

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

« _____ » _____ 2020 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

06.04.01 – Биология

06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Влияние пролонгированных форм сельскохозяйственных препаратов на
основе ПГА на почвенный микробиоценоз

Руководитель _____ проф., д-р биол. наук С.В. Прудникова

Выпускник _____ А.Л. Пономарева

Рецензент _____ А.В. Муруева

Красноярск 2020

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация «Влияние пролонгированных форм сельскохозяйственных препаратов на основе ПГА на почвенный микробиоценоз» содержит 63 страницы текста, 24 иллюстрации, 3 таблицы, 77 использованных источников литературы.

Ключевые слова: пестициды, депонирование, биополимеры, поли(3-гидроксибутират) [П(ЗГБ)], филлеры, микрофлора почвы.

Цель работы – оценка влияния препаратов фунгицидного и гербицидного действия в чистом виде и депонированных в биоразрушаемую полимерную основу из П(ЗГБ) и опилок на микробиоценоз почвы. Задачи работы: оценить влияние свободных форм пестицидов на численность и видовой состав микрофлоры почвенных микрэкосистем при кратковременной и длительной экспозиции; определить численность и таксономическое разнообразие ризосферной микрофлоры сельскохозяйственных культур (пшеница, ячмень, томаты, свекла) при внесении свободных и депонированных пестицидов в почву в условиях лабораторного и полевого эксперимента.

Необходимость исследования взаимодействия пестицидов с почвенными микроорганизмами обусловлена важнейшей ролью микрофлоры в поддержании почвенного плодородия и оптимизации условий вегетации растений. В качестве основы для депонирования пестицидов предлагается использовать биоразлагаемые полимеры природного происхождения. Данные полимеры безопасны для окружающей среды и почвенных микроорганизмов, обеспечивают контролируемое высвобождение пестицидов и их адресную доставку, что позволит снизить отрицательное воздействие на окружающую среду, а также повысить эффективность пестицидов, так как данные системы, оказывают пролонгированный эффект.

В работе использовали биоразрушаемый полимер П(ЗГБ) с наполнителем из природных материалов (опилок) в качестве основы для депонирования фунгицидных и гербицидных препаратов. Было показано, что почвенные микроорганизмы чувствительны к действию свободных форм пестицидов. Наиболее выраженные изменения видового состава почвенных бактерий и снижение общей численности происходили в первые сутки после внесения пестицидов в почву. Внесение депонированных форм гербицидов и фунгицидов в почву приводило к увеличению таксономического разнообразия микрофлоры и не оказывало ингибирующего действия на рост бактерий как в лабораторных микрэкосистемах, так и в полевых условиях. Внесение гербицидов метрибузина и трибинурон-метила, депонированных в П(ЗГБ) с опилками, снижало долю спорообразующих бактерий и увеличивало долю грамотрицательных палочек и актинобактерий.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Общая характеристика пестицидов	8
1.2 Миграция, разложение и поведение пестицидов в почве	11
1.3 Распространение и действие пестицидов на окружающую среду	14
1.4 Полимеры в качестве разрушаемой основы для доставки пестицидов в сельском хозяйстве	18
1.5 Биологическая деградация ПГА	22
Глава 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	24
2.1 Характеристика пестицидов	25
2.2 Характеристика экспериментальных препаратов.....	29
2.3 Общий план эксперимента.....	30
2.4 Микробиологические исследования	33
2.5 Идентификация микроорганизмов методом MALDI-TOF	35
Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ	38
3.1 Характеристика почвы и влияние пестицидов на почвенную микрофлору.....	38
3.2 Таксономическое разнообразие микрофлоры почвенных микрэкосистем с растениями пшеницы и ячменя под действием разных форм гербицидов.....	41
3.3 Таксономическое разнообразие микрофлоры почвенных микрэкосистем с растениями пшеницы и ячменя под действием разных форм фунгицидов.....	44
3.4 Таксономическое разнообразие микрофлоры в ризосфере свеклы и томатов под действием разных форм гербицидов в полевых опытах.....	46
ВЫВОДЫ	53
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	55

ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных проблем на сегодняшний день является глобальное химическое загрязнение биосферы. Широкомасштабное применение разнообразных и многочисленных химических соединений в хозяйственной деятельности человека порождает обоснованное беспокойство о возможном нарушении экологического равновесия в отдельных экосистемах [1]. Наиболее опасными являются синтетические соединения, поступающие в природу в результате аграрных мероприятий. Важное место среди них занимают химические средства защиты растений – пестициды. Массовое использование пестицидов в растениеводстве, с целью повышения продуктивности и растений борьбы с болезнями и вредителями, обуславливает рост ассортимента и объемов применения агропрепаратов [2]. Но, независимо от форм и способов применения, пестициды продолжают попадать в почву, накапливаться в ней и влиять на микробные сообщества.

Установлено, что почвенные микроорганизмы чувствительны к действию пестицидов, их ответная реакция чрезвычайно разнообразна и зависит от многих факторов: химической природы, персистентности препаратов, почвенно-климатических характеристик [3]. Необходимость исследования взаимодействия пестицидов с почвенными микроорганизмами обусловлена важнейшей ролью микрофлоры в создании почвенного плодородия и оптимизации условий вегетации растений, а также способностью микроорганизмов к биодegradации пестицидов в окружающей среде до безопасных веществ [4, 5].

Пестициды используются в огромных количествах, чаще не нормировано, для достижения наибольшего и продолжительного эффекта, и большая их часть вымывается из почвы, что приводит к загрязнению окружающей среды. Также применение больших доз пестицидов отрицательно сказывается на почвенных микроорганизмах, которые являются неотъемлемой её частью и активно участвуют в почвообразовательных

процессах, что в итоге приводит к обеднению почв и снижению их плодородности [6].

Для решения данной проблемы предлагается использование систем адресной доставки пестицидов и их контролируемого высвобождения. Это позволит снизить отрицательное воздействие на окружающую среду, а также повысить эффективность пестицидов, так как данные системы оказывают пролонгированный эффект [7].

В качестве основы для депонирования пестицидов предлагается использовать биоразлагаемые полимеры природного происхождения. Такие полимеры безопасны для окружающей среды и почвенных микроорганизмов. На протяжении долгого времени полимерные изделия являются важной частью повседневной жизни. Сфера применения изделий, изготовленных из полимеров, широко распространена от биоматериалов для протезирования до материалов, используемых в аэрокосмической промышленности. В области сельского хозяйства полимеры также широко используются, для создания упаковок продуктов, укрывных материалов, сеток, кантов, горшечной продукции и много другого [8]. Однако при использовании синтетических полимеров, появляется проблема утилизации использованных продуктов. В настоящее время эта проблема решается с помощью биоразлагаемых полимеров, в том числе полигидроксиалканоатов (ПГА). Биоразлагаемые полимеры в биологически активных средах, деградируют с помощью ферментных систем микроорганизмов, таких как бактерии, грибы, и водоросли. Данные полимеры все чаще используются как заменители пластмасс в некоторых областях сельского хозяйства [9].

Чрезвычайно важной областью применения биоразлагаемых полимеров является создание систем контролируемой доставки агрохимикатов. При переходе с экстенсивных на интенсивные методы ведения сельского хозяйства агрономы стали активно использовать различные химические препараты для борьбы с насекомыми-вредителями, сорняками и болезнями культивируемых видов растений. Классическое использование химикатов в агрокультуре в

жидком и порошкообразном виде не всегда обеспечивает адресную доставку препарата и приводит к нежелательным побочным эффектам, таким как их включение в пищевые цепи, а также их распространение и накопление в окружающей среде. Этот факт, конечно же, противоречит всемирной борьбе за охрану окружающей среды [10].

Пестициды, обладающие мутагенным и канцерогенным действием, попав в организм человека, могут нанести вред здоровью [11]. Разработка препаратов с адресным и контролируемым выходом действующего вещества, сократит возможность распространения и аккумуляции поллютантов в биосфере. Проводятся различные исследования по созданию таких препаратов с разнообразными типами полимеров (поликапролактон, этилцеллюлоза, полилактид, альгинат, лигнин). В том числе проводились исследования по применению ПГА в качестве носителя для инсектицидов и гербицидов в объёмных матриксах, плёнок и микрогранул [12].

Поскольку микроорганизмы являются основными деструкторами как природных, так и химически синтезированных веществ в почве, важным вопросом является исследование влияния традиционных и депонированных форм пестицидов на почвенную микрофлору. В связи с этим целью работы была поставлена оценка влияния пролонгированных препаратов фунгицидного и гербицидного действия, депонированных в разрушаемую полимерную основу из П(ЗГБ) и опилок на микробиоценоз почвы

В задачи исследования входило:

1. Определить влияние свободных форм пестицидов на численность и видовой состав микрофлоры почвенных микрэкосистем в краткосрочных опытах (через сутки) и при длительной экспозиции в течение месяца.
2. Определить численность и таксономическое разнообразие ризосферной микрофлоры пшеницы и ячменя при внесении свободных и депонированных пестицидов в почву.

3. Определить численность и таксономическое разнообразие ризосферной микрофлоры под действием свободных и депонированных форм гербицидов в полевых условиях.

Работа выполнялась на базовой кафедре биотехнологии ИФБиТ в рамках гранта «Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализация».

Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика пестицидов

Начиная со второй половины XX века, сельское хозяйство характеризуется резким усилением химизации. В почву вносятся огромные количества минеральных удобрений и физиологически активных веществ, к которым можно отнести средства защиты растений – пестициды. Без пестицидов уже невозможно представить развитие сельского хозяйства, и получение высоких и стабильных урожаев [7].

Пестициды (от лат. *pest* – зараза и *cidos* – убивать) – это химические или биологические препараты, используемые для борьбы с вредителями и болезнями растений. Химикаты защищают растения от разнообразных видов вредителей: насекомых (инсектициды), бактерий (бактерициды), фитопатогенных грибов (фунгициды), тли (афициды), личинки и гусеницы (ларвициды). В эту группу веществ, также включают антисептики, которые применяются для предохранения деревянных и других неметаллических материалов от разрушения микроорганизмами; вещества, используемые для предуборочного удаления листьев с растений (дефолианты); вызывающие обезвоживание тканей растений, что ускоряет их созревание и облегчает уборку урожая (десиканты), предпосевную обработку семян (протравители семян). Пестициды в настоящее время являются неотъемлемой частью технологий возделывания сельскохозяйственных культур во всем мире. Они широко применяются также в процессе хранения и транспортировки готовой продукции, при дезинсекции и дезинфекции помещений [13].

Каждый год в мире затеривается большая численность урожая: в пределах 14 % – по причине повреждения насекомыми, 12 % – по причине заболеваний растений, вызываемых грибами и червяками, 9 % – по причине сорняков и 10 % губят мыши. Совместные издержки урожая в мире оцениваются приблизительно в 1,8 миллиардов тонн. Использование пестицидов, в собственную очередь, приводит к их попаданию в биосферу, где

живы организмы начинают испытать на для себя большой «пестицидный пресс». Сложился оригинальный «пестицидный парадокс», значение которого произведено в том, собственно, что население земли, используя пестициды, само делается мишенью их влияния [14].

Весомый финансовый смысл пестицидов обуславливает подъем размеров их изготовления и применения в крупном земледелии. Создание и обширное внедрение синтетических органических пестицидов поиграли огромную роль в интенсификации обороны растений и в увеличении продуктивности сельскохозяйственного изготовления [15].

Использование пестицидов отдало большой финансовый эффект, привело к значительному подъему производительности труда, наращиванию размера изготовления сырья для индустрии. Высочайшая эффективность и универсальность, простота и практическая доступность способа ликвидации вредоносных организмов с поддержкой пестицидов, очевидность и стремительность заслуги итогов привели к тому, что пестициды стали главным средством обороны растений [16].

В прочем довольно проворно начали проявляться прецеденты негативного влияния массированного, а нередко и неконтролируемого использования. Почти все пестициды скапливаются в основе, водоемах и живых организмах, появляются устойчивые популяции вредителей, это появление получило угрожающие темпы и масштабы, нарушаются натуральные биоценозы, быстро понижается их дееспособность к саморегуляции [17].

Сравнительная токсичность пестицидов для защищаемых растений и вредоносных организмов характеризуется хемотерапевтическим коэффициентом (ХК), который выражается отношением малой дозы пестицида (D_1), при применении которой поражается вредоносный организм, к наибольшей дозе (D_2), переносимой защищаемым растением:

$$ХК = D_1 / D_2$$

Лишь химическое соединение, имеющее ХК меньше единицы, может быть использовано как пестицид.

Для гербицидов ставят индекс селективности (ИС), представляющий собой отношение дозы, при применении которой сбор понижается не слишком заметно, к дозе, уничтожающей основную массу сорных растений. Он демонстрирует, во сколько раз доза, вызывающая важное понижение засоренности, меньше дозы, оказывающей фитотоксическое воздействие на культурные растения. Отношение дозы, вызывающей 20%-ное понижение урожая культурных растений, к дозе, дающей 80%-ное устранение сорняков, символически принимают за единицу. Значит, чем больше единицы ИС, тем больше высочайшей избирательностью характеризуется гербицид [18].

По оценкам экспертов, отечественный рынок химических средств защиты растений еще далек от насыщения. Без применения современных пестицидов рентабельность сельхозпредприятий будет оставаться невысокой. Никакие удобрения не позволят получить полноценный урожай без одновременного применения химических средств защиты растений, так как удобрения стимулируют и подкармливают не только культурные растения, но и сорняки, потери урожая от которых составляют в среднем около 20%.

Доля производства гербицидов, составляющих самый большой сегмент рынка химических средств защиты растений, изменялась в течение последнего пятилетия с 71,2% в 2016 г до 77,2% в 2014 г (в 2018 г – 72,1%). Доля инсектицидов в 2014-2018 гг варьировала от 9,7% в 2017 г до 12,7% в 2016 г (12,1% в 2018 г). Доля фунгицидов, и аналогичных продуктов, за исследуемый период выросла с 6,0% в 2014 г до 14,2% в 2018 г, тогда как доля средств против прорастания и регуляторов роста растений, наоборот, сократилась с 4,2 до 1,6%.

По прогнозам BusinesStat, в 2019-2023 г производство химических средств защиты растений будет демонстрировать ежегодный прирост на 2,0-5,1%. Показатель достигнет в 2023 г 105,7 тыс. т и превысит значение 2018 г на 22,8% [19].

1.2 Миграция, разложение и поведение пестицидов в почве

Для верного осознания поведения пестицидов, каждых иных химических соединений, нужно разглядеть важные моменты, действующие на миграцию, разложение, энергичность и длительность их хранения в почве [20].

Пестициды – тонкодисперсные вещества – в основе подвержены множественным влияниям биотического и не биотического характера, кое-какие устанавливают их поведение, преобразование и, наконец, минерализацию. Тип и поспешность переустройств обусловлен: химической текстуры функционирующего вещества и его устойчивости, автоматического состава и строения почв, химических качеств почв, воздействия наружных влияний и налаженности ведения аграрного хозяйства [21].

Использование пестицидов приводит к перестройке экологического равновесия в почве – притесняя одни категории микробов и стимулируя копирование других, агенты каких готовы продуцировать фитотоксические вещества и тем самым увеличивать отрицательное воздействие употребляемых препаратов [22].

Почва, это огромный резервуар живых микроорганизмов, обеспечивающий плодородие и питание необходимое для развития растений. В 1 грамме почвы содержатся миллионы микроорганизмов, которые участвуют в создании плодородного слоя почвы. Микроорганизмы обеспечивают перевод веществ из одной формы в другую, более удобную для усвоения растениями, таким образом, обеспечивая круговорот веществ, в природе. Чем выше численность и разнообразнее видовой состав почвенных микроорганизмов, тем выше плодородие почвы [23].

Движение пестицидов в почве происходит вместе с почвенным раствором или одновременно с движением коллоидных частиц, на которых они адсорбируются. Это зависит как от диффузионных процессов, так и от массы тока (разжижения), которые являются распространенным методом

выщелачивания. [24 25]. Когда поверхностный сток происходит из-за осадков или орошения, пестициды перемещаются в растворе или суспензии и накапливаются в углублениях в почве. Эта форма движения пестицидов зависит от рельефа местности, эрозии почвы, интенсивности осадков, степени растительного покрова и количества времени, прошедшего с момента использования пестицида. Количество пестицидов, которые перемещаются с поверхностным стоком, составляет более 5% от количества, которое вносится в почву. [26].

