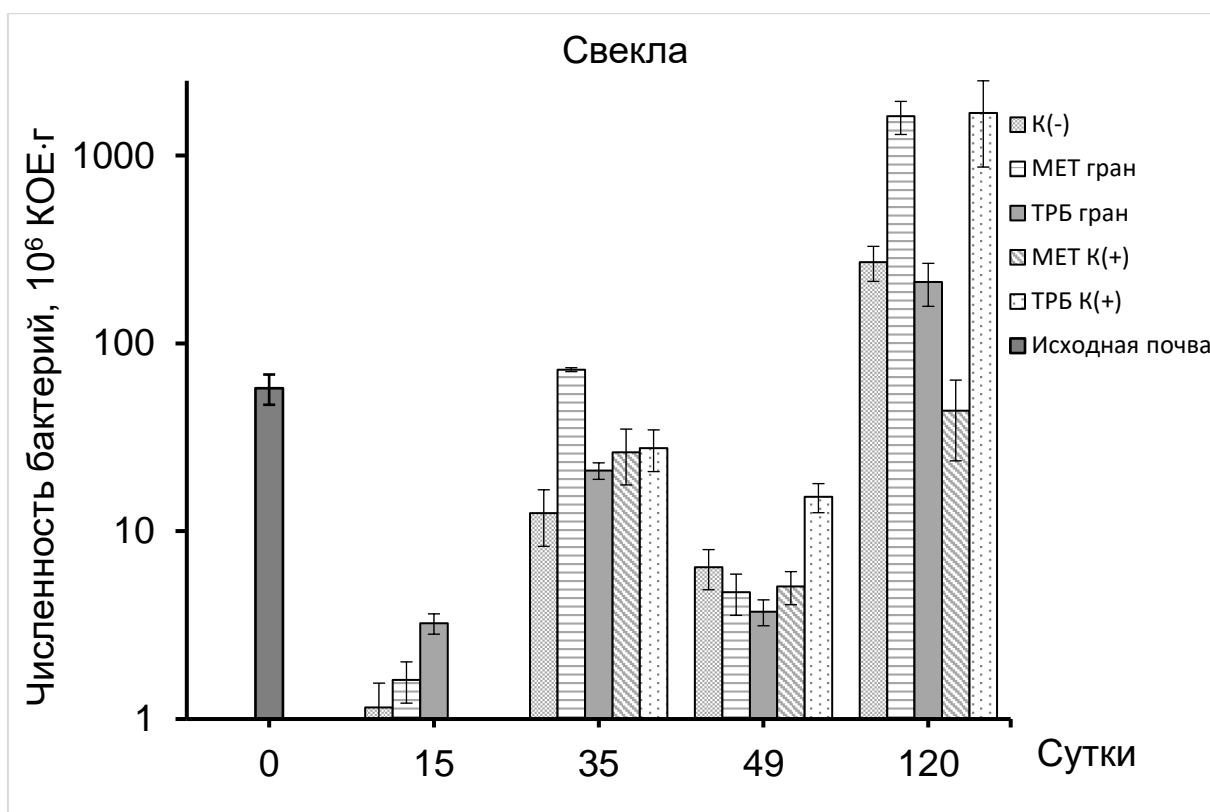


Рисунок 3 – Влияние различных форм метрибузина и трибенурон-метила на общую численность ризосферных бактерий при выращивании свеклы

Использование депонированной формы метрибузина привело к значительному повышению численности копиотрофных бактерий в почве спустя 35 и 120 суток выращивания свеклы: $(72,43 \pm 1,74) \times 10^6$ КОЕ/г и $(1617,49 \pm 323,47) \times 10^6$ КОЕ/г соответственно, что превышало контрольные значения. На 49 сутки достоверных различий с контролем не выявлено. Вероятно, гранулы из ПЗГБ препятствуют интенсивному выходу метрибузина в почву и отрицательному влиянию на рост бактерий, а также служат для них дополнительным источником углерода.

При внесении трибенурон-метила в почву традиционным способом наблюдается повышение численности бактерий спустя 35, 49 и 120 суток выращивания свеклы по сравнению с контролем отрицательным и составляет $(27,68 \pm 6,92) \times 10^6$ КОЕ/г, $(15,23 \pm 2,69) \times 10^6$ КОЕ/г и $(1683,06 \pm 814,63) \times 10^6$ КОЕ/г. Повышение численности может быть связано со специфической

реакцией бактерий на химическое вещество и его более низкой токсичностью по сравнению с метрибузином.

Применение депонированной формы гербицида трибенурон-метила на 15 сутки несколько повысило значение численности бактерий по сравнению с отрицательным контролем и составило $(43,71 \pm 20,03) \times 10^6$ КОЕ/г. Однако в последующие сроки – 35, 49 и 120 суток – численность бактерий в почве, обрабатываемой депонированным трибенурон-метилом, существенно не отличалась от численности бактерий контрольной почвы. Можно предположить, что полимерные гранулы, сдерживают выход трибенурон-метила и его влияние на численность бактерий в почве.

3.2 Влияние различных форм метрибузина и трибенурон-метила на численность микромицетов при выращивании свеклы

Изменения численности микромицетов в почве отражены на рисунке 4. Их исходная численность составила $(8,77 \pm 1,74) \times 10^3$ КОЕ/г.

