

На правах рукописи

ЖАРИКОВ МИХАИЛ ГЕННАДЬЕВИЧ

**ЭКОЛОГО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МНОГОЛЕТНЕГО
ПРИМЕНЕНИЯ ГЛИФОСАТА НА ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ ПОЧВЕ
И БИОРЕМЕДИАЦИЯ ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТЕРРИТОРИЙ**

Специальность: 03.02.08 – экология (биология)

АВТОРЕФЕРАТ

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

Москва – 2012

Работа выполнена в отделе гербологии Государственного научного учреждения Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии (ГНУ ВНИИФ) Россельхозакадемии (РАСХН)

Научный руководитель: Заслуженный деятель науки РФ,
доктор биологических наук, профессор
академик РАСХН,
Спиридонов Юрий Яковлевич

Официальные оппоненты: профессор кафедры защиты растений
РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева,
доктор биологических наук,
Смирнов Алексей Николаевич

Заведующий лабораторией
сельскохозяйственной токсикологии
ВНИИА им. Прянишникова,
доктор биологических наук,
Лунёв Михаил Иванович

Ведущая организация: Государственное научное учреждение
Московский научно-исследовательский
институт сельского хозяйства
«Немчиновка» Россельхозакадемии

Защита состоится «___» мая 2012 г. в 14:30 часов на заседании диссертационного совета Д 220.043.03 при Российском государственном аграрном университете – МСХА имени К.А. Тимирязева по адресу: 127550, г. Москва, Тимирязевская ул., д. 49. Учёный совет РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (тел./факс 976-24-92).

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева.

Приглашаем Вас принять участие в работе совета или прислать свой отзыв в двух экземплярах, заверенных гербовой печатью, по адресу указанному выше.

Автореферат разослан «___» марта 2012 г. и размещён на сайте университета www.timacad.ru

Учёный секретарь диссертационного совета:
Кандидат биологических наук

Селицкая О.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Обеспечение государства качественными, доступными по цене продуктами отечественного производства – является приоритетной задачей любой страны. Однако, увеличение урожайности сельскохозяйственных растений зачастую приводит к снижению качества получаемой товарной продукции. Это связано прежде всего с тем, что необходимо применять средства химизации: удобрения и пестициды. Без них добиться каких-либо существенных увеличений продуктивности растений невозможно. Одновременно возрастает риск загрязнения сельскохозяйственной продукции остатками пестицидов. Ежегодно под влиянием сорной растительности и насекомых-вредителей мы теряем до 35-40 % урожая. При этом на долю сорной растительности во многих регионах России приходится не менее 20-30% урожая (Спиридонов Ю.Я., Ларина Г.Е., Шестаков В.Г., 2009).

В последние годы во многих странах мира наметилась тенденция к выращиванию генетически-модифицированных сельскохозяйственных растений, большинство из которых обладает геном устойчивости к гербициду – глифосату (ГФ).

На сегодняшний день глифосат является одним из самых популярных гербицидов в мире. До трети всех препаратов, применяемых для борьбы с сорной растительностью, содержат его в качестве основного действующего вещества. В севооборотах с генетически модифицированными растениями (соя, кукуруза и др.) он становится единственным применяемым гербицидом, в результате чего увеличивается токсическая нагрузка остатков этого поллютанта на почву.

В Арканзасе, Айове и Кентукки к 2000 г. 50-60% площадей, отведенных под сою, занято глифосат-устойчивыми сортами. В штате Теннесси соя «Раундап Реди» занимает 70% посевов этой культуры. В Северной Каролине под глифосат-устойчивой соей занято 90%. В США посевы модифицированной сои могут превысить в ближайшее время 14 млн. га. Таким образом, удалось добиться существенного снижения сорной растительности на полях, но последствия долговременного применения ГФ практически не изучались (Бир Э., 1999).

Перенасыщение почвы глифосатом и продуктами его разложения может привести к тому, что ГФ начнёт мигрировать в почве вместе с грунтовыми водами, угнетающе воздействовать на сапротрофную почвенную микрофлору, снижать биологическую активность почвы и накапливаться в выращиваемых растениях.

Для получения экологически безопасной сельскохозяйственной продукции необходимо, чтобы почва характеризовалась набором определённых показателей, определяющих «здоровье почвы». В значительной степени «здоровье почвы» зависит от состояния почвенного микробного сообщества, которое выполняет основную работу по поддержанию биосферных процессов

(Виноградский С.Н., 1952; Заварзин Г.А., 2003). Оно является основным компонентом почвенной биоты и выполняет многообразные функции в круговороте веществ, включая самоочищение от ксенобиотиков и природных поллютантов. Микробное сообщество – важнейший объект агроэкологического мониторинга и объективный экологический индикатор состояния почвенного биоценоза, в том числе его отклика на загрязнение различными поллютантами (Добровольская Т.Г., 2002; Терехова В.А., 2007).