Элюирование пестицидов по профилю почвы состоит из их движения с водой, циркулирующей в почве, что в основном обусловлено физико-химическими свойствами почвы, направлением движения воды, а также процессами адсорбция и десорбция пестицидов коллоидными частицами почвы. Так, в почве каждый год в течение длительного времени, обработанной ДДТ в дозе 189 мг / га, через 20 лет было обнаружено 80% этого пестицида, проникающего на глубину 76 см. [27,28].

Согласно исследованиям, проведенным на трех различных почвах (аллювиально-очищенные, типичные солончаки, мощные черноземы), где хлорорганические инсектициды (ГХГ и ДДТ) обрабатывались в течение 25 лет (с орошением в течение последнего десятилетия), остаточные количества пестицидов достигли глубины. 85 см в типичном солончаке, 200 см в аллювиально-очищенной почве и 275 см в вырытом черноземе, в концентрации 0,067 мг / кг ГХГ и, соответственно, 0,035 мг / кг ДДТ на глубине 220 см. [29].

Очевидно, что на стабильность пестицидов в почве большое влияние оказывает химическая стабильность вещества, в частности, легкость гидролиза. Гидролиз с водой является одним из важнейших процессов, который в большинстве случаев приводит к разложению пестицидов с образованием менее токсичных соединений. Для легко гидролизуемых веществ влажность почвы имеет большое значение: самый легкий гидролиз пестицидов происходит во влажных почвах. Многие вещества также легко

окисляются кислородом воздуха. Это особенно характерно для производных тио- и дитиофосфорной и фосфоновой кислот, а также в присутствии сульфидных и других легко окисляемых групп в молекуле пестицида. Следует отметить, что простое окисление в случае производных тионофосфорной кислоты и тиолфосфоновой кислоты обычно приводит к образованию более токсичных соединений для вихревых соединений, но после их гидролиза образуются совершенно безопасные вещества [30].

Различные почвенные микроорганизмы, для которых пестициды часто являются источником углерода, оказывают большое влияние на стабильность химических соединений в почве. Даже очень химически стабильные соединения разрушаются почвенными микроорганизмами. Во многих случаях это разложение начинается не сразу, но через некоторое время необходимо адаптировать микроорганизмы для уничтожения этого химического вещества. [31].

В разрушении химических соединений в почве принимают участие самые всевозможные мельчайшие организмы, в том числе бактерии, грибы и актиномицеты. Разрушение химических соединений в почве протекает и под влиянием растений, которые могут абсорбировать из почвы некоторые субстанции и преобразовывать их в простейшие продукты или отдельные иные метаболиты, образующие с субстанциями растений конъюгаты [32].

Как уже упоминалось, время хранения пестицидов в почве существенно зависит от температуры: чем выше температура почвы, тем быстрее происходит разложение лекарств как под воздействием химических агентов (гидролиз, окисление), так и под влиянием микроорганизмов и других обитателей почвы. Разные штаммы микроорганизмов уничтожают пестициды с разной скоростью. Аэрация почвы также важна. Некоторые вещества в анаэробных условиях разрушаются быстрее, чем в аэробных условиях, что связано с другим механизмом разрушения [33].

По скорости разложения в почве пестициды предложено распределить на последующие шесть групп:

- 1) Вещества с длительностью воздействия больше 18 месяцев (большая часть хлорорганических пестицидов).
- 2) Вещества с длительностью воздействия около 18 месяцев (отдельный производные мочевины, пиклорам, симазин и другие триазины).
- 3) Пестициды с длительностью хранения в почве вплоть до 12 месяцев (производные бензойной кислоты, амиды кислот).
- 4) Вещества с длительностью хранения в почве вплоть до 6 месяцев (нитроанилины, акрилоксиалканкарбоновые кислоты и другие).
- 5) Пестициды с длительностью хранения в почве больше 3 месяцев (производные карбаминовой кислоты, алифатические карбоновые кислоты и остальные).
- 6) Пестициды с длительностью хранения в почве меньше 3 месяцев (органические соединения фосфора и другие).

Абсолютно понятно, что такое разделение носит сравнительный характер, так как персистентность пестицидов, как указывалось выше, находится в зависимости не только от их строения, но и от активности почвенных микробов и других факторов. Точно так же, как и среди отдельных перечисленных выше классов химических соединений, есть субстанции с большей или меньшей персистентностью [34].

Анализ литературы демонстрирует то, что в наиглавнейших экосистемах земного шара с большей или меньшей скоростью совершается распад органических пестицидов до простых нетоксичных соединений. Всё же, чтобы избежать накопления в окружающей среде, применение всех химических соединений должно быть точно регламентировано.

1.3 Распространение и действие пестицидов на окружающую среду

Ущерб, который причиняют пестициды природе, не является точной оценкой, но определенно можно сказать, что он огромен. Два фактора имеют первостепенное значение: тот факт, что все синтетические пестициды

являются веществами, чуждыми природе и недоступными для обмена веществ, и что почти все они являются биоаккумулятивными, то есть в более высоких концентрациях в живых организмах, чем в окружающей среде.

К особо опасным пестицидам относятся хлорорганические пестициды, но не только они. Именно процесс биоаккумуляции делает концепцию «приемлемой дозы» пестицидов практически бессмысленной, поскольку они все еще накапливаются в организмах в сколь угодно малых дозах.

Систематическое использование химических веществ может привести не только к гибели вредных, но и полезных паразитических и хищных энтомофаговых насекомых, которые регулируют количество популяций вредных организмов. Это приводит к нарушению естественных связей организмов в биоценозе. В результате уничтожения энтомофагов и акарифагов происходит массовое размножение вредителей, против которых были направлены химические обработки. Известны случаи массового размножения паутинного клеща, клеща красных плодов, тли свеклы и капусты и т. д. [35].

Чувствительность к пестицидам животных разных видов, даже если они тесно связаны, может широко варьироваться. Обычно животное не умирает от отравления напрямую, но в результате ослабляется и становится жертвой хищников или суровых условий окружающей среды. Тип токсичности пестицидов различен – это может быть канцероген или мутагенный эффект, который влияет на дыхательные пути, эндокринную систему, иммунную систему и нервную систему. При химической обработке сельскохозяйственных культур пчелы, шмели и другие опылители растений погибают.

Морские организмы особенно сильно загрязнены пестицидами. Когда речь идет о наземных млекопитающих, пестициды могут воздействовать на них «случайно» в результате сельскохозяйственного использования инсектицидов и гербицидов и преднамеренно - например, при убийстве грызунов. В случае интенсивного возделывания пахотных земель с использованием пестицидов и нарушения инструкций по их применению

наблюдается отравление птиц, особенно пестицидов, птенцов и вредителей, лисиц и других теплокровных животных [36].

Процесс размножения оказался особенно чувствительным как у млекопитающих, так и у птиц, а отсутствие здорового и многочисленного потомства этого вида является синонимом смерти. Когда речь идет о рыбе, пестициды являются вторым фактором после промышленного загрязнения, что сокращает рыбные запасы во многих странах. При обработке полей и лесов пестицидами происходит массовая гибель рыб: сига, клещей, лосося и, кроме того, лекарства накапливаются в тканях рыб и водных растениях. В частности, для рыб пестициды третьего поколения очень токсичны. Пестициды редко используются в резервуарах - в основном их просто берут с полей. По оценкам, около 30% смертей рыб в водоемах в центральной части России вызваны пестицидами, в частности, гранозаном, который используется для одевания зерновых. Конечно, страдают не только рыбы, но и другие обитатели водоемов, особенно ракообразные.

Пестициды также нарушают естественный баланс сложных почвенных экосистем и тем самым влияют на плодородие. При многократном использовании гербициды уничтожают микроскопические почвенные водоросли. В некоторых районах Индии и Индонезии пестициды полностью стерилизовали почву [37].

Ежегодно, появляются новые факты, о влиянии пестицидов на дикую природу, большинство из которых заключается в том, что производители пестицидов вряд ли могли их предвидеть. Сам создатель не избежал вредного воздействия пестицидов. Отравление пестицидами подразделяют на острые и хронические, и определить их количество крайне сложно. При остром отравлении большая доза яда сразу попадает в организм, вызывая нарушение его функции с конкретными симптомами. Хроническая интоксикация возникает при длительном повторном введении небольших доз яда, который может накапливаться. Хроническая интоксикация пока не учитывается (хотя очевидно, что их много), поскольку в случае острого их количество регулярно

недооценивается официальной статистикой разных стран. По данным зарубежных ученых, до 40% людей, профессионально занимающихся производством и использованием пестицидов, судя по биохимическим показателям крови, имеют признаки серьезного отравления. Тем не менее, это не единственная группа риска, подверженная воздействию пестицидов. Они также включают людей, живущих рядом с пестицидами; потребители, получающие пестициды в пищу; те, кто пьет воду из источников, расположенных рядом с захоронениями неиспользованных и запрещенных пестицидов, и другие.

Кроме того, человек вступает в контакт с пестицидами в полевых работах на приусадебных участках. Повреждение их может возникнуть при непосредственном контакте с лекарственными средствами - через кожу, слизистые оболочки рта, носа, дыхательных путей, а также они могут попадать в организм человека с пищей через желудочно-кишечный тракт. При попадании в кровь ядовитые вещества переносятся ею в отдельные органы. В организме яды подвергаются химическим превращениям (окисление, гидролитическое разложение и другие процессы). У людей яды могут накапливаться в жировой ткани и в печени. [18].

Воздействие пестицидов на растения, определяется рядом факторов: анатомическими, морфологическими, биологическими и физиолого-биохимическими характеристиками каждого вида растений. Структура эпидермиса, целостность кутикулы, наличие опушения и покрытия из воска определяют сохранение ядов на растении, проникновение и степень их воздействия. Огурцы и арбузы более чувствительны к вредному воздействию пестицидов, чем фасоль, подсолнух и морковь. Зерновые и бобовые культуры относительно стабильны. Некоторые яды могут проникать в растение и проникать через сосудистую систему в различные органы и ткани растения. Усвоение токсичных веществ происходит как через наземные органы, так и через корневую систему из почвы [38].

В данной работе были использованы: фунгициды, такие как азоксистробин, тебуконазол и эпоксиконазол; и гербициды – метрибузин, трибенурон-метил, феноксапроп-п-этил. Было выявлено, что метрибузин является одним из самых подвижных действующих веществ гербицидов, зарегистрированных в России, а также установлена его потенциальная способность загрязнять грунтовые воды [39].

Повсеместное применение гербицидов ведет к потере растительной биомассы и снижению биоразнообразия многих ландшафтов, появлению видов, устойчивых к применяемым препаратам, подвергает опасности агроэкосистемы, нарушая их стабильность, и ставит под угрозу сохранение плодородия земель на длительный период [13, 38].

Для снижения темпов загрязнения окружающей среды пестицидами предлагается использовать препараты, позволяющие осуществлять их адресную доставку. Такие препараты обладают пролонгированным эффектом, что повышает их эффективность, а также позволяют снизить количество, используемых пестицидов [40].

1.4 Полимеры в качестве разрушаемой основы для доставки пестицидов в сельском хозяйстве

Прогресс формирования науки и техники ведет к все более широкому внедрению целевых продуктов, синтезируемых микроорганизмами. Ценным продуктом биотехнологии являются микробные полигидроксиалканоаты (ПГА) - полимеры гидроксипроизводных жирных кислот (рис. 1), синтезируемые бактериями в качестве внутриклеточного резервного вещества.

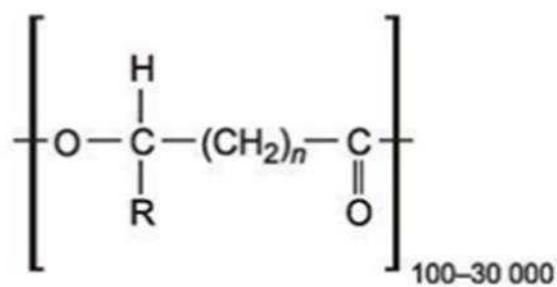


Рисунок 1 – Общая формула полигидроксиалканоатов

ПГА являются биоразрушаемыми полимерами. Они разлагаются в окружающей среде под действием ферментов микроорганизмов. Среди микроорганизмов-деструкторов ПГА выделяют как бактерии, так и грибы. Наиболее часто встречаются среди бактерий-деструкторов представители следующих родов: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Rhodococcus*, *Rhodocyclus*, *Syntrophomonas*. Среди грибов способность к деструкции ПГА проявляют виды родов *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes*, *Zygomycetes*, *Myxomicetes*, *Mastigomycetes*, *Penicillium* и *Fusarium*. Способностью к деструкции ПГА обладает от 0,5 до 9,6 % микроорганизмов окружающей среды [41].

Установлено, что сополимеры поли(3-гидроксибутирата-со-3-гидроксивалерата) [П(ЗГБ-со-3ГВ)] и в смеси с другими биоразлагаемыми материалами показали более быструю деградацию, чем чистый П(ЗГБ). Также было выявлено, что в присутствии П(ЗГБ) повышается численность микроорганизмов в почве, которые секретировали фермент П(ЗГБ)-деполимеразу, а так как продукты гидролиза П(ЗГБ) являются субстратом для многих микроорганизмов, это приводило к постепенной деградации биополимерных пленок [42,43].

Биополимеры обладают ценными свойствами: с точки зрения различных физических и химических свойств они близки к синтетическим полимерам, но в то же время они могут быстро разлагаться, не выделяя токсичные вещества в окружающую среду. В мире формируется рынок отечественных

биополимеров и промышленных товаров: разрушаемые упаковки для продуктов питания и напитков, предметы гигиены и санитарии, керамические изделия и т. д. В этом смысле новой и важной областью экологического применения ПГА может быть его использование для осаждения и доставки сельскохозяйственной продукции [44].

Препараты на основе П(ЗГБ) с добавлением пестицидов, были разработаны научным коллективом Сибирского федерального университета и Института биофизики СО РАН. В ряде работ были представлены данные исследований эффективности фунгицидов и гербицидов, депонированных в биоразрушаемую основу из П(ЗГБ). Эффективность таких препаратов была сопоставима с эффективностью коммерческих сельскохозяйственных препаратов и обеспечивала пролонгированный эффект подавления развития фитопатогенов и сорняков. При этом такие препараты не оказывают ингибирующего действия на почвенную микрофлору [45, 46, 47].

Подобные исследования, ведутся и зарубежными научными коллективами. Была показана возможность использования ПГБ и ПГВ в качестве основы для депонирования гербицида аметрина [48].

В другом исследовании, в качестве основы для депонирования гербицида трифлурина, использовали микрокапсулы поли(3-гидроксипропионат-со-4-гидроксипропионат), микрокапсулы трифлуралина показали значительно улучшенную фотостабильность и гербицидную активность в отношении целевых сорняков. Эти результаты показали, что микрокапсулирование с помощью ПГБ может значительно улучшить эффективность использования и снизить дозировку таких сельскохозяйственных химикатов [49,50]. Можно сделать выводы, что использование биополимеров, снижает количество обработок и отрицательное воздействие пестицидов на микроорганизмы почвы.

Разрушаемые основы для доставки препаратов пестицидов обеспечивают контролируемый выход активного вещества в окружающую среду за счет постепенного высвобождения из инертного вещества основы и

обеспечивают его пролонгированный эффект, что повышает его эффективность. Также подобные системы защищают активное вещество от влияния различных внешних факторов, которые приводят к его деградации. Это позволяет использовать химические вещества в меньших объемах, что, как уже говорилось ранее, снижает нагрузку на окружающую среду.

В качестве основы, в таких системах, можно использовать вещества различной природы, к таковым относятся как простые неорганические соединения, такие как кремнезем, цеолиты, оксиды металлов и т.д., так и сложные полимерные молекулы природного происхождения – полисахариды (целлюлозы, агарозы, альгинаты, крахмал, хитозан и др.), белки (желатин, альбумин), липиды (мицеллы). Также в качестве инертного вещества могут выступать синтетические материалы – полистирол, полиакриламид, полиамиды, полиэфиры, полиуретаны, amino-альдегидные смолы. При выборе материалов для применения в полевых условиях, решающее значение имеют такие свойства, как не токсичность, биосовместимость и биоразлагаемость [51,52].