Как было описано выше, на 15 и 49 сутки выращивания свеклы наблюдалось снижение количества бактерий, возможно, в связи с температурными колебаниями атмосферы. В случае с микромицетами прослеживается такая же закономерность. Но стоит отметить, что снижение численности микромицетов в эти периоды времени не столь значительно, как в случае с бактериями, поскольку микромицеты не так чувствительны к колебаниям температуры. Спустя 15 суток количество микромицетов составляет $(6,46 \pm 2,11) \times 10^3$ КОЕ/г, спустя 35 суток $(33,22 \pm 4,79) \times 10^3$ КОЕ/г и спустя 49 суток $(13,54 \pm 5,11) \times 10^3$ КОЕ/г. На 120 сутки наблюдается повышение численности микромицетов до $(273,22 \pm 108,21) \times 10^3$ КОЕ/г, что также связано с сезонной динамикой гидротермических и трофических показателей почвы.

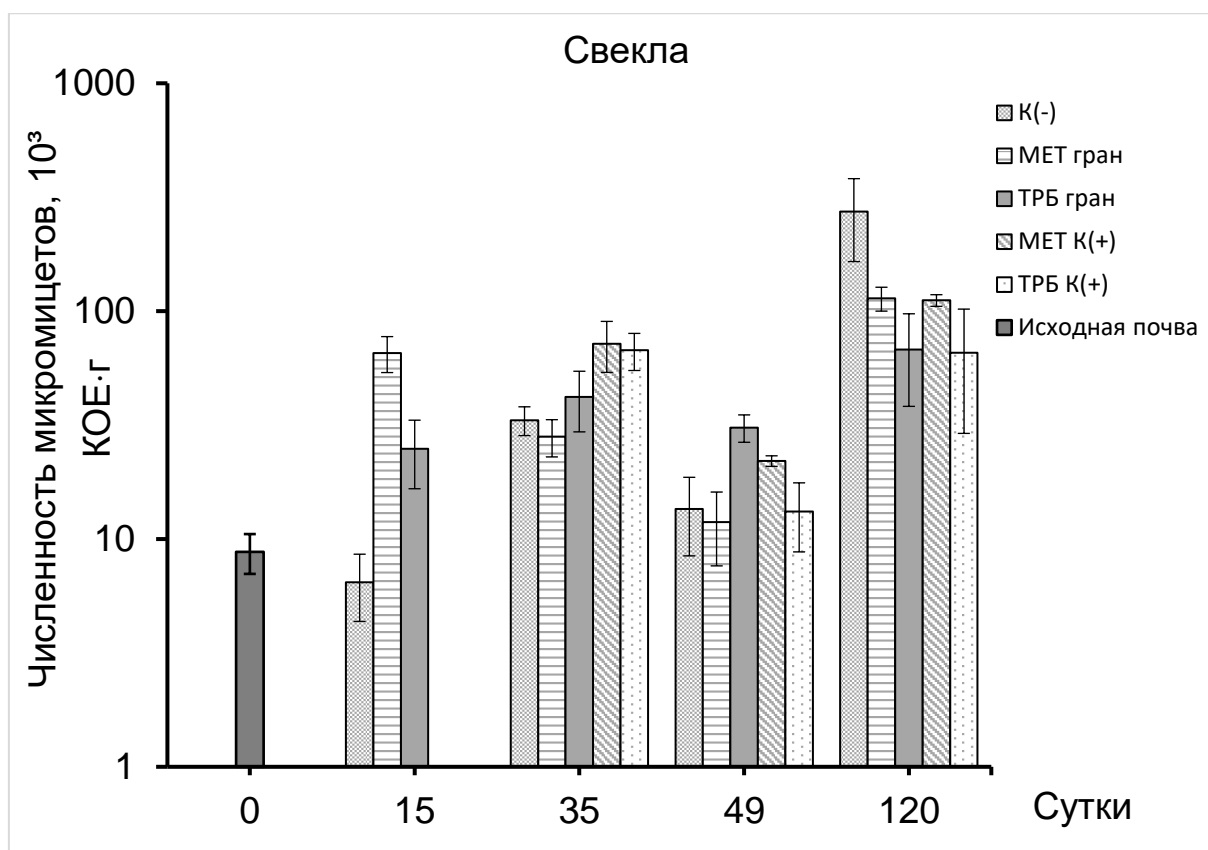


Рисунок 4 – Влияние различных форм метрибузина и трибенурон-метила на общую численность микромицетов при выращивании свеклы

Внесение метрибузина традиционным способом не вызвало значительного повышения численности в сравнении с отрицательным контролем спустя 35 и 49 дней, что составило $(71,97 \pm 18,15) \times 10^3$ КОЕ/г и $(21,99 \pm 1,17) \times 10^3$ КОЕ/г соответственно. Однако на 120 сутки количество микромицетов в почве несколько снизилось – $(111,48 \pm 6,56) \times 10^3$ КОЕ/г. Применение гранул МЕТ вызвало высокий рост численности микромицетов лишь на 15 сутки – $(65,51 \pm 11,77) \times 10^3$ КОЕ/г, в сравнение с контролем. В последующие дни не было отмечено значимых отличий численности микромицетов в вариантах с депонированным МЕТ от контроля.

При внесении трибенурон-метила, также не наблюдается резкого повышения численности. Спустя 35 суток количество микромицетов достигло $(67,35 \pm 12,48) \times 10^3$ КОЕ/г, а спустя 49 $(13,20 \pm 4,43) \times 10^3$ КОЕ/г. Также как и в случае с депонированным метрибузином, трибенурон-метил в основе из

ПЗГБ не повлиял на изменение численности микромицетов. Количество микромицетов в почве при применении депонированного ТРБ составило $(67,76 \pm 12,48) \times 10^3$ КОЕ/г, а при применении его в традиционной форме $(65,57 \pm 36,51) \times 10^3$ КОЕ/г. Высокий рост численности микромицетов при применении трибенурон-метила в гранулах наблюдался лишь на 15 сутки: $(24,91 \pm 8,30) \times 10^3$ КОЕ/г.