Для снижения негативных последствий воздействия ГФ на почву и получения экологически безопасной сельхозпродукции необходимо проводить регулярные ремедиации почв. Для этих целей наиболее приемлемы биотехнологии с использованием микроорганизмов-деструкторов.

Микробная биоремедиация экологически безопасна, высокоэффективна и экономически малозатратна.

Цель исследований: проведение эколого-токсикологической оценки влияния глифосата на почву и почвенные микроорганизмы. Оценить экологическую безопасность использования технологии ремедиации почвы, загрязненной глифосатом, с помощью микроорганизмов-деструкторов.

Задачи исследований:

1. Исследовать влияние глифосата на биологические свойства дерново-подзолистой почвы при его однократном применении.
2. Изучить экологические последствия многолетнего применения глифосата на дерново-подзолистых почвах.
3. Оценить эффективность применения технологии биоремедиации почвы, загрязнённой глифосатом, при помощи микроорганизмов-деструкторов.
4. Провести эколого-токсикологическую оценку безопасности технологии биоремедиации загрязненной почвы.

Научная новизна. Проведена эколого-токсикологическая оценка влияния глифосата и глюфосината на почвенную микрофлору при их многолетнем применении на дерново-подзолистой почве. Показано, что эти гербициды оказывают ингибирующий эффект на почвенные микроорганизмы, изменяют состав микробиоценоза и снижают ферментативную активность почвы. Глифосат может длительно сохраняться в почве, приводя к повышению её интегральной токсичности и фитотоксичности.

По результатам полевых микроделяночных испытаний биотехнологии «*in situ*» оценено влияние биоремедиации на биологические свойства почвы. Показано что применение микроорганизмов-деструкторов ускоряет восстановление почвы до исходного состояния и не приводит к негативному воздействию на окружающую среду.

Практическая значимость. Показано, что многолетнее (до 10 лет), систематическое применение глифосата или глюфосината на полях приводит к снижению биологической активности почвы, увеличению её интегральной токсичности.

Проведена эколого-токсикологическая оценка технологии микробиологической очистки почв, загрязнённых глифосатом. Показано, что в

процессе биоремедиации в почве снижается концентрация гербицида, интегральная токсичность и фитотоксичность загрязнённой почвы. Данная биотехнология восстанавливает плодородие почв, загрязненных глифосат-содержащими соединениями.

Из почвы, в течение 10 лет обрабатываемой глифосатом, выделены 2 штамма *Corinobacterium* sp. Z-1 и *Micrococcus* sp. Z-2 микроорганизмов-деструкторов глифосата. Штаммы депонированы в рабочей коллекции ФГУН НИЦ ТБП. В настоящее время подготовлены заявки на их патентование.

Апробация работы и публикации. Результаты исследований представлены на Международном Форуме по пестицидам «Obsolete Pesticides in Central and Eastern European, Caucasus and Central Asia Region: Start of clean up» (Кишинев, Молдавия, 2007 г.); на 5-ом Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2009 г.); на выставке ВэйстТэк-2009 «Экологическая политика Российской Федерации: экономический рост и сохранение природного наследия» (Москва, 2009 г.).

По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, в том числе 2 статьи в журнале «Агрохимия», рекомендованном ВАК.

Личный вклад. Диссертационная работа подготовлена на основании обобщения результатов лабораторных и полевых исследований, выполненных на базе НИИ Фитопатологии и НИЦ ТБП при личном участии автора. Проведение микробиологических исследований и биотестирование почвенных образцов, статистическая обработка и анализ полученных результатов выполнены автором лично.

Автор выражает искреннюю благодарность за помощь и постоянную поддержку в работе над диссертацией своему научному руководителю академику РАСХН, профессору Спиридонову Ю.Я., а также сотрудникам отдела экологической биотехнологии НИЦ ТБП и сотрудникам отдела гербологии ВНИИ Фитопатологии.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, объектов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Текст изложен на 119 страницах машинописного текста; содержит 17 таблиц и 16 рисунков. Список литературы содержит 122 источника, в том числе 92 – на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Введение.

Обоснована актуальность темы, сформулированы основная цель и задачи исследования.

2. Обзор литературы.