Контролировать выход активного вещества из основы для депонирования возможно благодаря способности данных материалов или систем на их основе к деградации. В зависимости от скорости деградации будет варьировать и скорость выхода активного вещества. Также данный параметр зависит от формы препарата и его размеров [53]. В зависимости от формы препаратов выделяют микрокапсулы, микрочастицы, микросферы. Эти препараты отличаются техникой производства, что отражается на характере распределения активного вещества в препарате. Микрокапсулы представляют собой активное вещество, расположенное в центре и окруженное снаружи полимерной основой или другим материалом, в микросферах активное вещество формирует множество ядер, а в микрочастицах активное вещество равномерно распределяется в объеме основы для депонирования. Также существует препаративная форма в виде нанокапсул и наносфер, данные препараты отличаются меньшими размерами, не превышающими 1 мкм [54].

Высвобождение активного вещества из таких препаратов происходит за счет разрушения химических связей между активным и инертным веществом под действием различных внешних факторов.

Основными преимуществами систем контролируемой доставки являются: повышение стойкости препарата и, следовательно, снижение частоты применения, предотвращение потери действующего вещества в результате химического, фотолитического или биологического разложения, обеспечение безопасного использования пестицидов для работников в сфере сельского хозяйства [55]. Отмечено, что загрязнение грунтовых вод из-за быстрого вымывания хорошо растворимых пестицидов могут быть сведены к минимуму путем применения препаратов, адсорбированных на носителе, который ограничивает немедленное высвобождение препарата [56].

Природные полимеры, синтезируемые микро и макроорганизмами, подвержены разрушению и разлагаются в окружающей среде, участвуя в цикле. В этих процессах ключевую роль играют микроорганизмы, которые способны усваивать различные органические соединения, обеспечивая самоочищение окружающей среды от загрязняющих веществ. Микробные полигидроксиалканоаты обладают рядом полезных свойств, включая биосовместимость и биоразлагаемость. Вот почему полигидроксиалканоаты перспективны в качестве продукции для сельского хозяйства [57].

1.5 Биологическая деградация ПГА

ПГА при разрушении в биологических средах, образуют экологически чистые продукты: углекислый газ и вода в аэробных условиях, и метана и вода в анаэробных условиях [58]. По мере того, как перспективы использования ПГА увеличиваются, становится все более важным изучать правила, регулирующие распределение их в естественных условиях. Разложение полимера в природных экосистемах, таких как почва, компост или вода, происходит в результате гидролиза, механических, термических,

окислительных и фотохимических реакций, а также под воздействием микроорганизмов, как указано выше. [59].

Первые организмы деструкторы ПГА были выделены более 45 лет назад. Среди них были идентифицированы *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*. Позднее, в связи с расширением спектра исследуемых ПГА, были выделены и охарактеризованы микроорганизмы, разрушающие гетеро полимерные полимеры с короткой и средней цепью. Аэробные и анаэробные бактерии, разлагающие ПГА, были выделены из различных экосистем: почвы, компоста, осадков сточных вод, пресной и морской воды, воздуха и осадков лимана. Широко распространенные почвы и водные бактерии являются эффективными разрушителями ПГА (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Streptomyces*, *Ilyobacter*). Грибы, способные уничтожить ПГА, также были изолированы от различных биологических сред. В основном они представлены низшими грибами *Deuteromycetes*, *Basidiomycetes*, *Ascomycetes* [60].

Большинство факторов, которые разрушают ПГА, являются мезофильными микроорганизмами; только небольшое количество теплолюбивых видов может разлагать полимер при повышенных температурах. [44].

Самым мощным природным объектом для уничтожения ПГА является почва. Большинство исследований по деградации почвы проводились в лабораторных условиях. Было показано, что на процесс деструкции П(ЗГБ) и его сополимеров [П(ЗГБ-со-ЗГВ)], оказывает значительно влияние температура и практически не оказывает влияние величина pH [61].

Из-за своей физиологической и биохимической природы микроорганизмы являются наиболее чувствительными индикаторами изменений в химической и окружающей среде. Искусственное внесение субстрата в почву приводит к сдвигам в составе и структуре микробного сообщества. Высокая активность определенной функциональной группы может служить индикатором деградационных процессов в почве [62].

В работах сотрудников СФУ и ИБФ СО РАН, были проведены комплексные исследования закономерностей биodeградации образцов ПГА различной структуры и химической формы на сибирских почвах в местах лиственных и хвойных деревьев (близ Красноярска) и тропических почвах (в районе Ханоя и на морском побережье). Было установлено, что разрушение продуктов ПГА зависит от химической структуры ПГА, способа производства продуктов, температуры субстрата и структуры микробиоценоза, что сопровождается уменьшением их массы, уменьшением молекулярной массы и полидисперсности полимеров, а также изменением соотношения аморфной и кристаллической фаз в полимере. Эти исследования впервые показали, что микробиоценоз, специфичный для конкретной природной среды, формируется на поверхности полимерных образцов, качественно и количественно отличающихся от контрольных образцов почвы. Помимо бактерий, микромицеты играют важную роль в биodeградации полимеров в почве. Используя культуру, морфо биохимические методы и результаты анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, были идентифицированы истинные микроорганизмы деградации полимера.

В проведенных исследованиях в регионах, активными деструкторами ПГА являются представители родов *Bacillus*, *Paecilomyces* и *Penicillium*. Основными разрушителями полимеров в сибирских почвах являются бактерии представители *Variovorax*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* и *Xanthomonas*, а также микромицеты. – *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Verticillium* и *Zygosporium*, в тропических почвах – бактерии родов *Variovorax*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Xanthomonas* и микромицеты – *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Verticillium* и *Zygosporium* [63].

Глава 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения исследований влияния пестицидов на структуру микробиоценоза и соотношение доминирующих видов бактерий и микромицетов при внесении в почву в свободном виде и депонированных в разрушаемую основу, были использованы следующие препараты: гербициды – метрибузин, трибенурон-метил, феноксапроп-п-этил и фунгициды – азоксистробин, тебуконазол, эпоксиконазол.

2.1 Характеристика пестицидов

Метрибузин является системным гербицидом, обладающим широким спектром действия против многих сорных растений ряда двудольных и злаковых. Действие направлено против следующих сорняков: амброзия, щетина, пастушья сумка, капли крови, хвост лисицы, портулак, дикий овес, лазорник, куриное пшено, мякина, корень полярного шеста, гриб, синий василек, белая марля, вши, луг и ромашка без запаха, горная местность, полевая горчица, молочница. Вероника, плевел. Препарат обладает длительным эффектом, поскольку проникновение в растения возможно как через листья, так и через корни. Подходит для применения до и после появления. Эффект метрибузина заключается в подавлении фотосинтеза [64].

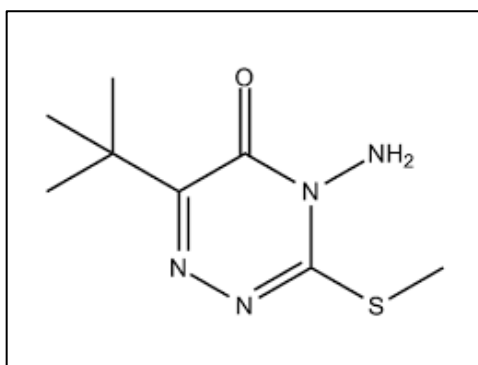


Рисунок 2 – Структурная формула метрибузина

Трибенурон-метил – послевсходовый селективный гербицид. Активен в борьбе со многими широколистными сорняками (включая мак, виды ромашки, многолетний бодяк полевой, крестоцветные, горец вьюнковый, звездчатку

среднюю и прочие) на зерновых культурах. Применяют против 2-дольных сорных растений в посевах зерновых злаковых культур. Их устойчивость к препарату объясняется его быстрым метаболизмом в растительных тканях до нефитотоксичных соединений [18]. В почве препарат распадается за шесть дней на 50 %. Трибенурон-метил поглощается корнями и листьями, легко перемещается в растениях. Приводит к остановке роста, а затем к гибели сорных растений.

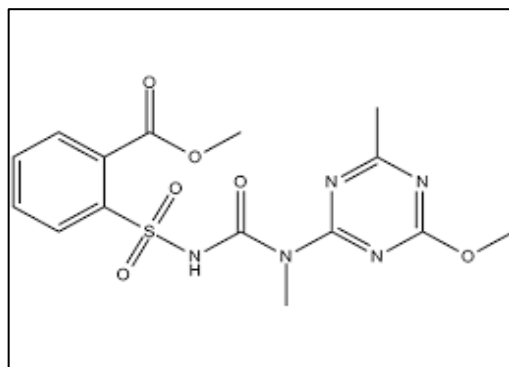


Рисунок 3 – Структурная формула трибенурон-метила

Феноксапроп-п-этил – системный гербицид против злаковых сорняков, Запаха не имеет. Стабилен при 50 ° С в течение 90 дней, при свете не разрушается. Не стабильный в щелочной и нейтральной среде. Быстро всасывается в листья и перемещается в базипетальном и акропетальном направлениях к различным органам растения. Соединение является одним из ингибиторов синтеза жирных кислот - в растениях вещество гидролизуется, получается свободная феноксипропановая кислота, которая, в свою очередь, тормозит образование жирных кислот. У злаковых сорняков в зонах роста синтез клеточных мембран прекращается. Уже через день после обработки препарат ослабляет сорняки. Полная гибель наступает в 1,5-2 недели [65,66,67].

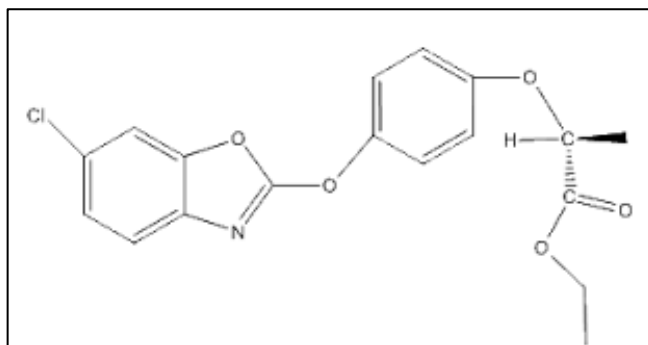


Рисунок 4 – Структурная формула феноксапроп-п-этила

Азоксистробин – фунгицид из класса стробилуринов, который используется в сельском хозяйстве (также в смеси с другими активными ингредиентами) для борьбы с различными болезнями растений. Как и другие стробилурины, препараты на основе азоксистробина используются в системе с другими фунгицидами. Их использование запрещено на следующий вегетационный период после применения [18,68].

Фунгициды с механизмом действия, отличным от стробилурина, следует применять до и после медикаментозного лечения. Азоксистробин ингибирует митохондриальное дыхание, блокируя транспорт электронов в цепях цитохрома b и c1. Обладает длительным защитным эффектом. Препарат высокоэффективен против патогенной мучнистой росы и мучнистой росы, а также против патогенов, устойчивых к триазолу и металаксильным производным [69,70].

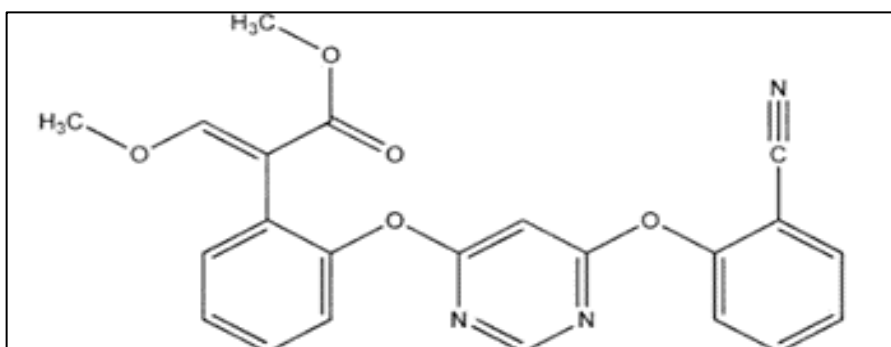


Рисунок 5 – Структурная формула азоксистробина

Тебуконазол – эффективный системный фунгицид для обработки семян зерновых культур в борьбе с фитопатогенами, передаваемыми семенами. Принадлежит триазолам третьего поколения. Широкий спектр системных эффектов ставит препарат на одно из первых мест в ряду средств защиты. Он также используется для лечения вегетативных растений рапса и злаков в качестве неотъемлемого компонента комбинированных препаратов. представляет собой бесцветные кристаллы. Хорошо растворим в органических растворителях, плохо в воде. Не гидролизуется при pH от 4 до 9. Период полураспада при 20 ° С более года. Вещество устойчиво при высоких температурах и на свету. Устойчив к гидролизу в чистой воде при pH 5 - 9 и фотолизу. Обладает защитными, целебными и разрушительными свойствами. Он быстро проникает в растение и равномерно распределяется по нему. Тебуконазол оказывает специфическое действие против всех видов ржавчины в сельскохозяйственных культурах. Опрыскивая растения в течение трех недель, он защищает их от болезней. Мучнистая роса слабее поддается воздействию [70,71,72].

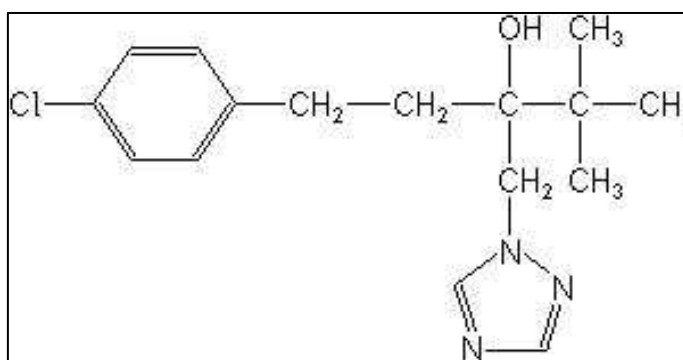


Рисунок 6 – Структурная формула тебуконазола

Эпоксиконазол фунгицид широкого спектра действия класса триазола. Это часть многих лекарств. Он очень эффективен против возбудителей мучнистой росы, ржавчины, пятнистых колосьев и листьев растений. Бесцветное кристаллическое вещество. Не имеет запаха. При нормальных условиях хранения он стабилен, не гидролизуется в водном растворе (температура и pH не влияют). Действие направлено против комплекса

заболеваний вегетативных органов зерновых культур. Характеризуется быстрым началом длительного действия (от 3 до 6 недель), активностью в холодную и влажную погоду. Обладает профилактическим и ликвидирующим действием. Подавляет мучнистую росу, все виды пятен и ржавчину в посевах [73].

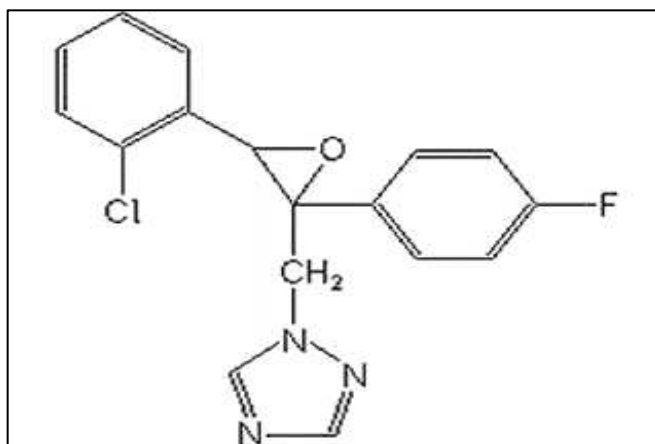


Рисунок 7 – Структурная формула эпоксиконазола

2.2 Характеристика экспериментальных препаратов

В качестве основы для депонирования пестицидов использовали П(ЗГБ) в смеси с наполнителем природного происхождения – березовыми опилками. Образцы полимера П(ЗГБ) были синтезированы с использованием штамма *Cupriavidus eutrophus* B10646 и запатентованной технологии; полимер имел следующие свойства: степень кристалличности 75%, температура плавления 176 °С, температура термического разложения 287 °С, молекулярная масса 590 кДа [74].

В качестве наполнителя использовали березовые опилки. Опилки получали путем измельчения древесины березы (*Betula pendula* Roth) на деревообрабатывающем станке MD 250-85 (СтанкоПремьер Россия). Затем сушили при 60 °С в течение 120 ч до постоянного веса; для отделения фракции по размеру частиц использовали сетку 0,5 мм; степень кристалличности 26 %; начало термического разложения 220 °С.