Можно сделать вывод о том, что гербициды не оказывают такого же выраженного влияния на микромицеты, как на бактерии. Также влияние депонированных форм гербицидов не отличается от влияния их традиционной формы спустя 120 дней выращивания свеклы на микромицеты.

3.3 Влияние различных форм метрибузина и трибенурон-метила на численность почвенных бактерий при выращивании томатов

На рисунке 5 представлены изменения численности бактерий в ризосфере растений томатов. Спустя 14 суток количество микроорганизмов в почве уменьшилось примерно в два раза и составило $(24,91 \pm 8,30) \times 10^6$ КОЕ/г. В дальнейшем не наблюдается изменений численности на контрольном участке почвы, и на 28 сутки составляет $(23,47 \pm 3,98) \times 10^6$ КОЕ/г.

При внесении гербицидов метрибузина и трибенурон-метила в почву традиционным способом наблюдается снижение численности бактерий спустя 28 суток выращивания томатов. В данных образцах она соответствует $(7,01 \pm 2,43) \times 10^6$ КОЕ/г и $(6,31 \pm 1,05) \times 10^6$ КОЕ/г для метрибузина и трибенурон-метила соответственно.

Применение депонированных форм гербицидов метрибузина и трибенурон-метила через 14 суток спровоцировало увеличение количества микроорганизмов, до $35,99$ и $48,91 \times 10^6$ КОЕ/г для почвы обработанной метрибузином и трибенурон-метилом в гранулах соответственно. Однако спустя 28 суток депонированные препараты вызвали понижение численности до $(5,25 \pm 1,82) \times 10^6$ КОЕ/г для образцов почвы, обработанных метрибузином в

гранулах и $(3,50 \pm 1,61) \times 10^6$ КОЕ/г для образцов, обработанных трибенурон-метилом в гранулах.

Как видно, по истечении 28 суток гербициды во всех формах привели к снижению численности бактерий. При этом депонированные формы гербицидов не оказывают иного влияния на бактерий ризосферы, нежели традиционные формы препаратов.

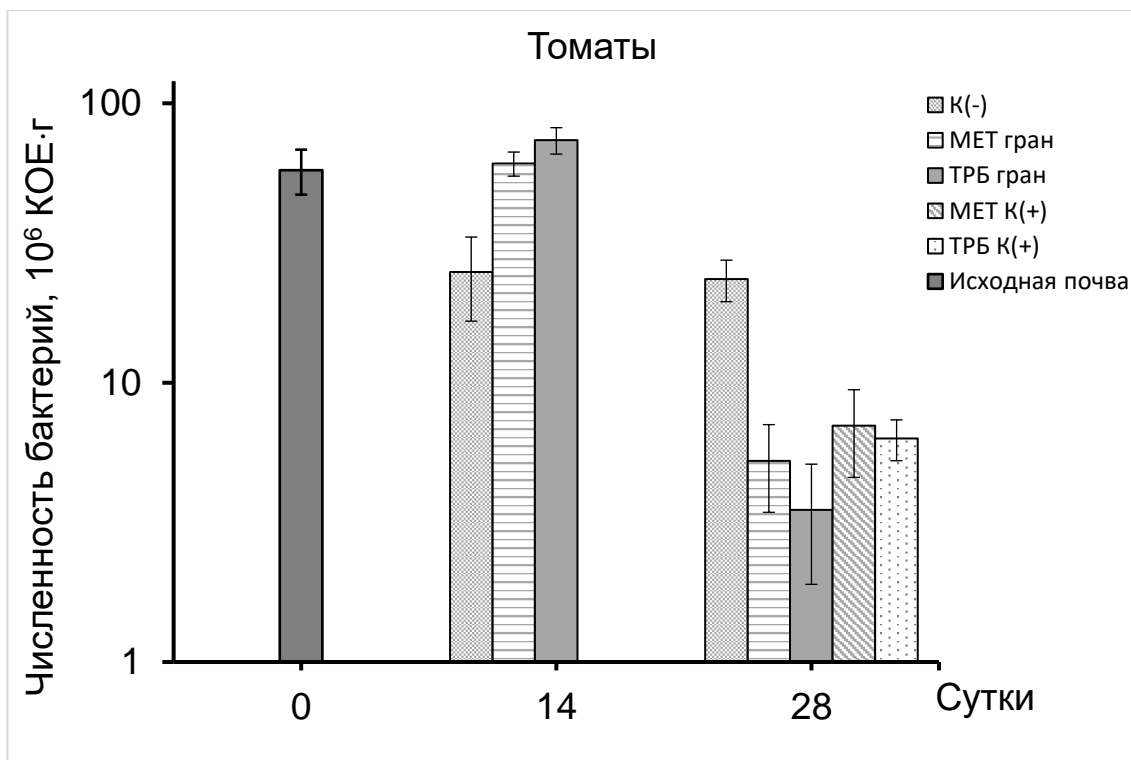


Рисунок 5 – Влияние различных форм метрибузина и трибенурон-метила на общую численность ризосферных бактерий при выращивании томатов.