Полимер и опилки были измельчены в ультразвуковой мельнице ZM 200 (Retsch, Германия). Для достижения высокой тонкости помола полимера материал и корпус мельницы с помощью шлифовальных инструментов предварительно охлаждали при 80 °С в течение примерно 30 мин. в морозильной камере Innova U101 (New Brunswick Scientific, США). Измельчение проводили с использованием сита с 2-мм отверстиями при скорости вращения ротора 18000 об/мин. Фракционный состав порошков полимера и наполнителя определяли с использованием вибрационного ситового шейкера AS 200 control (Retsch, Германия). Затем полимерный порошок смешивали с порошком наполнителя в настольном планетарном миксере SpeedMixer DAC 250 SP (Hauschild Eng., Германия); Время перемешивания составляло 1 мин, а скорость составляла 1000 об/мин. Гербицидные гранулы готовили с использованием полимерной пасты, смоченной этанолом и смешанной с опилками и гербицидом в шнековом грануляторе Fimar (Италия). Составы содержали следующие процентные доли компонентов: П(ЗГБ)/опилки/гербицид – 50/30/20 (мас.%). Подробно процедура получения и свойства смесевой основы описаны в работе [75].

2.3 Общий план эксперимента

Эксперимент проводился в лабораторных и полевых условиях, и включал в себя несколько этапов:

1 Этап: Влияние водных растворов шести пестицидов (описанных выше в п. 2.1) на почвенный микробиоценоз в лабораторных условиях.

Для модельного эксперимента 100 г полевой почвы помещали в пластиковые контейнеры, которые размещали при температуре 25 °С и поддерживали влажность 50%. В почву вносили водные растворы исследуемых пестицидов в концентрации 0,1 мг/г почвы. Отбор образцов из контейнеров проводили через сутки и через месяц после внесения пестицидов. В отрицательном контроле пестициды в почву не вносили.

2 Этап: Влияние различных способов доставки гербицидов (метрибузин, трибенурон-метил) и фунгицидов (эпоксиконазол, тебуконазол) в почву на ризосферную микрофлору пшеницы и ячменя в лабораторных условиях.

В данном эксперименте тестовые растения яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и ячменя (*Hordeum vulgare* L.) выращивали с использованием климатической камеры. В пластиковые контейнеры объемом 500 см³ (площадью поверхности 54 см²) вносили полевую почву массой 400г. Пшеницу(сорт «Новосибирская 15») и ячмень (сорт «Биом») засевали из расчета 150 г семян на 1 м². Одновременно в почву вносили пестициды. Эксперимент включал следующие варианты обработки пестицидами:

- 1) Отрицательный контроль – без добавления пестицидов, К(-);
- 2) Положительные контроли – внесение водных растворов пестицидов в концентрациях, рекомендованных для полевого применения:

К(+)_{МЕТ} – раствор метрибузина в концентрации 87,5 мг/м²

К(+)_{ТБМ} – раствор трибенурон-метила в концентрации 1,5 мг/м²

К(+)_{ТЕБ} – раствор тебуконазола в концентрации 2,7 мг/м²

К(+)_{ЭПОК} – раствор эпоксиконазола в концентрации 8,75 мг/м²

- 3) Экспериментальные формы пестицидов, депонированные в смесовую основу из П(ЗГБ) с добавлением опилок и изготовленные в виде гранул: П(ЗГБ)/опилки/пестицид – 50/30/10 (вес. %).

Образцы для эксперимента (гранулы ПГА с пестицидом), упакованные в мелкочаеистые оболочки, были помещены в почву на глубину 1,5-2 см, и в микроэкосистему были внесены две гранулы, равные 1,2 мг препарата.

Растения выращивали в климатической камере (Фитотрон) ЛиА-2 (Россия), поддерживая суточный цикл по температуре, освещенности и влажности в шестиступенчатом режиме «ночь – раннее утро – позднее утро – день – ранний вечер – поздний вечер». Температура изменялась в пределах от 10 °С ночью до 18 °С днем. Освещенность изменялась от 0 до 300 мкмоль/м²/с

с шагом 100 мкмоль/м²/с. Минимальную влажность почвы поддерживали на уровне 50 % (Рис. 8).



Рисунок 8 – Климатическая камера Фитотрон-ЛиА-2

3 Этап: Влияние различных способов доставки гербицидов (метрибузин и трибенурон-метил) в почву на ризосферную микрофлору культурных растений в полевых условиях.

Эксперименты по влиянию свободных и депонированных форм гербицидов метрибузина и трибенурон-метила на микрофлору растений проводили на экспериментальной полевой площадке Красноярского государственного аграрного университета. В качестве тестовых растений использовали пшеницу, ячмень, томаты и свеклу (Рис. 9).

Высев семян пшеницы, ячменя и свеклы в открытый грунт был проведен 22 мая, высадка рассады томатов – 15 июня 2019г. Одновременно с посадкой растений в почву вносили гранулы экспериментальных форм гербицидов. Обработка опытных делянок водным раствором гербицидов (положительный контроль) проводилась после появления всходов в концентрациях, рекомендованных для полевого применения. В качестве отрицательного

контроля были использованы почва и растения, которые не подвергались обработке гербицидами.



Рисунок 8 – Экспериментальная площадка с посевами тестовых растений

2.4 Микробиологические исследования

Микробиологический анализ проводили общепринятыми методами почвенной микробиологии [76]. Так как количество микроорганизмов в объектах внешней среды, как правило велико, то для получения отдельных колоний готовили десятикратные разведения почвы в стерильной водопроводной воде. В работе были использованы разведения $10^5 - 10^7$. Из каждого разведения делали три параллельных посева. Чашки с посевами выдерживали при температуре $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Количественный учет микроорганизмов проводили на 3-7 сутки культивирования. Количество микроорганизмов в исследуемых образцах (X) определяли по формуле:

$$X = \frac{a \times b}{c \times d} \text{ где,}$$

a – среднее количество колоний (в чашке);

b – разведение (из которого произвели высев);

c – количество, вносимой суспензии (мл);

d – масса исследуемой почвы, г (или объём суспензии, мл).

Отбор образцов в условиях лабораторных микроэкосистем проводили через 14 суток после высева семян и внесения пестицидов в почву. Отбор образцов в полевых опытах проводили через 14 суток и через месяц после внесения пестицидов.

В качестве питательной среды для выделения и учета бактерий применяли среду мясопептонный агар (Nutrient agar, HiMedia).

Работа включала следующие этапы:

1. Приготовление разведений
2. Посев на плотную питательную среду в чашки Петри
3. Подсчет выросших колоний.
4. Выделение чистой культуры.
5. Идентификация микроорганизмов.

Идентификацию чистых культур микроорганизмов проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии на масс-спектрометре MALDI-TOF (Bruker, Германия) (Рис. 10).

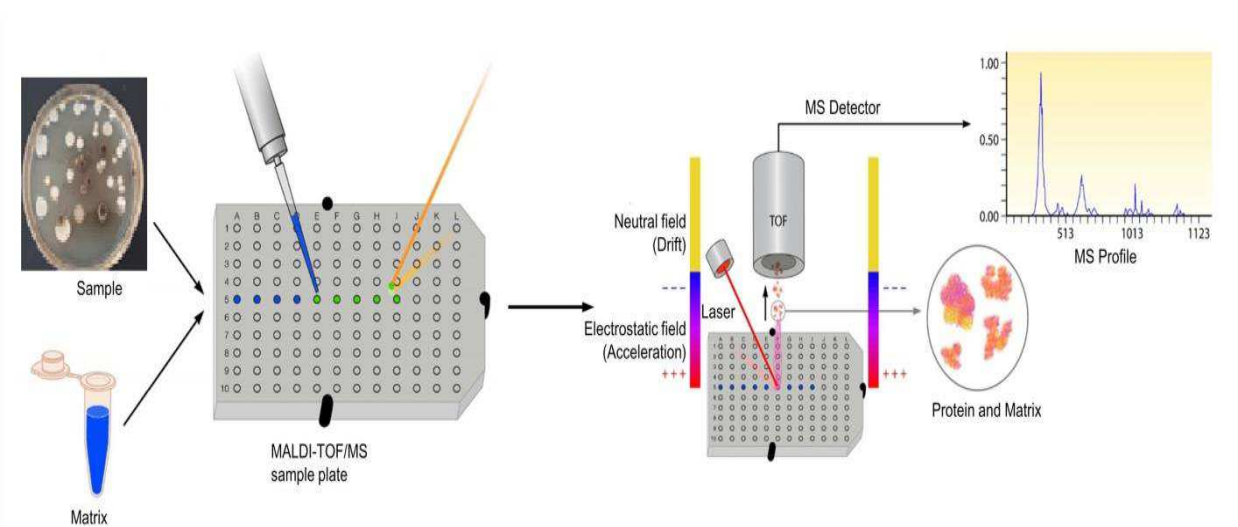


Рисунок 10 – Принцип действия масс спектрометра

2.5 Идентификация микроорганизмов методом MALDI-TOF

Масс-спектрометрия – это аналитический метод измерения массы частиц или атомов аналита, который включает применение физических законов движения заряженных частиц в магнитных и электрических полях и позволяет получать протеомные профили белков, пептидов, нуклеиновых кислот, а также микроорганизмов, дрожжей и грибов. Заряженные частицы разделяются временем пролета на определенное расстояние. В то же время время полета частицы пропорционально отношению массы данной частицы к ее заряду; таким образом, масс-спектрометрия является разновидностью высокоточного молекулярного баланса. Клетки каждого типа микроорганизмов имеют свой набор рибосомальных белков, который анализируется устройством. Программа Biotyper суммирует отдельные спектры белковых молекул, которые составляют профиль белковых масс микроорганизма. Состав постоянных рибосомальных белков уникален для каждого типа микроорганизмов, что обеспечивает надежную идентификацию. Впоследствии программа сравнивает полученный спектр с профилями белковых масс в базе данных. Результат получается в форме спектральных графиков белков или в виде списков пиковых масс, которые отражают количество белков с определенным молекулярным весом. Чувствительность метода составляет 10⁴-10⁵ микробных клеток на клетку или 10⁷-10⁸ микробных клеток на 1 мл [77].

Существует несколько методов пробоподготовки для анализа на MALDI-ToF масс-спектрометре.

1. Прямое применение образцов к цели
2. Экстракция белков с использованием муравьиной кислоты
3. Экстракция белка с использованием трифторуксусной кислоты.

В нашей работе мы использовали прямой метод размещения образцов на мишени. Он состоит из следующего:

Одна изолированная колония микроорганизма захватывается одноразовой микробиологической петлей (стерильная зубочистка) и равномерно наносится на лунку чипа, не покидая края. Сразу после сушки биомасса, нанесенная на чип, покрывается 1 мкл матрицы.

Подождите, пока раствор матрицы высохнет. Затем вы можете продолжить масс-спектрометрические исследования (Рис. 11).

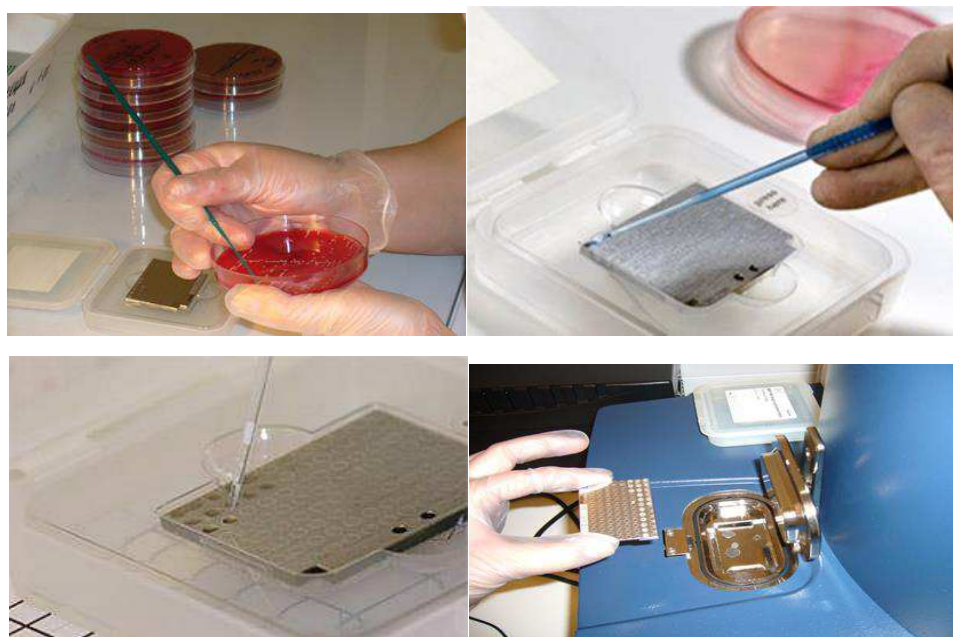


Рисунок 9 – Прямое нанесение образцов

Недопустимо смешивание образцов из-за подтекания матрицы. Если произошло подтекание мишень MALDI очищается. Процесс подготовки повторить снова.

После проведения мероприятий по идентификации, чип с нанесенными на него образцами дезинфицируют 70 %-м спиртом, промывают бидистиллированной водой, сушат, убирают в спец.чехлы для чипов. Далее чип может быть использован повторно.

Результаты учитываются с помощью программ, автоматическая идентификация выполняется на основе сравнения исходных спектров, собранных с эталонными спектрами базы данных. Весь процесс идентификации отображается на экране монитора (Рис. 12).

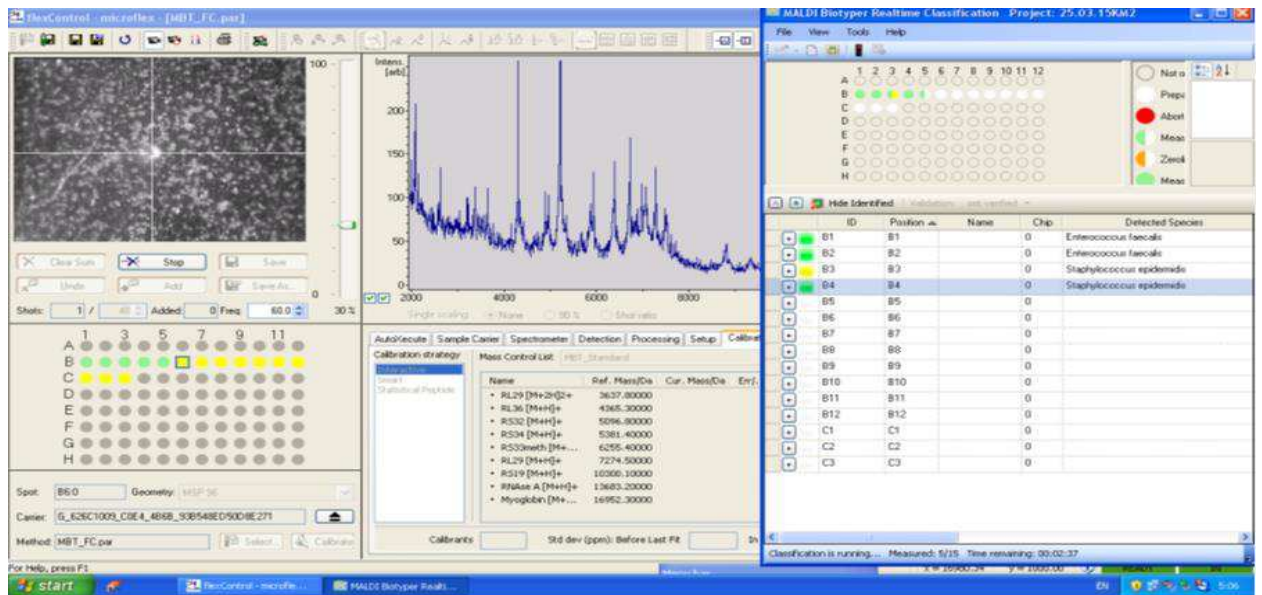


Рисунок 12 – Результат идентификации микроорганизмов

Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Характеристика почвы и влияние пестицидов на почвенную микрофлору

В нашей работе было исследовано влияние пестицидов в свободном виде на микрофлору почвы в лабораторных экосистемах без растений. Агропреобразованная почва была взята с экспериментальных полей учебного хозяйства «Миндерлинское» Красноярского государственного аграрного университета (56° с.ш. 92° в.д.). Почва представляла собой чернозем с распределением по размерам тяжелого суглинка плотностью от 0,80 до 1,24 г / см³; рН 7,3 с низким содержанием аммония (35 мг / кг) и нитрата (9,2 мг / кг) азота и высоким содержанием фосфора (280 мг / кг) и калия (250 мг / кг).

Исследования показали, что действие пестицидов повлияло, как на общую численность, так и на структуру микробиоценоза. Через сутки после внесения пестицидов достоверного влияния на численность микроорганизмов не было выявлено, однако при длительном воздействии гербицида через месяц, отмечено снижение численности бактерий по сравнению с контрольным образцом (Рис.13).

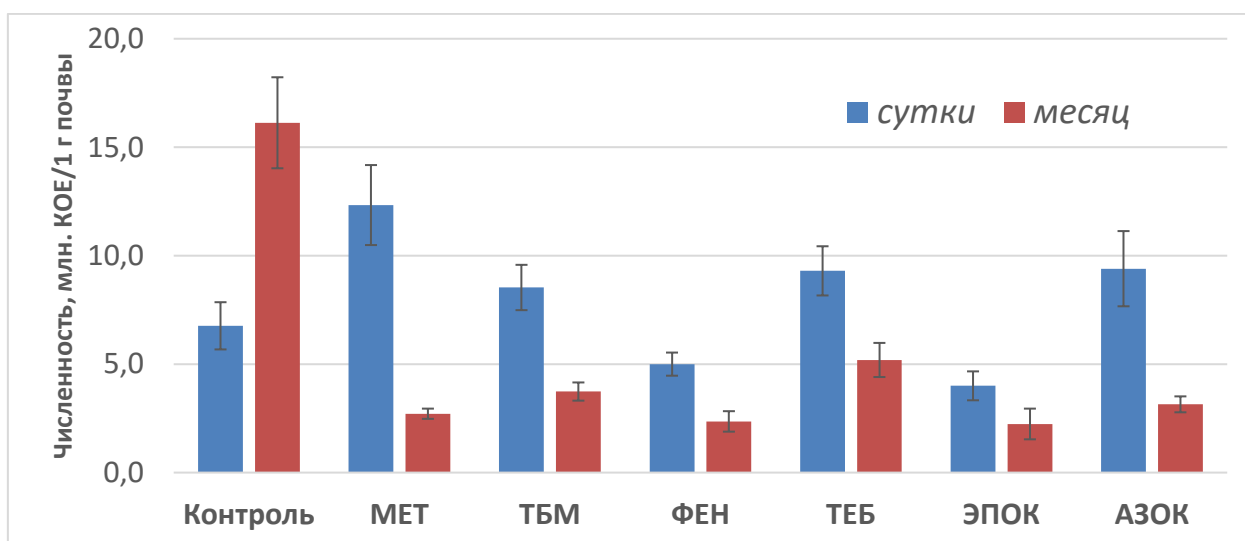


Рисунок 13 – Общая численность микроорганизмов

Кроме того, было выявлено селективное действие пестицидов на видовой состав микробного сообщества (табл. 1). В контроле и большинстве опытных вариантов доминировали бактерии рода *Bacillus*. Это обусловлено тем, что *Bacillus* относится к типичным почвенным микроорганизмам, а также эти бактерии способны использовать сложные органические вещества, в том числе пестициды, в качестве субстрата. При внесении трибенурон-метила и метрибузина доля грамотрицательных бактерий увеличивалась от 31,6% до 53,0% соответственно. Среди них значительно выросла доля представителей *Pseudomonas*. С другой стороны, при внесении феноксапроп-п-этила отмечено наиболее выраженное снижение видового разнообразия и абсолютное доминирование представителей рода *Bacillus*.

Таблица 1 – Видовой состав доминантных бактерий в образцах почвы через сутки после внесения пестицидов

Вид бактерий	Контроль	Гербициды			Фунгициды		
		Феноксапроп - п-этил	Трибенурон-метил	Метрибузин	Эпоксиконазол	Тебуконазол	Азоксистробин
Bacillus spp.	70,1	68,4	39,6	25,2	75,6	78,5	72,3
<i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	10,2					3,6	1,6
<i>Agrococcus jenensis</i>	6,6		2,8	13,2	12,1	5,4	9,9
<i>Pseudomonas</i> spp гр-	5,3	31,6	39,4	37,1			
<i>Gluconobacter oxydans</i> гр-	2,6				9,8		3,2
<i>Micrococcus luteus</i>	2,6		4,2	6,6			1,6
<i>Aeromonas molluscorum</i> гр-	1,3						1,6
<i>Streptomyces avidinii</i>	1,3		2,8	1,3		7,1	
<i>Stenotrophomonas</i> spp гр-			5,6	6,6			3,2
<i>Arthrobacter oxydans</i>			2,8	0,7			
<i>Clostridium cadaveris</i>			2,8				
<i>Terrimonas ferruginii</i> гр-				5,3			
<i>Bergeyella zoohelcum</i> гр-				4,0			
<i>Nocardia yamanashiensis</i>						5,4	
<i>Burkholderia cepacia</i> гр-							6,6
<i>Lactobacillus antri</i>					2,5		
Грамотрицательные, %	9,2	31,6	45,0	53,0	9,8	0	14,6

Под влиянием фунгицидов через сутки общее содержание грамположительных бактерий увеличилось до 90 %, при этом доля *Bacillus* – от 72,5 % до 78.5%. В образце с эпоксиконазолом значительно выросла доля

представителей *Agrococcus jenensis* (12,1 %) и *Gluconobacter oxydans* (9,8 %), а также был обнаружен не выявленный ранее вид *Lactobacillus antri*. В образце почвы с тебуконазолом отмечается появление *Nocardia yamanashiensis*. Вид *Byrkhoderia cepacia* 6.6% был выделен только в образце с азоксистробинном.

Через месяц экспозиции видовой состав микробного сообщества значительно изменился как в контрольной почве, так и под действием пестицидов. В контрольном образце почвы в 100% проб преобладали грамположительные бактерии (табл. 2), из них *Bacillus spp.* 49,7%; *Streptomyces* 39,6%; *Arthrobacter* 10,7%.

Таблица 2 – Видовой состав доминантных бактерий в образцах почвы через месяц после внесения пестицидов

Вид бактерий	Контроль	Гербициды			Фунгициды		
		Феноксапроп-п-этил	Трибенурон-метил	Метрибузин	Тебуконазол	Эпоксоназол	Азоксистробин
<i>Bacillus spp.</i>	49,7	60,6	55,5	52,3	72,1	51,6	44,9
<i>Streptomyces spp.</i>	39,6	12	27,6	2,4		16,2	8,6
<i>Arthrobacter spp.</i>	10,7	9,2	3,1		1,3	25,8	5,2
<i>Actinomycetes</i>		6,1	10,7	7,2	1,3		
<i>Lactococcus lactis</i>		3		28,5		6,4	1,8
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>		3		4,8			3,5
<i>Micrococcus luteus</i>				4,8			3,5
<i>Paenibacillus agarexedens</i>			3,1				
<i>Lactobacillus suebicus</i>					16,9		30,7
<i>Variovorax paradoxus</i> Гр-					3,9		1,8
<i>Kocuria polaris</i>					2,6		
<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i> Гр-					1,9		
Грамотрицательные,%	0				5,8		1,8

Аналогичное доминирование грамположительных бактерий наблюдали в образцах почвы с гербицидами. Так, к примеру, в пробе с трибенурон-метилом преобладали *Bacillus* 55,5%; *Streptomyces spp.* 27,6% и *Actinomycetes* 10,7%. В пробе с феноксапроп-п-этилом – *Bacillus* 60,6% и актинобактерии

6,1%. В почве с метрибузином наряду с бактериями рода *Bacillus* возросло количество *Lactococcus lactis* до 28,5%.

При анализе видового состава микроорганизмов в почве с фунгицидами также отмечали преобладание бактерий *Bacillus* (от 44,9 до 72,1%), как и в контрольной почве. Однако в образцах с тебуконазолом и азоксистробином обнаружено незначительное количество грамотрицательных бактерий *Variovorox paradoxus* – 3,9% и 1,8% соответственно.

Таким образом, через сутки после внесения пестицидов были отмечены наиболее выраженные изменения видового состава почвенных бактерий в образцах почвы и снижение общей численности органотрофных бактерий. Через месяц после обработки почвы пестицидами различия микрофлоры в контрольных и опытных вариантах были менее значительными.

3.2 Таксономическое разнообразие микрофлоры почвенных микрэкосистем с растениями пшеницы и ячменя под действием разных форм гербицидов

Был проведен микробиологический анализ образцов почвы из контейнеров, засеянных пшеницей и ячменем с сорными растениями (щирца и горчица), в которые были внесены гранулы с депонированными гербицидами – трибинурон-метилом (ТБМ) и метрибузином (МЕТ). Отбор образцов почвы проводили через 14 суток после высева семян. В качестве положительного контроля в почву вносили водные растворы гербицидов в рекомендованных дозах, в отрицательном контроле препараты в почву не добавляли.

В ходе оценки влияния депонированных форм гербицидов на почвенную микрофлору, были получены следующие результаты (рис. 14).

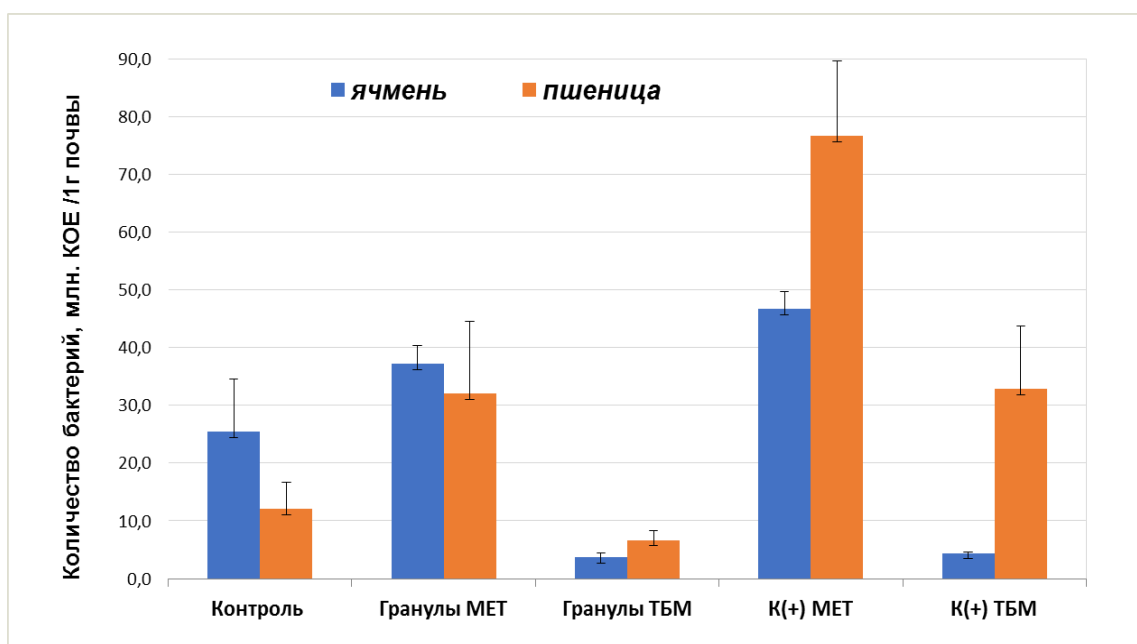


Рисунок 14 – Влияние депонированных препаратов гербицидов на численность почвенных бактерий

Внесение различных форм гербицидов изменяло общий титр микроорганизмов в большинстве случаев в сторону увеличения по сравнению с исходной почвой, кроме образцов с гранулами ТБМ и К(+)-ТБМ в образцах с ячменем.

Идентификация выделенных культур микроорганизмов показала, что в контрольных образцах почвы пшеницы и ячменя, а также при внесении гербицидов, преобладали бактерии рода *Bacillus* (рис. 15). Это может быть связано с тем, что бактерии рода *Bacillus* относятся к типичным почвенным микроорганизмам, среди видов бацилл есть ПГА-деструкторы, а также эти бактерии способны использовать сложные органические вещества, в том числе пестициды, в качестве субстрата.

При внесении депонированных форм препаратов заметно изменение таксономического состава микроорганизмов. В образцах с пшеницей отмечается появление представителей рода *Actinomyces* по 2 % с ТБМ и МЕТ соответственно, *Arthobacter citreus* 4 % и 11 %, (рис.15). При внесении свободных форм с ТЕБ увеличивается доля *Streptomyces*, а при внесении МЕТ – доля *Rhizobium* по сравнению с контролем. Также обнаружили *Micrococcus*

luteus 10 % и 6 % с ТБМ и МЕТ, соответственно, которые отсутствовали в контрольном образце.

Вид бактерий	Контроль	Форма доставки гербицидов			
		Гранулы ТБМ	К(+) ТБМ	Гранулы МЕТ	К(+) МЕТ
ПШЕНИЦА					
<i>Bacillus spp</i>	86,3	71	84	54	79
<i>Paenibacillus gluconolyticus</i>	8			23	
<i>Rhodococcus erythopolis</i>	2,3	7		2,3	
<i>Arthobacter citreus</i>	1,8	4		11	
<i>Rhizobium radiobacter</i>	1,6			2,3	6
<i>Lactobacillus lactis</i>		12		4,2	9
<i>Micrococcus luteus</i>		3	10	1,2	6
<i>Actinomyces</i>		2		2	
<i>Streptomyces spp.</i>		1	6		
ЯЧМЕНЬ					
<i>Bacillus spp</i>	27,7	54,4	63,6	66	42,5
<i>Lactobacillus spp</i>	46	24		26,1	48
<i>Arthobacter spp</i>	26,3	8,6	12		1,38
<i>Pseudomonas spp</i>		4,2	16,4		
<i>Rhodococcus spp</i>		3,2		4,3	0,82
<i>Rhizobium radiobacter</i>		4,3	8	2,6	
<i>Micrococcus luteus</i>		1,3		0,52	7,3
<i>Actinomyces</i>				0,48	

Рисунок 15 – Видовой состав доминантных микроорганизмов в ризосфере пшеницы и ячменя после внесения свободных и депонированных форм гербицидов

Что касается образцов с ячменем, то здесь более выражено увеличение видового разнообразия микробного сообщества при внесении обеих форм гербицидов по сравнению с отрицательным контролем (рис. 15). Увеличилась доля грамотрицательных бактерий *Pseudomonas* в образцах с ТБМ в обеих формах.

Сравнение со свободными формами гербицидов показало, что в депонированных формах микрофлора отличается от положительного и отрицательного контролей в сторону увеличения разнообразия микроорганизмов. В образцах с гранулами ТБМ и МЕТ были выявлены

Rhodococcus 3,2% и 4,3 % соответственно. Отметим появление нового вида характерного только для гранул с МЕТ *Actinomyces* 0,48 %.

3.3 Таксономическое разнообразие микрофлоры почвенных микроэкосистем с растениями пшеницы и ячменя под действием разных форм фунгицидов

Был проведен микробиологический анализ образцов почвы из контейнеров, засеянных пшеницей и ячменем, зараженных фитопатогенными грибами возбудителями корневых гнилей (*Alternaria*, *Fusarium*, *Bipolaris*). Аналогично предыдущему опыту, в почву были внесены гранулы с депонированными фунгицидами – тебуконазолом (ТЕБ) и эпоксиконазолом (ЭПОК). Отбор образцов почвы проводили через 14 суток после высева семян. В качестве положительного контроля в почву вносили водные растворы фунгицидов в рекомендованных дозах, в отрицательном контроле препараты в почву не добавляли.

В ходе оценки влияния депонированных форм фунгицидов на почвенную микрофлору, были получены следующие результаты. Ни одна из исследованных препаративных форм не оказывала отрицательного воздействия на почвенной бактерии (рис. 16). Наоборот, во всех случаях, был зафиксирован рост численности микроорганизмов по сравнению с контрольным образцом почвы.

Рост численности бактерий при использовании депонированных форм фунгицидов может объясняться увеличением численности бактерий-деструкторов ПГА, которые используют данные полимеры в качестве субстрата.

Микробиологический анализ показал, что в большинстве образцов ризосферной почвы пшеницы и ячменя доминировали *Bacillus pumilus* (50-91%) (табл. 3).