3.4 Влияние различных форм метрибузина и трибенурон-метила на численность микромицетов при выращивании томатов

Изменения численности микромицетов в почве отражены на рисунке 6. Спустя 14 дней количество микромицетов возросло до $(37,37 \pm 12,69) \times 10^3$ КОЕ/г в почве, необрабатываемой гербицидами. Затем последовало снижение до $(12,96 \pm 7,75) \times 10^3$ КОЕ/г спустя 28 дней.

Депонированные формы метрибузина и трибенурон-метила спровоцировали повышение численности после 14 дней всхода растений почти в два раза, она составила $(77,05 \pm 16,69) \times 10^3$ КОЕ/г и $(75,66 \pm 8,90) \times 10^3$ КОЕ/г соответственно. На 28 сутки не наблюдается значительных изменений количества микроорганизмов по сравнению с контрольным участком почвы. Численность микромицетов в этот период составила $(20,67 \pm 2,019) \times 10^3$ КОЕ/г для почвы, обработанной метрибузином в гранулах и $(12,61 \pm 3,64) \times 10^3$ КОЕ/г для почвы, обработанной трибенурон-метилом в гранулах. Внесение метрибузина и трибенурон-метила традиционным способом также не вызвало значительного изменения численности спустя 28 дней. Для почвы, обработанной чистым метрибузином она составила $(27,68 \pm 3,03) \times 10^3$ КОЕ/г, а для почвы, обработанной чистым трибенурон-метилом $(15,41 \pm 3,21) \times 10^3$ КОЕ/г.

Из этого следует, что гербициды не оказывают такого же сильного воздействия на микромицеты ризосферы томатов, как на бактерии. Спустя 28 дней агропрепараты в любой из своих форм не оказали влияния на численность микромицетов почвы.

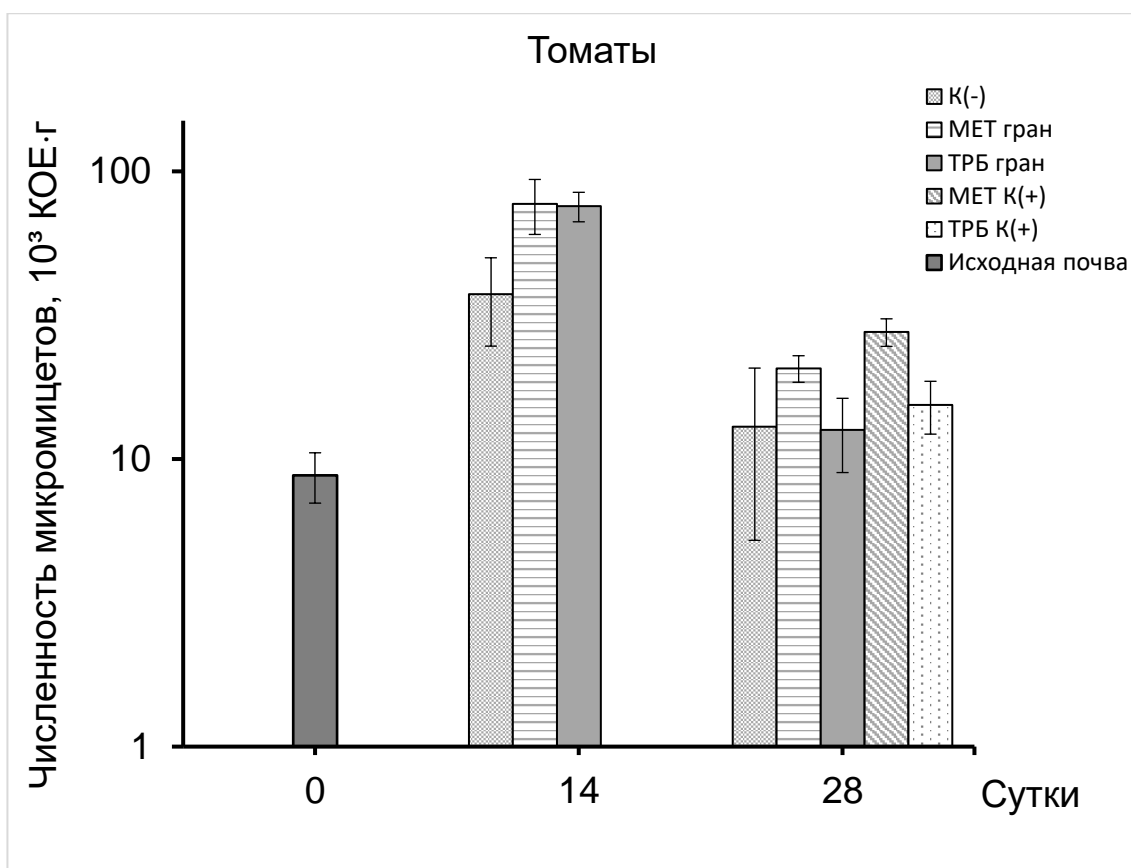


Рисунок 6 – Влияние различных форм метрибузина и трибенурон-метила на общую численность микромицетов при выращивании томатов.

3.5 Влияние различных форм метрибузина и трибенурон-метила на эколого-трофические группы бактерий при выращивании свеклы и томатов

При выращивании томатов и свеклы для исходной почвы были определены низкие значения количества прототрофных, олиготрофных и азотфиксирующих бактерий. Количество прототрофов составило $(1,41 \pm 0,41) \times 10^6$ КОЕ/г, олиготрофов $(3,46 \pm 1,20) \times 10^6$ КОЕ/г и $(0,88 \pm 0,17) \times 10^6$ КОЕ/г азотфиксаторов (рис. 7). Высокое значение числа копиотрофных бактерий, которое соответствует $(57,67 \pm 10,57) \times 10^6$ КОЕ/г, на фоне низкого содержания олиготрофов указывает на высокое содержание органических веществ в почве.