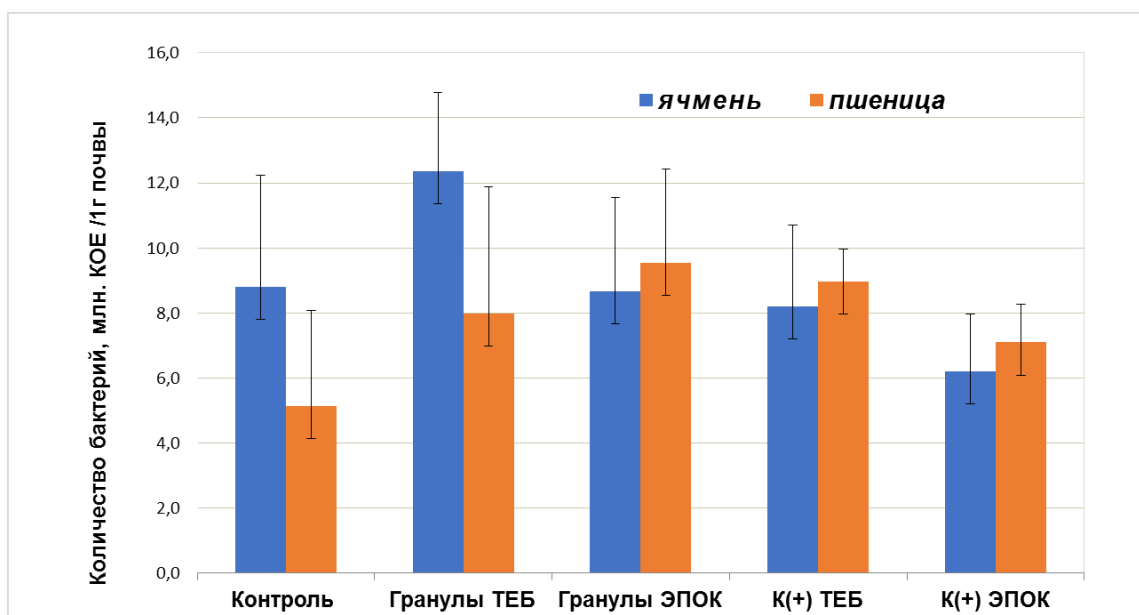


Рисунок 16 – Влияние депонированных препаратов фунгицидов на численность почвенных бактерий

При внесении гранул ТЕБ и ЭПОК в почву с посевами ячменя были обнаружены вид, характерный только для этого варианта: *Sphingomonas koreensis* 19 % и 7,2%, и отмечалось увеличение численности *Arthobacter* по сравнению с контрольным образцом. В образце со свободными формами был обнаружен *Actinomyces* 1% и 2% отсутствующий в других вариантах (табл. 3).

Так в образцах с пшеницей, обработанных свободным ТЕБ, наряду с бациллами идентифицированы *Arthobacter citreus* 7,5 %, *Lactobacillus reuteri* 8 %, *Pseudomonas mandelii* 5,3 %, *Rhizobium radiobacter* 10 %, *Sphingomonas koreensis* 7 % и *Sphingobium xenophagum* 12,2 %, что показывает значительное отличие от контрольных образцов и депонированных.

Использование ТЕБ и ЭПОК в депонированной форме в образце с пшеницей, привело к уменьшению *Bacillus* 60% -71%, по сравнению с контролем, но увеличилась доля *Arthobacter* 15,6%-12,3%, которая не отмечалась в контроле.

Таблица 3 – Видовой состав доминантных микроорганизмов в ризосфере пшеницы и ячменя после внесения депонированных форм фунгицидов и в свободном виде

Вид бактерий	Контроль	Форма доставки фунгицидов			
		К (+) ТЕБ	Гранулы/ТЕБ	К (+) ЭПОК	Гранулы/ЭПОК
ЯЧМЕНЬ					
Bacillus spp	88	91	69	81	79
Arthobacter spp	5,5	4	12	3,8	11,8
Lactococcus hilgardii	4,3	2		1,5	
Bergeyella zoohelcum	2,2				
Streptomyces spp		2		4,4	2
Actinomyces		1		2	
Sphingomonas koreensis			19		7,2
Agromyces hipputatus				7,3	
ПШЕНИЦА					
Bacillus spp	73,9	50	69	69	71
Paenibacillus ehinensis	16		7,4		4,1
Rhizobium radiobacter	6	10		4	
Lactobacillus reuteri	4,1	8		5,3	3,2
Sphingobium xenophagum		12,2			
Sphingomonas koreensis		7			
Streptomyces galilaeus				2,9	
Arthobacter spp		7,5	15,6	12,8	12,3
Pseudomonas mondellii		5,3	3,5		4,6
Micrococcus luteus			4,5	6	4,8

3.4 Таксономическое разнообразие микрофлоры в ризосфере свеклы и томатов под действием разных форм гербицидов в полевых опытах

Эксперименты проводили на делянках опытного участка Красноярского государственного аграрного университета. Тестовые растения (свеклу и томаты) выращивали в открытом грунте на естественном фоне сорной растительности. В почву вместе с высадкой растений вносили гранулы гербицидов, депонированных в разрушаемую основу из П(ЗГБ) и опилок. Для сравнения использовали водные растворы гербицидов, которые наносили методом опрыскивания после всходов сорняков в соответствии с рекомендациями для полевого применения.

Анализ микрофлоры исходной почвы показал, что доминировали грамотрицательные почвенные бактерии, представители *Pseudomonas vancouverensis* 79 %, на втором месте – *Bacillus pumilus* 9,6 % (рис. 17).

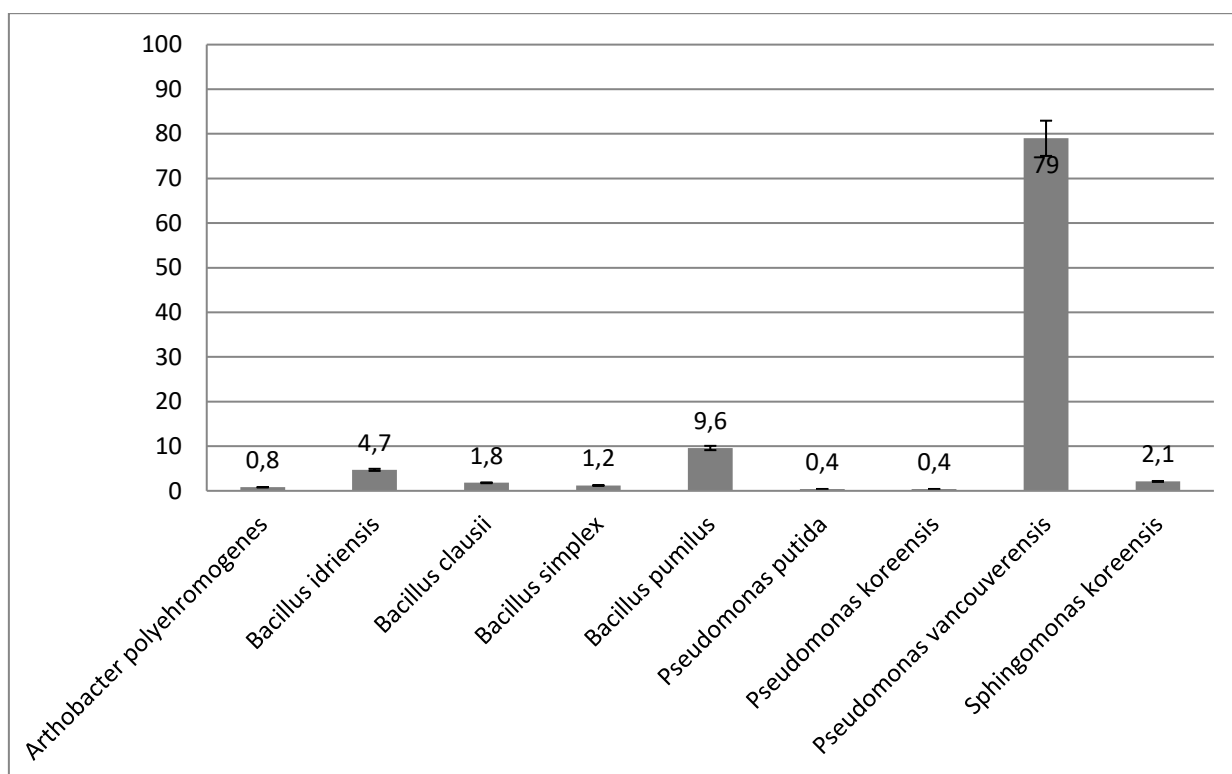


Рисунок 17 – Видовой состав микрофлоры исходной почвы опытного участка

В ходе оценки общей численности в полевых условиях, в образцах с ячменем, было выявлено, что свободный трибенурон метил оказывает наименьшее влияние на общую численность, по сравнению с контрольным образцом и остальными пробами (рис. 18). В образцах со свеклой и томатами была значительная разница по общей численности (рис. 19).

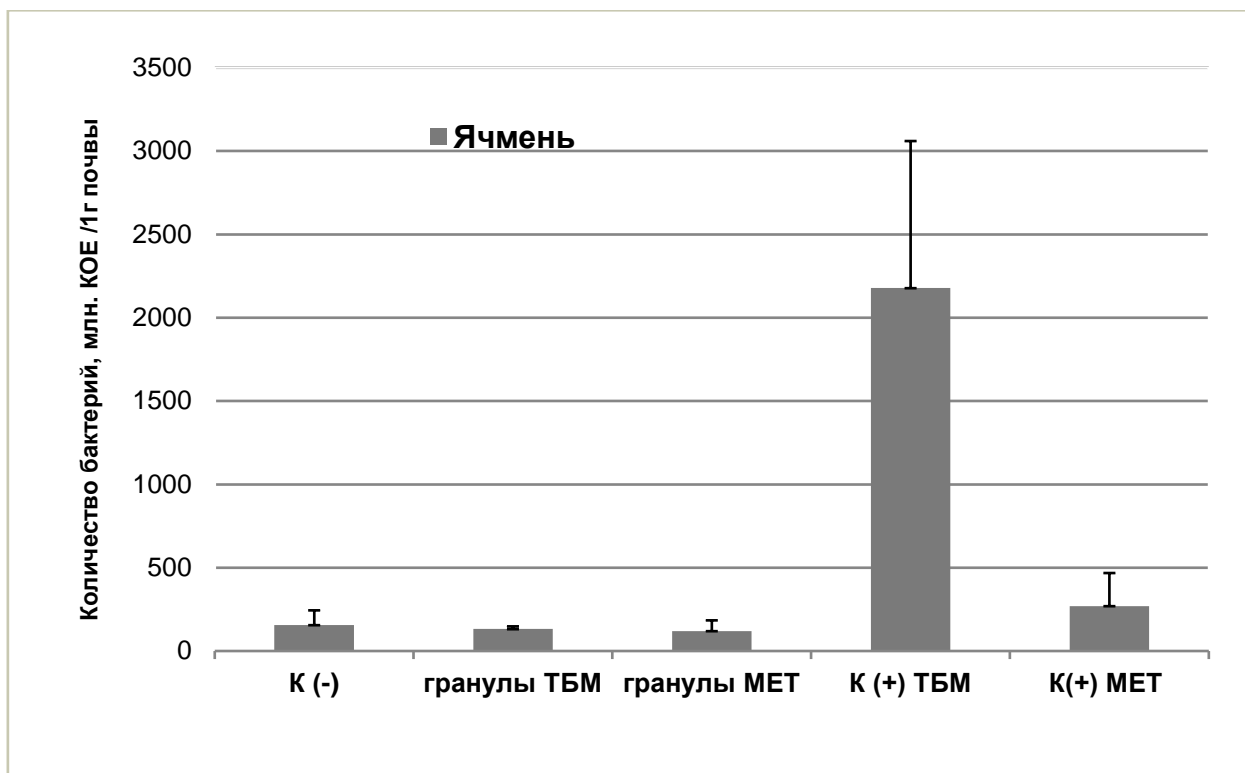


Рисунок 18 – Общая численность ризосферной микрофлоры ячменя в полевом опыте на 14 сутки

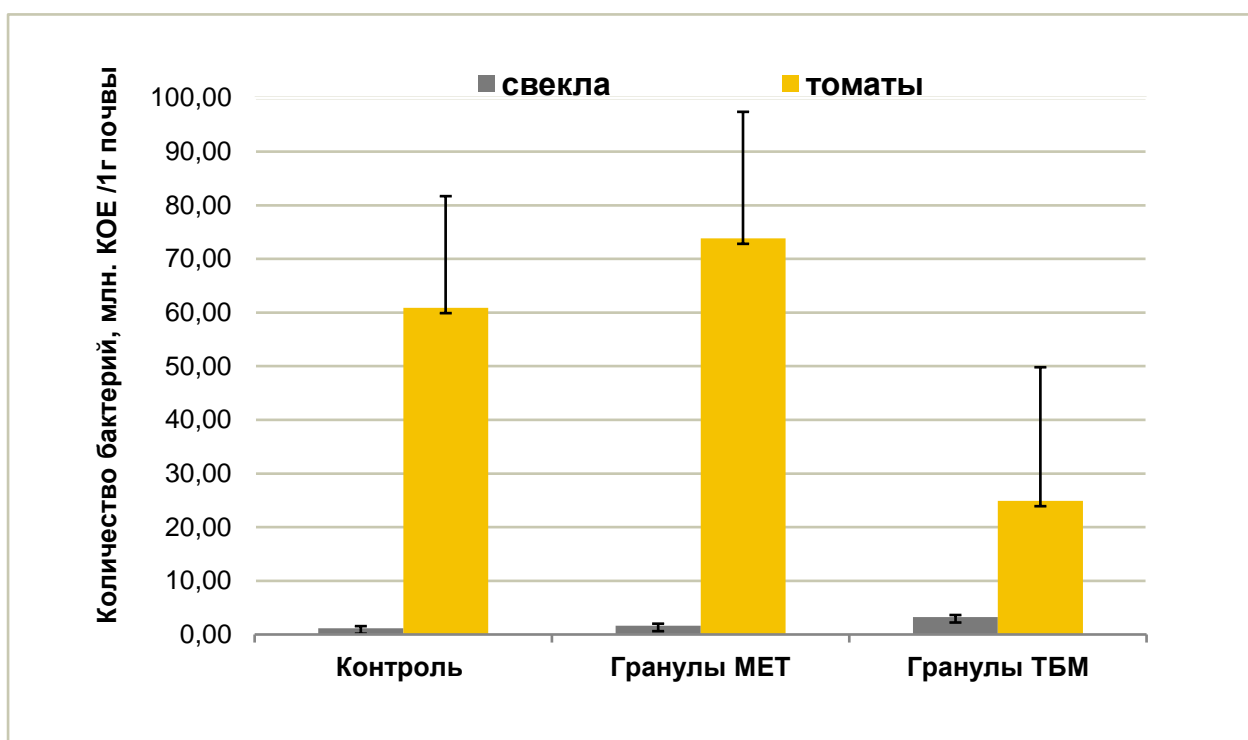


Рисунок 19 – Общая численность ризосферной микрофлоры растений свеклы и томатов в полевом опыте на 14 сутки

Через 14 суток после высадки свеклы в образцах почвы без внесения гербицидов (контроль отрицательный) отмечали преобладание бактерий рода *Bacillus*, доля которых составила 97 % (рис. 20). В вариантах опыта с внесением депонированных гербицидов, как и ранее в лабораторных микроэкосистемах, отмечали увеличение видового разнообразия микроорганизмов. При внесении гранул МЕТ, наряду с доминирующими *Bacillus pumilus* 44-46 % и *Bacillus cereus* 32-35 %, были идентифицированы представители *Micrococcus luteus* 5 %, *Paenibacillus lautus*, *Pseudomonas kilonensis*, *Stenotrophomonas acidaminiphila* – по 3 % и *Arthobacter pascens*, *Kocuria rosea*, *Microbacterium mitrae* – по 1 % (рис. 20)

При внесении гранул ТБМ, как уже отметили выше, преобладали виды рода *Bacillus*, и минорные виды: *Arthobacter aurescens* 1,7 %, *Microbacterium mitrae* 4,6 %.

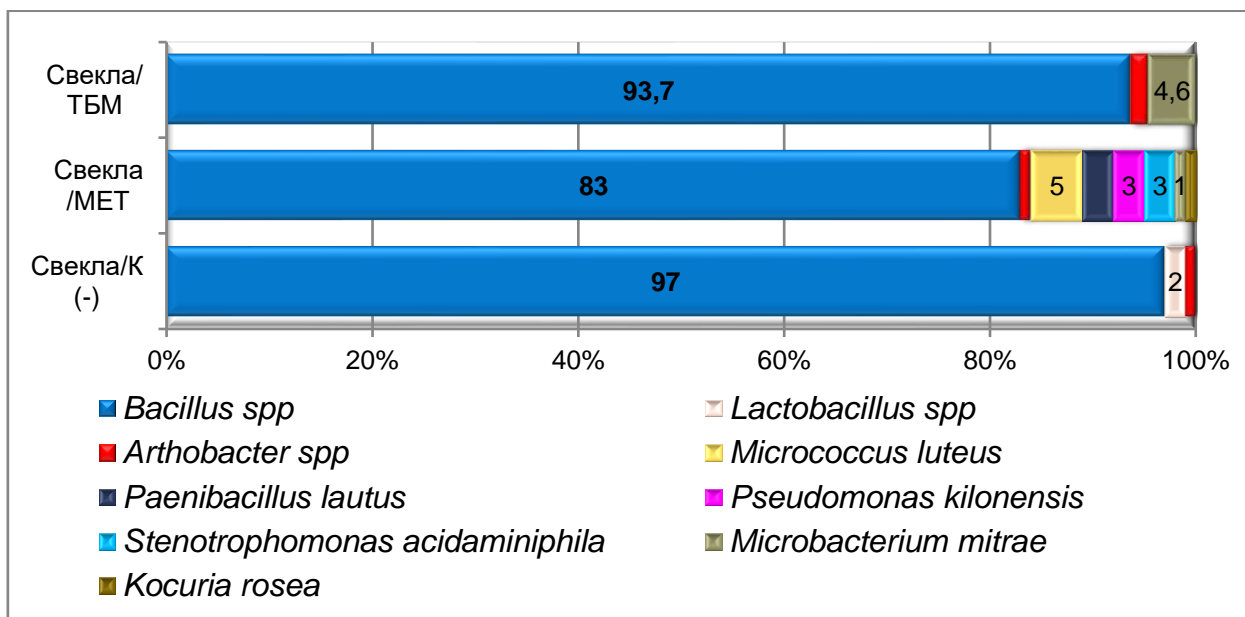


Рисунок 20 – Видовой состав доминантных бактерий в почве на опытных делянках со свеклой через 14 суток после внесения депонированных форм гербицидов

Следующий анализ был проведен через месяц после высева и включал отрицательный (без обработки) и положительные контроли (опрыскивание растворами МЕТ и ТБМ), а также вариант с внесением гранул, содержащих

гербициды (рис. 21). В результате идентификации микроорганизмов было установлено, что в отрицательном контроле состав микрофлоры изменился: уменьшилась доля бактерий рода *Bacillus* до 66 % и увеличилась доля грамотрицательных палочек – *Brevundimonas nasdae* 4,3 % и *Burkholderia anthina* 10 %.

При опрыскивании гербицидами в образцах с ТБМ и МЕТ бактерии рода *Bacillus* составляли более 90 % микробного сообщества, тогда как доля грамотрицательных палочек *Pseudomonas spp.* не превышала 6 %. Также были обнаружены виды рода *Arthobacter*.

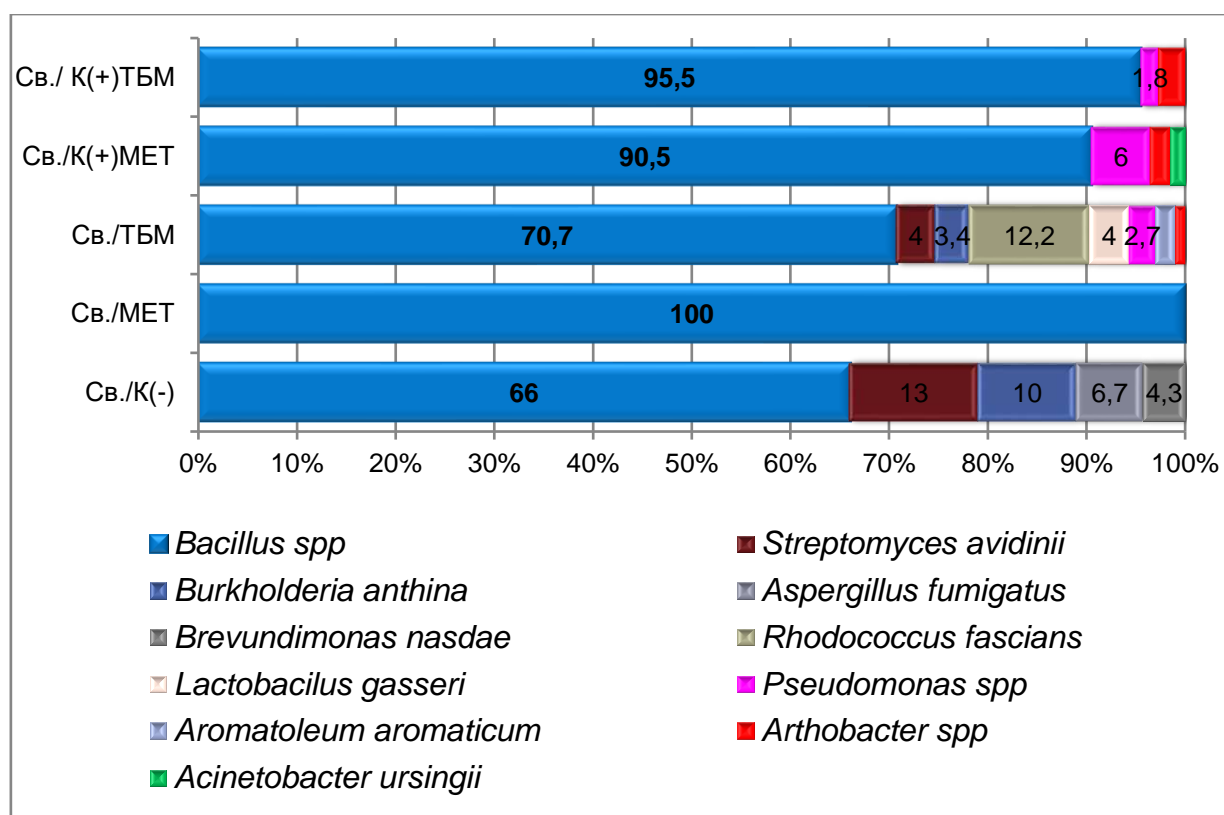


Рисунок 21 – Видовой состав доминантных микроорганизмов в почве на опытных делянках со свеклой через 30 суток после внесения свободных и депонированных форм гербицидов

При внесении в почву гранул депонированного МЕТ отмечали абсолютное доминирование бактерий *Bacillus spp.* – 100 %, а в образце почвы с депонированным ТБМ отмечали не только существенную долю *Bacillus spp.* 70,7 %, но и значительное видовое разнообразие микроорганизмов:

Rhodococcus fascians 12,2 %, *Streptomyces avidinii* 4 %, *Lactobacillus gasseri* 4%, *Burkholderia anthina* 3,4 %, *Pseudomonas spp* 2,7 %, *Aromatoleum aromaticum* 2 %, *Arthobacter aurecens* 1 %.

Анализ почвенной микрофлоры на опытных делянках с томатами на 14 и 30 сутки после высадки растений выявил аналогичную тенденцию: уменьшение доли бацилл и увеличение разнообразия состава микрофлоры при внесении гранул депонированных гербицидов, как МЕТ, так и ТБМ (рис. 22, 23).

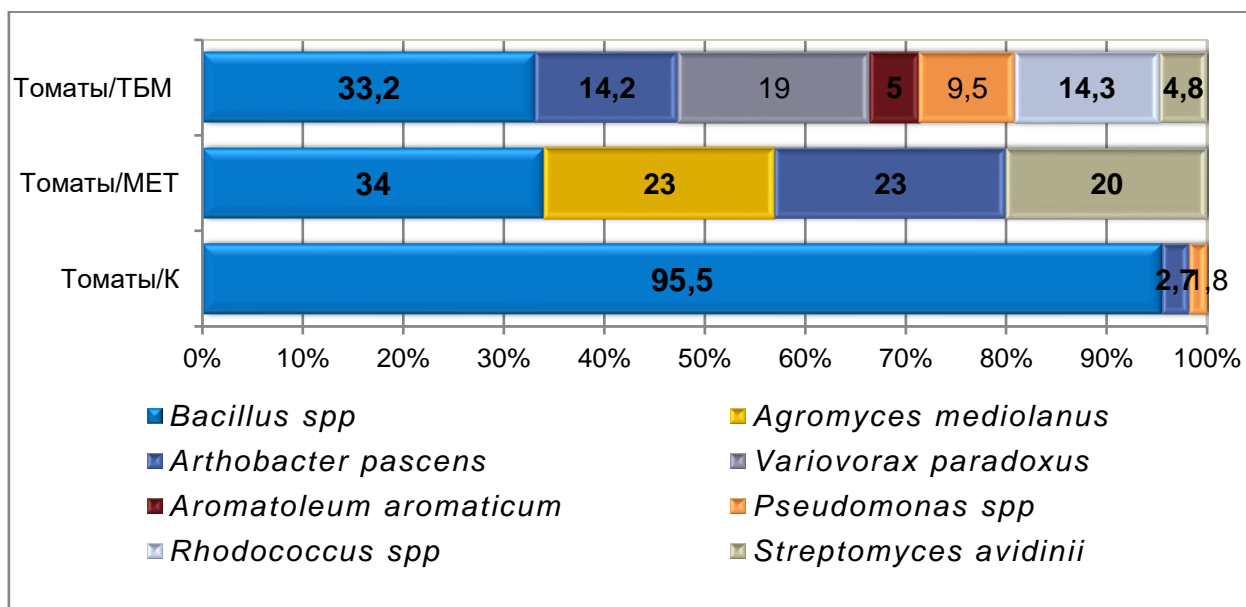


Рисунок 22 – Видовой состав доминантных микроорганизмов в почве на опытных делянках с томатами через 14 суток после внесения депонированных форм гербицидов

В результате идентификации микроорганизмов ризосферных бактерий ячменя через 14 суток после внесения гербицидов в свободных и депонированных формах (рис. 24), было установлено, что в отрицательном контроле доля бактерий рода *Bacillus* составила 70,4 %. При опрыскивании гербицидами, в образцах с ТБМ и МЕТ бактерии рода *Bacillus* значительно уменьшились, и увеличилось видовое разнообразие микроорганизмов. При внесении в почву гранул депонированного МЕТ и ТБМ отмечали аналогичное

снижение рода *Bacillus*, и наибольшее увеличение видового разнообразия по сравнению с контрольным (-) образцом и свободными формами.

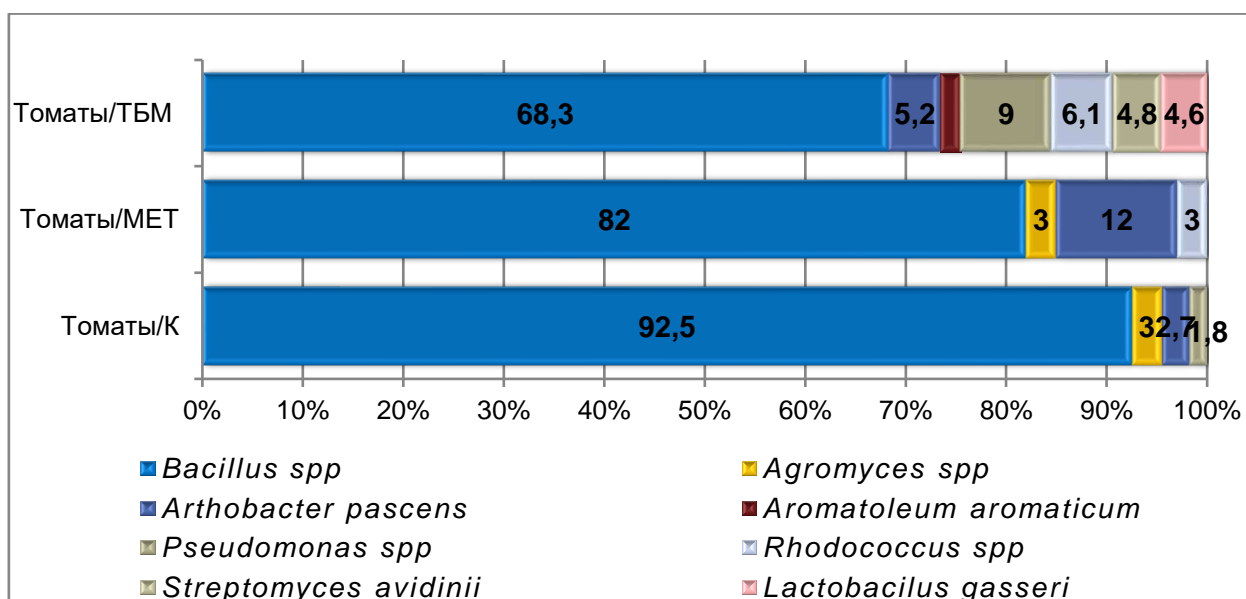
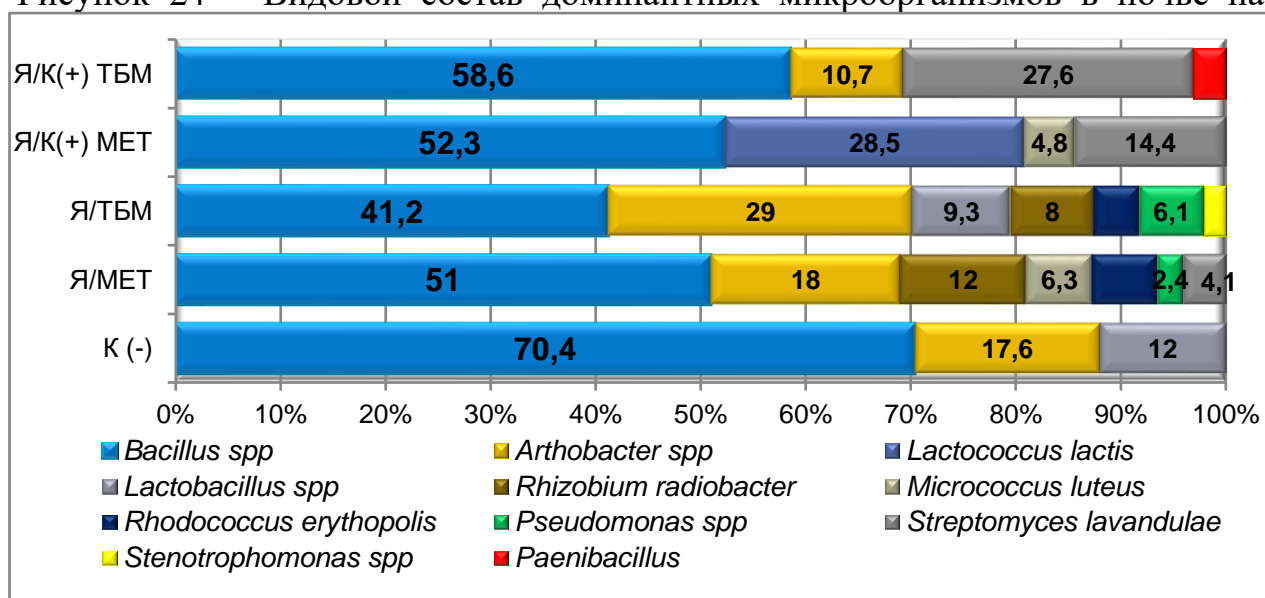


Рисунок 23 – Видовой состав доминантных микроорганизмов в почве на опытных делянках с томатами через 30 суток после внесения депонированных форм гербицидов

Рисунок 24 – Видовой состав доминантных микроорганизмов в почве на



опытных делянках с ячменем через 14 суток после внесения депонированных и свободных форм гербицидов

ВЫВОДЫ

По результатам исследования были сделаны следующие выводы:

1. Свободные формы гербицидных и фунгицидных препаратов через сутки после внесения слабо угнетали (эпоксиконазол), незначительно увеличивали (метрибузин) или не влияли на общую численность бактерий, но изменяли видовой состав, увеличивая разнообразие микробного сообщества. Гербицидные препараты увеличивали долю граммотрицательных бактерий в 5,9-7,4 раза по сравнению с контролем.

2. При хроническом действии пестицидов численность бактерий снизилась в 3,2-7,3 раза по сравнению с контролем; в сообществе доминировали грамположительные бактерии, доля которых составила от 94,2 до 100%.

3. Депонированные формы пестицидов, за исключением трибенурон-метила, не снижали численность ризосферных бактерий пшеницы и ячменя по сравнению с негативным контролем, увеличивали видовое разнообразие микробного сообщества и долю граммотрицательных бактерий родов *Pseudomonas*, *Sphingobium* и *Sphingomonas*, однако при этом доминирование рода *Bacillus* сохранилось во всех вариантах.