Через 49 суток численность всех групп бактерий увеличилась по сравнению с исходной почвой. При этом количество прототрофных бактерий

не различалось достоверно в отрицательном контроле и при всех формах доставки гербицидов, составляя от 4,03 до 5,38 млн. КОЕ в 1 г.

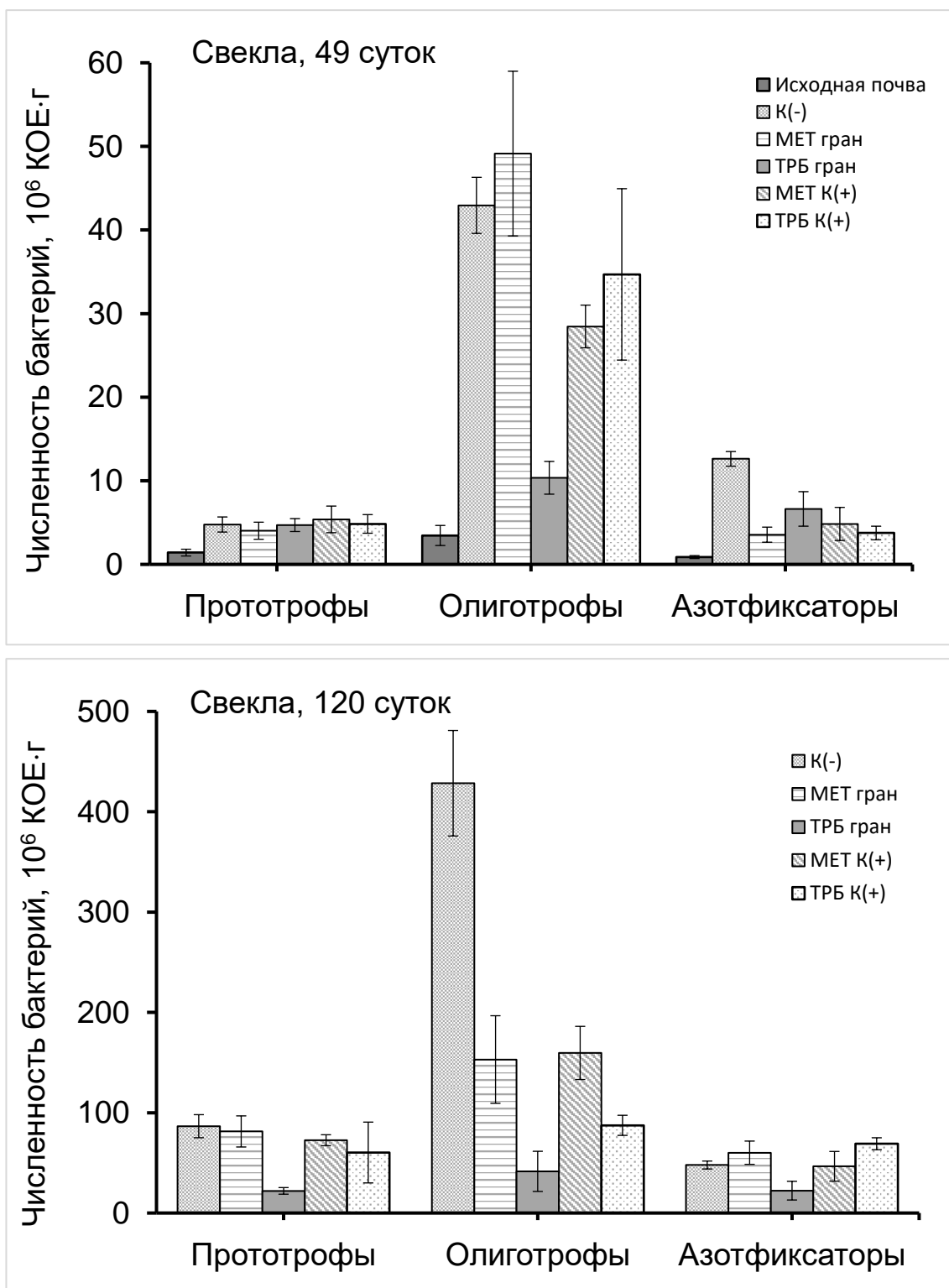


Рисунок 7 – Влияние различных форм метрибузина и трибенурон-метила на микрофлору почвы при выращивании свеклы.

Количество азотфиксаторов уменьшилось при внесении всех типов гербицидных препаратов в среднем в 1,9-3,6 раза по сравнению с отрицательным контролем. Количество олиготрофных бактерий в вариантах с традиционной обработкой гербицидами уменьшилось по сравнению с отрицательным контролем в 1,2-1,5 раза, тогда как депонированный препараты по-разному проявили свое действие: гранулы ТРБ снижали численность олиготрофов в 4,8 раза, а гранулы МЕТ достоверно не повлияли на их количество.

Через 120 суток внесение обоих видов гербицидов методом опрыскивания не изменило численности азотфиксаторов и прототрофов, но уменьшило численность олиготрофных бактерий. Аналогичным было действие депонированного в гранулы метрибузина. Однако при внесении гранул с ТРБ отмечено снижение численности всех эколого-трофических групп бактерий по сравнению с контролем и другими опытными вариантами.