4. В полевых условиях сохранилась аналогичная тенденция. Не было отмечено угнетения роста бактерий в ризосфере растений при разных способах доставки гербицидов, среди доминирующих таксонов значительную долю составили бактерии рода *Bacillus* (41,2-100%); наиболее часто встречающиеся виды – *B. pumilus*, *B. cereus* и *B. simplex*. При внесении депонированных гербицидов увеличивалась доля бактерий *Rhodococcus*, *Pseudomonas* и *Stenotrophomonas*, относящихся к деструкторам сложных органических соединений и загрязнителей почв.

5. Депонированные формы пестицидов не оказывали негативного влияния на почвенный микробиоценоз и увеличивали долю бактерий-деструкторов.

Публикации по теме работы:

Пономарева А.Л. Влияние пестицидов на почвенную микрофлору // Сб. мат. XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Перспективны Свободны - 2019», 22-26 апреля 2019, Красноярск. С. 645-648

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aktar, W., Sengupta D., Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards// *Interdisciplinary toxicology*. 2009. 2(1). 1-12.
2. Lamichhane, J.R., Dachbrodt-Saaydeh S., Kudsk P., Messéan A. Toward a reduced reliance on conventional pesticides in European agriculture// *Plant Disease*. 2016. 100(1). 10-24.
3. Carvalho, F.P. Pesticides, environment, and food safety//*Food and Energy Security*. 2017. 6(2). 48-60.
4. Kah, M., Beulke S., Brown C.D. Factors influencing degradation of pesticides in soil// *Journal of agricultural and food chemistry*. 2007. 55(11). 4487-4492.
5. Moorman, T.B. Pesticide degradation by soil microorganisms: environmental, ecological, and management effects. In: *Soil Biology*. CRC Press. pp. 127-172.
6. Круглов, Ю. В. Микрофлора почвы и пестициды : учебное пособие / Ю. В. Круглов. – Москва : Агропромиздат, 1991. – 128 с.
7. Damalas, C. A. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators / C. A. Damalas, I. G. Eleftherohorinos // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. – 2011. – Vol. 8. – P. 1402–1419.
8. Puoci, F. Polymer in Agriculture / F. Puoci, F. Iemma, U. G. Spizzirri, G. Cirillo, M. Curcio and N. Picci // *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*. – 2008. – Vol. 3. – P. 299–314.
9. Gross, R. A. Biodegradable polymers for the environment / R. A. Gross, B. Kalra // *Green Chem*. – 2002 – Vol. 297 – P. 803–807.
10. 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.
11. Damalas, C. A. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators / C. A. Damalas, I. G. Eleftherohorinos // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. – 2011 – Vol. 8 – P. 1402–1419.

-
12. Puoci, F. Polymer in Agriculture / F. Puoci, F. Iemma, U. G. Spizzirri, G. Cirillo, M. Curcio and N. Picci // American Journal of Agricultural and Biological Sciences. – 2008 – Vol. 3 – P. 299–314.
13. Мельников, Н. Н. Химия пестицидов : учебное пособие. / Н. Н. Мельников. – Москва : Химия, 1968. – 494 с.
14. Агамова, А. Д., Ильюкова И. И., Петрова С. Ю. Оценка риска безопасного применения пестицидов на основе действующего вещества спиротетрамата. – 2019.
15. Согласованная на глобальном уровне система классификации опасности и маркировки химической продукции (СГС) Организация Объединенных Наций. Нью-Йорк и Женева, 2009 г. – 204 с.
16. Коновалова, В. А. / Нормирование качества окружающей среды: учебное пособие / В. А. Коновалова. – М.: РГУИТП, 2011. – С. 158.
17. Оценка избирательности действия пестицидов на растения. О-93 (электрофизиологический метод) [Электронный ресурс] : метод. указания для студентов биол. фак. / В. М. Юрин [и др.]. – Минск : БГУ, 2011 – Режим доступа : <http://www.elib.bsu.by>, ограниченный. ISBN 978-985-518-383-0.
18. Ганиев, М.М., Недорезков В.Д. Химические средства защиты растений. – М.: КолосС, 2006.–248 с.
19. Анализ рынка химических средств защиты растений в России на 2019-2023 гг / BusinesStat /Дата выпуска: 22 августа 2019 Количество страниц: 135 .ID: 37294
20. Валько, В. П., Щур А. В. Особенности биотехнологического земледелия. – 2011.
21. Романов, В., Романова Р. Выбросы вредных веществ и их опасности для живых организмов. – Litres, 2019.
22. Иванцова, Е. А. Влияние пестицидов на микрофлору почвы и полезную биоту : Вестник Волгоградского государственного университета. Сер. 11, Естественные науки. – 2013. – № 1. – С. 35–40.

-
23. Терещенко, Н. Н. и др. Практикум по микробиологии для оценки плодородия почвы и качества грунтов: учебно-методическое пособие:[для студентов биологических специальностей]. – 2011.
24. Кулико, Я. Почвенные ресурсы. – Litres, 2017.
25. Bailey, G. W., White J. L. Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil //Single Pesticide Volume: The Triazine Herbicides. – Springer, New York, NY, 1970. – С. 29-92.
26. Батян, А., Фрумин Г., Базылев В. Основы общей и экологической токсикологии. – Litres, 2017
27. Жарикова, Е. А. Экология почв в вопросах и ответах: учебное пособие для вузов. – 2005.
28. Shein, E. V. et al. Quantitative estimate of the heterogeneity of solute fluxes using the dispersivity length for mathematical models of pesticide migration in soils //Eurasian Soil Science. – 2018. – Т. 51. – №. 7. – С. 797-802.
29. Горкунов, В.А., Ефремов А.Л. Основы земледелия - МГУ им. А.А. Кулешова 2008 г.
30. Горбатова, О. Н. Триазиновые пестициды: структура, действие на живые организмы, процессы деградации / О. Н. Горбатова, А. В. Жердев, О. В. Королева // Успехи биологической химии. – 2006. – Т.46, № 2. – С. 323–348.
31. Муравин, Э. А. Агрохимия. – КолосС, 2004.
32. Соляников, А. В. Микроорганизмы в почве // Молодой ученый. — 2018. — №50. — С. 75-77. — URL <https://moluch.ru/archive/236/54777/> (дата обращения: 21.03.2020)
33. Sherma, J., Rabel F. Review of thin layer chromatography in pesticide analysis: 2016-2018 //Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. – 2018. – Т. 41. – №. 19-20. – С. 1052-1065.
34. Николайкин, Н.И. Экология. 3-е изд., стереотип. / Н.И. Николайкин, Н.Е. Николайкина, О.П. Мелехова. - М.: Дрофа, 2004 г.
35. Сметник, А. А. Миграция пестицидов в почвах / А. А. Сметник, Ю. Я. Спиридонов, Е. В. Шеин. – Москва :РАСХН – ВНИИФ Москва, 2005. – 327 с.

-
36. Mehdizadeh, M. et al. Impacts of different organic amendments on soil degradation and phytotoxicity of metribuzin //International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture. – 2019. – Т. 8. – №. 1. – С. 113-121.
37. Горелов, А.А. Экология. Учебник / А.А. Горелов. – М.: Academia, 2006. – 400 с.
38. 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.
39. Леонова, А. А. Миграция метрибузина в почвах: лизиметрические исследования и моделирование : дис. ... канд. биологических наук: 06.01.03 / Леонова Анна Александровна. – Москва, 2001. – 140 с.
40. Прудникова, С. В., Цыремпилов В.Ц. Долговременные системы доставки удобрений на основе полигидроксиалканоатов. Журнал Сибирского федерального университета. Серия Биология. – 2012. – 5 (3). – С. 322-328
41. Бояндин, А. Н. и др. Биodeградация полигидроксиалканоатов почвенными микробиоценозами различной структуры и выявление микроорганизмов-деструкторов //Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48. – №. 1. – С. 35-35.
42. Suzan, A. Casarin, Cassia Priscila Rodrigues, Osvaldo Francisco de Souza Junior, Francisco Rosario, Jose Augusto Marcondes Agnelli. Biodegradation in soil of the phb/wood flour (80/20) and PHB/sisal fiber (80/20) tubes //Materials Research. – 2017. – Т. 20. – С. 47-50.
43. Altaee, N. et al. Biodegradation of different formulations of polyhydroxybutyrate films in soil //SpringerPlus. – 2016. – Т. 5. – №. 1. – С. 1-12.
44. Прудникова, С.В. Экологическая роль полигидроксиалканоатов – аналога синтетических пластмасс: закономерности биоразрушения в природной среде и взаимодействия с микроорганизмами/ С. В. Прудникова, Т. Г. Волова. – Красноярск : Красноярский писатель, 2012. - 184 с.
45. Volova, T.G. Svetlana V. Prudnikova, Natalia O. Zhila. Fungicidal activity of slow-release P (ЗНВ)/ТЕВ formulations in wheat plant communities infected by

Fusarium moniliforme //Environmental Science and Pollution Research. – 2018. – T. 25. – №. 1. – C. 552-561.

46. Tatiana Volova, Natalia Zhila, Evgeniy Kiselev, Svetlana Prudnikova, Olga Vinogradova, Elena Nikolaeva, Anna Shumilova, Anna Shershneva, Ekaterina Shishatskaya.. Poly(3-hydroxybutyrate)/metribuzin formulations: characterization, controlled release properties, herbicidal activity, and effect on soil microorganisms //Environmental Science and Pollution Research. – 2016. – T. 23. – №. 23. – C. 23936-23950.

47. Volova, T.G. Natalia Zhila, Olga Vinogradova, Anna Shumilova, Svetlana Prudnikova, Ekaterina Shishatskaya. Characterization of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate films and pellets loaded with the fungicide tebuconazole //Environmental Science and Pollution Research. – 2016. – T. 23. – №. 6. – C. 5243-5254.

48. Nettles. R. et al. Influence of pesticide seed treatments on rhizosphere fungal and bacterial communities and leaf fungal endophyte communities in maize and soybean //Applied soil ecology. – 2016. – T. 102. – C. 61-69.

49. Lindong, Cao, Yajing Liu, Chunli Xu, Zhaolu Zhou, Pengyue Zhao, ShujunNiu, Qiliang Huang. Biodegradable poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) microcapsules for controlled release of trifluralin with improved photostability and herbicidal activity //Materials Science and Engineering: C. – 2019. – T. 102. – C. 134-141.

50. Chan, Z.R. Yuefeng Dong, Liangqi Zhao. Preparation and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) microspheres for controlled release of buprofezin //Environmental Science and Pollution Research. – 2019. – C. 1-9.

51. Dubey, S., Jhelum V., Patanjali P. K. Controlled release agrochemicals formulations: a review // Journal of Scientific and Industrial Research. – 2011. – C.105-112.

-
52. Roy, A., Singh, S. K., Bajpai, J., & Bajpai, A. K. Controlled pesticide release from biodegradable polymers // *Central European Journal of Chemistry*. – 2014. – Т. 12. – №. 4. – С. 453-469.
53. Helal, N. A. S. Nanotechnology in Agriculture: A Review // *Poljoprivredai Sumarstvo*. – 2013. – Т. 59. – №. 1. – С. 117-142.
54. Fenghua Wang, Xiaoying Li, Lusheng Zhu, Zhongkun Du, Cheng Zhang, Jun Wang, Jinhua Wang, Dongdong Lv. Responses of Soil Microorganisms and Enzymatic Activities to Azoxystrobin in Cambisol // *Polish Journal of Environmental Studies* – 2018 – Т. 27 - №6 – С. 2775-2783.
55. 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. Kulkarni, K. S. Soppimath // *Polymer Plastics Technology and Engineering*. – 1999. – Vol. 38. – P. 675–711.
56. 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.
57. Fenghua Wang, Xiaoying Li, Lusheng Zhu, Zhongkun Du, Cheng Zhang, Jun Wang, Jinhua Wang, Dongdong Lv. Responses of Soil Microorganisms and Enzymatic Activities to Azoxystrobin in Cambisol // *Polish Journal of Environmental Studies* – 2018 – Т. 27 - №6 – С. 2775-2783.
58. Березненко, Н. М., Лепешкина М. И. Перспективы использования пестицидных формуляций с контролируемым высвобождением действующего вещества // *SWorld: сб. науч. ст.* – Иваново: Научный мир, 2015. - 2 (39). Том 18. – С. 56-69.
59. Bonartsev, A. P. Biosynthesis, biodegradation, and application of poly (3-hydroxybutyrate) and its copolymers-natural polyesters produced by diazotrophic bacteria / A. P. Bonartsev, V. L. Myshkina, D. A. Nikolaeva, E. K. Furina¹, T. A. Makhina, V. A. Livshits, A. P. Boskhomdzhev, E. A. Ivanov, A. L. Iordanskii, G. A. Bonartseva. // *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. – 2007 $\frac{60}{60}$ Т. 1 – С. 295-307.

-
60. Ghormade, V. Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants / M. V. Deshpande, K. M. Paknikar // *Biotechnology Advances*. – 2011 – Т. 29 – №. 6 – С. 792– 803.
61. Волова, Т. Г. Биоразрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение : монография / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая. – Красноярск: Красноярский писатель, 2011 – 400 с.
62. 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.
63. Прудникова, С.В. К.И. Коробихина , А.Н. Бояндина, Т.Г. Волова. Закономерности биоразрушения полигидроксиалканоатов на территории Вьетнама и Центральной Сибири // *Journal of Siberian Federal University. Biology* 3 (2012 5) 311-321\
64. Куликова, Н. А. Гербициды и экологические аспекты их применения : учебное пособие. / Н. А. Куликова, Г. Ф. Лебедев. – Москва : Либриком, 2010. – 153 с.
65. Новожилов, К.В. Долженко В.И. Средства защиты растений. – М., 2011. – 244 с.
66. Определение остаточных количеств феноксапроп-п и феноксапроп-п-этила в воде и феноксапроп-п в почве, зерне и соломе зерновых колосовых культур, зеленой массе, семенах и масле подсолнечника, льна, сои и рапса, ботве и корнеплодах сахарной и столовой свеклы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. МУК 4.1.1461-03.
67. 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. - 208 с.

68. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации, 2013 год. Министерство сельского хозяйства Российской Федерации (Минсельхоз России).

69. Определение остаточных количеств Азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R-230310) в воде, почве, в плодах огурцов, томатов, ягодах винограда, в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Методические указания. МУК 4.1.1213-03

70. Зинченко, В.А. Химическая защита растений: средства, технология и экологическая безопасность. – М.: «КолосС», 2012. – 127 с.

71. Белов, Д.А. Химические методы и средства защиты растений в лесном хозяйстве и озеленении: Учебное пособие для студентов. – М.: МГУЛ, 2003. – 128 с.

72. Гольшин, Н. М. Фунгициды. - М.: Колос, 1993. -319 с.: ил.

73. Определение остаточных количеств эпоксиконазола в ботве и корнеплодах сахарной свеклы методом газожидкостной хроматографии. МУК 4.1.1973-05.

74. Volova, T. et al. Constructing slow-release fungicide formulations based on poly (3-hydroxybutyrate) and natural materials as a degradable matrix //Journal of agricultural and food chemistry. – 2019. – Т. 67. – №. 33. – С. 9220-9231.

75. Thomas, S. et al. Thermal, mechanical and biodegradation studies of biofiller based poly-3-hydroxybutyrate biocomposites //International journal of biological macromolecules. – 2019.

76. Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии: учеб. Пособие/ А.И. Нетрусов, М.А.Егорова, Л.М.Захарчук.- М: Академия,2005.-608 с.

77. Методические рекомендации МР 4.2.0089-14. Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I-II групп патогенности. Федеральная

служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Авт. Ю. В. Демина, Н. В. Шеенков 2015.—19 с.

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

М. Волова Т.Г. Волова

подпись инициалы, фамилия


« 06 » июля 2020 г.

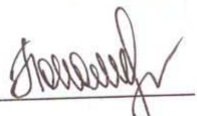
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

06.04.01 – Биология

06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Влияние пролонгированных форм сельскохозяйственных препаратов на
основе ПГА на почвенный микробиоценоз

Руководитель  проф., д-р биол. наук С.В. Прудникова

Выпускник  А.Л. Пономарева

Рецензент  А.В. Муруева

Красноярск 2020