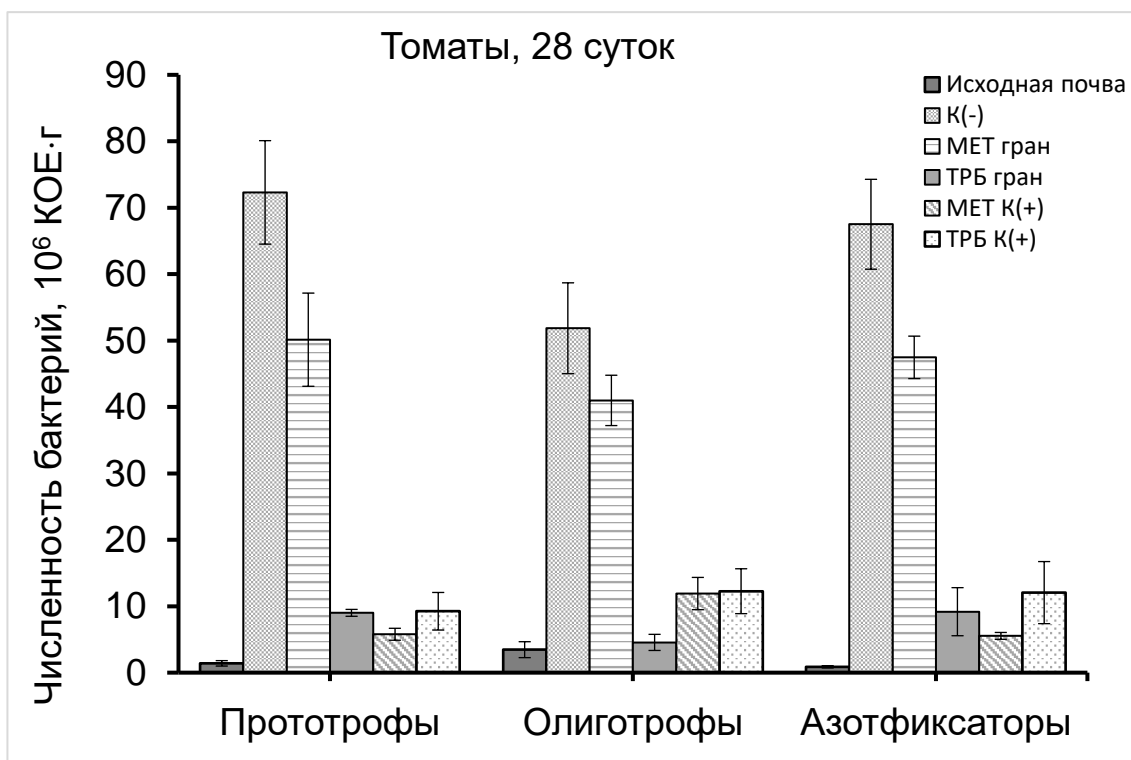


Рисунок 8 – Влияние различных форм метрибузина и трибенурон-метила на микрофлору почвы при выращивании томатов.

При выращивании томатов (рис.8), спустя 28 суток, численность всех групп бактерий также увеличилась по сравнению с исходной почвой. При этом наибольший рост наблюдался на экспериментальных участках, не обработанных препаратами. Таким образом, все гербицидные препараты привели к снижению численности исследуемых эколого-трофических групп микроорганизмов. Однако наименьшее снижение численности бактерий наблюдается на участках обработанных МЕТ в гранулах. Использование метрибузина в традиционном виде снизило численность прототрофов в 10 раз, количество олиготрофов и азотфиксаторов в 3,5-4 раз по сравнению с использованием метрибузина в гранулах, который оказался наиболее экологичным по сравнению с другими формами гербицидов. Достоверного различия численности при использовании трибенурон-метила в гранулах и традиционным способом не наблюдается, при применении этих двух типов препаратов наблюдается снижение количества микроорганизмов всех эколого-трофических групп в 5,5-10 раз по сравнению с контролем отрицательным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Численность ризосферных микроорганизмов, как бактерий, так и микромицетов была подвержена колебаниям, связанным с сезонной динамикой гидротермических и трофических условий в почве. В общих чертах эта тенденция сохранялась как в контрольном варианте, так и в случае применения гербицидов, однако между разными видами растений были выявлены отличия.

2. В ризосфере свёклы метрибузин, применяемый в свободном виде, в большинстве случаев приводил к снижению численности всех исследуемых групп бактерий, тогда как в депонированной форме – увеличивал численность копиотрофных бактерий в 6 раз по сравнению с контрольной почвой без обработки и не угнетал развитие прототрофов и олиготрофов. Трибенурон-метил, напротив, в свободном виде увеличивал численность копиотрофных бактерий в 2,5-6 раз, в то же время внесение депонированной формы не привело к достоверным изменениям в сравнении с контролем.

3. В ризосфере томатов численность исследуемых групп бактерий снижалась при обработке разными формами гербицидов в 3-6 раз по сравнению с контролем; среди всех препаратов депонированный метрибузин обладал наименьшим ингибирующим действием.

4. Гербициды не оказывали такого же выраженного влияния на микромицеты, как на бактерии; достоверных различий в численности микромицетов при обработке свободными и депонированными гербицидами выявлено не было.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

КОЕ – колониобразующая единица

МЕТ – метрибузин

ПГА – полигидроксиалканоаты

ПЗГБ – поли-3-гидроксибутират

ТРБ – трибенурон-метил

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1) Бессонова, В.А. Полигидроксиалканоаты - новые биоматериалы / Бессонова, В.А., Ануфриева К.М. // Современные научные исследования и инновации. – 2016. – № 7 (63). – С. 25-27.

2) Бояндин, А. Н. Биодegradация полигидроксиалканоатов почвенными микробиоценозами различной структуры и выявление микроорганизмов деструкторов / А. Н. Бояндин, С. В. Прудникова, М. Л. Филипенко, Е. А. Храпов, А. Д. Васильев, Т. Г. Волова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48, № 1. – С. 35–44.

3) Волова, Т. Г. Биоразрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение: монография / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая // Красноярский писатель. – 2011. – С. 400.

4) Волова, Т. Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов / Т. Г. Волова // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2014. – С. 103-133.

5) Волова, Т. Г. Фундаментальные основы конструирования и применения сельскохозяйственных препаратов нового поколения / Т. Г. Волова, Н. О. Жила, С. В. Прудникова, А. Н. Бояндин, Е. И. Шишацкая. // Красноярск: Красноярский писатель. – 2016. – С. 80–85.

6) Ганиев, М.М. Химические средства защиты растений / Ганиев М.М., Недорезков В.Д. //Москва: КолосС. – 2006. – С. 248.

7) Иванцова, Е. А. Влияние пестицидов на микрофлору почвы и полезную биоту // Вестник Волгоградского государственного университета. Сер. 11, Естественные науки. – 2013. – № 1. – С. 35–40.

8) Коваленко, Л. В. Определение суммарной токсичности почвы корневой системы и конечной продукции при применении химических средств защиты растений: методика и результаты / Л. В. Коваленко, В. Т. Минее, Е. Х. Ремпе, Л. П. Воронина // Вестник с.-х. науки. – 1991. – № 6. – С. 63–71.

- 9) Круглов, Ю. В. Микрофлора почвы и пестициды: учебное пособие // Москва: Агропромиздат. – 1991. – С. 128.
- 10) Куликова, Н. А. Гербициды и экологические аспекты их применения: учеб. пособие / Н. А. Куликова, Г. Ф. Лебедева. // Москва: Книжный дом «ЛИБРОКОМ». – 2010. – С. 152.
- 11) Леонова, А. А. Миграция метрибузина в почвах: лизиметрические исследования и моделирование: дис. канд. биологических наук: 06.01.03 // Москва. – 2001. – С. 140.
- 12) Леонтьев, В. Н. Естественные пути деградации гербицидов ряда сульфонилмочевины / В. Н. Леонтьев, Т. И. Ахрамович, О. С. Игнатовец, О. И. Лазовская // Труды Белорусского государственного университета: научный журнал. – 2013. – № 4. – С. 197-204.
- 13) Мельников, Н. Н. Химические средства защиты растений (пестициды): справочник / Н. Н. Мельников, К. В. Новожилов, Т. Н. Пылова // Москва: Химия. – 1980. – С. 288.
- 14) Мельников, Н. Н. Химия пестицидов: учебное пособие. // Москва : Химия. – 1968. – С. 494.
- 15) Нетрусов, М. А. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук / под ред. А. И. Нетрусова. – М.: ИЦ «Академия». – 2005. – С. 612.
- 16) Попов, С.Я. Основы химической защиты растений / Попов С.Я., Дорожкина Л.А., Калинин В.А. // Под ред. профессора С.Я Попова. – М.: Арт-Лион. – 2003. – С. 208.
- 17) Прудникова, С. В. Экологическая роль полигидроксиалканоатов – аналога синтетических пластмасс: закономерности биоразрушения в природной среде и взаимодействия с микроорганизмами: учебное пособие / С. В. Прудникова, Т. Г. Волова // Красноярск: Красноярский писатель. – 2012. – С. 184.

- 18) Сметник, А. А. Миграция пестицидов в почвах / А. А. Сметник, Ю. Я. Спиридонов, Е. В. Шеин // Москва: РАСХН – ВНИИФ Москва. – 2005. – С. 327.
- 19) Шутко, А. П. Рынок средств защиты растений в мире и России: тенденции, динамика, прогнозы / А. П. Шутко, А. Г. Долгова // Международный студенческий научный вестник. – 2015, № 2. – С. 14.
- 20) Asrar, J. Controlled release of tebuconazole from a polymer matrix microparticle: release kinetics and length of efficacy / Asrar J, Ding Y, La Monica RE, Ness LC // J Agric Food Chem. – 2014. – Vol. 52. – P. 4814–4820.
- 21) Bordes P. Nano-biocomposites: Biodegradable polyester/nanoclay systems / Bordes P., Pollet E., Averous L. // Progress in Polymer Science. – 2009. – Vol. 34. – P. 125-155.
- 22) Boutin, O. Co-precipitation of a herbicide and biodegradable materials by the supercritical anti-solvent technique / O. Boutin, E. Badens, E. Carretier, G. Charbit // The Journal of supercritical fluids. – 2004. – Vol. 31. – P. 89–99.
- 23) Celis, R. Controlled pesticide release from biodegradable polymers / R. Celis, M. C. Hermosin, M. J. Carrizosa, J. Cornejo // J. Agric. Food Chem. – 2002. – Vol. 6. – P. 453–469.
- 24) Chanprateep S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. Japan: Journal Bioscience and Bioengineering, 2010. – 110: 621-632.
- 25) Chiali, F.Z. Chronic low level metribuzin exposure induces metabolic alterations in rats / Merzouk, H. Merzouk, S.A. Medjdoub, M.Narce, A. // Pesticide Biochemistry and Physiology. – 2013. P. 38-44.
- 26) Dave, A. M. A review on controlled release of nitrogen fertilizers through polymeric membrane devices / A. M. Dave, M. H. Mehta, T. M. Aminabhavi, A. R. 35 Kulkarni, K. S. Soppimath // Polymer Plastics Technology and Engineering. – 1999. – Vol. 38. – P. 675–711

- 27) Department of Economic and Social Affairs. World population prospects the 2017 revision. // United Nations. – 2017.
- 28) Draft report on technological solutions to sustainable agriculture in the EU (2015/2225(INI)). // European Parliament. – 2015.
- 29) Ghormade, V. Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants / M. V. Deshpande, K. M. Paknikar // Biotechnology Advances. – 2011. – Vol. 29. – №. 6. – P. 792– 803.
- 30) Janigova I., Lacik I., Chodak I. Thermal degradation of plasticized poly(3-hydroxybutyrate) investigated by DSC. Bratislava: Polymer Degradation and Stability, 2002. – 77: 35-41.
- 31) Kiselev, E. Constructing sustained-release herbicide formulations based on poly-3-hydroxybutyrate and natural materials as a degradable matrix / Kiselev, E. Boyandin, A. Zhila, N. Prudnikova, V. Shumilova, A. et al. // Pest Management Science. – 2019. – Vol. 76. – P. 1772–1785.
- 32) MarRequena. Environmental exposure to pesticides and risk of thyroid diseases / MarRequena, Antonia López-Villén, Antonio F. Hernández, Tesifón Parrón, Ángela Navarro, Raquel Alarcón. // Toxicology Letters. Vol. 315. – 2019. P. 55-63.
- 33) Narendran, S.T. Review of pesticide residue analysis in fruits and vegetables. Pre-treatment, extraction and detection techniques / S.T. Narendran, S.N. Meyyanathan, B. Babu. // Food Research International. – 2020. – Vol. 133. – P. 109–141.
- 34) Qian, K. Release kinetics of tebuconazole from porous hollow silica nanospheres prepared by miniemulsion method / Qian K, Shi T, He S, Luo L, Liu X, Cao Y // Micropor Mesopor Mater. – 2013. – Vol. 169. – P. 1–6.
- 35) Sanchez-Bayo, F. Impacts of Agricultural Pesticides on Terrestrial Ecosystems. // F. Sánchez-Bayo, P. J. van den Brink, R. M. Mann // Bentham Science Publishers Ltd. – 2011. – Vol. 4. – P. 63–87.

- 36) Shaviv, A. Advances in controlled-release fertilizers / A. Shaviv. //Advances in Agronomy. – 2001. – Vol. 71. – P. 1-49.
- 37) Tatiana G. Volova. Fungicidal activity of slow-release P(3HB)/TEB formulations in wheat plant communities infected by *Fusarium moniliforme* / Tatiana G. Volova, Svetlana V. Prudnikova, Natalia O. Zhila // Springer. – 2017. – Vol. 25. – P. 552–561.
- 38) Volova, T. G. Degradable polyhydroxyalkanoates as pesticide carriers / T. G. Volova, S. V. Prudnikova, G. S. Kalacheva, A. J. Sinskey // J. Polym. Environ. – 2012. – Vol. 21. – P. 675–682.
- 39) Wye-Hong Leonga. Application, monitoring and adverse effects in pesticide use: The importance of reinforcement of Good Agricultural Practices (GAPs) / Wye-Hong Leonga, Shu-Yi Teha, Mohammad Moshaddeque Hossainb, Thiyagar Nadarajawc, Zabidi Zabidi-Hussind, Swee-Yee Chine, Kok-Song Laif, Swee-Hua Erin Lim // Journal of Environmental Management. – 2020. – Vol. 260. 15. – P. 109– 987.
- 40) Volova, T.G. Efficacy of tebuconazole embedded in biodegradable poly-3-hydroxybutyrate to inhibit the development of *Fusarium moniliforme* in soil microecosystems / Volova, T.G. Prudnikova, S.V. Zhila, N.O. et al. // Society of Chemical Industry. – 2016. –Vol. 73(5). – P. 925–935.
- 41) Volova, T. Characterization of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate films and pellets loaded with the fungicide tebuconazole / Volova, T. Zhila, N. Vinogradova, O. Shumilova, A. Prudnikova, S. Shishatskaya, E. // Environ Sci Pollut Res Int. – 2016. – Vol.23(6). – P. 5243-5254.
- 42) Volova, T. Poly(3-hydroxybutyrate)/metribuzin formulations: characterization, controlled release properties, herbicidal activity, and effect on soil microorganisms / Volova, T. Zhila, N. Kiselev, E. et al. // Environ Sci Pollut Res Int. – 2016. – Vol. 23(23). – P. 23936-23950.
- 43) Yang, D. Microencapsulation of seed-coating tebuconazole and its effect on physiology and biochemistry of maize seedlings / Yang D, Wang N,

Yan X, Shi J, Zhang M, Wang Z, Yuan H // Colloids Surf B Biointerfaces. –
2014. – Vol. 114. – P. 241–246.

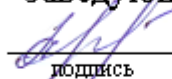
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой


подпись

Т.Г. Волова
инициалы, фамилия

«26»

июня 2020 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 — Биология

«Влияние агропрепаратов, депонированных в разрушаемую основу из П(ЗГБ)
и наполнителя, на микрофлору почвы в полевых условиях»

Руководитель


подпись, дата

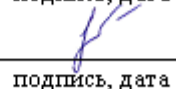
д-р биол. наук

должность, ученая степень

С. В. Прудникова

инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

Д. А. Демьянчук

инициалы, фамилия

Красноярск 2020