В этом разделе рассмотрены: применение фосфорорганических соединений в сельском хозяйстве, поведение исследуемого гербицида - глифосата в почве, роль микроорганизмов в почве, воздействие глифосата на

элементы агроценоза, действие глифосата на человека, технологии биоремедиации почв, загрязненных фосфорорганическими соединениями, особенности выделения микроорганизмов, разлагающих фосфонаты по С-Р-лиазному пути, критерии эколого-токсикологической оценки процессов биоремедиации почв.

3. Объекты и методы исследования.

Объектами исследования служили глифосат- и глюфосинатсодержащие гербициды: Раундап, Граунд Био и Либерти.

В экспериментах по оценке однократного и многолетнего воздействия гербицидов на агроценоз парового поля, заложенного на опытном участке отдела гербологии ВНИИ Фитопатологии (Московская обл., Одинцовский р-н), использовали препараты: Раундап (Roundup) (360 г/л глифосата), выпускаемый фирмой «Monsanto Co», и Либерти (глюфосинат) (в виде 20% ВР), производимый фирмой «Байер КрокСайенс».

В полевых экспериментах по изучению влияния глифосата и глюфосината при их однолетнем и многолетнем применении, использовали почву дерново-подзолистого типа (табл. 1).

Внесение исследуемых гербицидов (1-3-кратное применение за сезон) в дозе 3 л/га проводили опрыскивателем «Технома» (ширина захвата 10,8 м с расходом рабочей жидкости 200 л/га). Время обработки определялось очередной волной сорняков. Всего за 10 лет было внесено на каждый участок по 55 л/га того или другого препарата.

Таблица 1

Агрохимические свойства почв на опытных участках

Почва	C _{орг.} , %	pH _{сол}	Ёмкость поглощения катионов
Дерново-подзолистая средне-окультуренная почва с опытного участка ВНИИ Фитопатологии	2,8	5,2	10-15 мг-экв/100 г почвы
Дерново-подзолистая почва с полевого участка в районе поселка «Калиновские выселки»	2,3-2,5	4 - 4,5	7-10 мг-экв/100 г почвы

В лабораторных и полевых экспериментах, проводимых на базе НИЦ ТБП, использовали препарат Граунд Био (360 г/л глифосата), выпускаемый фирмой «Monsanto Co». Внесение глифосата на полевом участке производилось ручным опрыскивателем «РОСА-202».

Лабораторные эксперименты проводили с дерново-подзолистой, среднесуглинистой почвой, характерной для Московской области (см. табл. 1).

Полевые испытания технологии биоремедиации проводили на специально выделенном участке в районе поселка «Калиновские выселки», Серпуховского района, Московской области.

Анализ почвенных образцов на содержание глифосата проводили в лаборатории микробной энзимологии ИБФМ РАН методом жидкостной хроматографии. Химический анализ проводили на приборе «LKB 2150» (Швеция) с УФ детектором (204 нм), с колонкой Repro-Gel H, 9 мкм (250 x 8 мм), «Dr. Maisch», (Германия) при 65 °С.

Биотестирование водных экстрактов из почвы проводили на дафниях *Daphnia magna* по ФР.1.39.2001.00283 «Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний», откалиброванной по глифосату. Методика соответствует Международному стандарту на методы биотестирования ИСО 7346–1.

Фитотоксичность почвы определяли на проростках овса по методу Берестецкого. Показателями воздействия являются: всхожесть семян, длина корней и проростков и масса всех проростков в чашке, которые выражались в процентах по отношению к контролю.

Дегидрогеназную активность загрязненной глифосатом почвы в процессе микробной ремедиации измеряли в почвенных микрокосмах в соответствии с общепринятой методикой. Активность дегидрогеназы выражали в мг ТФФ на 10 г почвы.

Изучение микробного сообщества почвы проводили методом высевов на микробиологические питательные среды (ФГРМ, MS1) с последующим подсчётом выросших колоний.

Изучение общетоксического действия водного экстракта почвы, загрязненной глифосатом, проводили в НИЦ ТБП на самцах белых аутбредных крыс. Содержание животных соответствовало санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Образцы загрязненной глифосатом почвы настаивали водопроводной водой в соотношении 1:1 и фильтровали через ватно-марлевый фильтр. Лабораторным животным в качестве постоянного и единственного питья в течение всего эксперимента (62 суток) выпаивали экстракты из почвы. Ежедневно отмечали количество выпитой жидкости, оценивали клиническое состояние животных.

В течение эксперимента определяли: гематологический анализ крови, биохимический анализ крови и гистологию органов. Гематологический анализ крови животных проводили с помощью полуавтоматического двухканального кондуктометрического счетчика клеток Nema-screen 13 (Hospitex Diagnostics, Италия). Определяли следующие параметры крови: количество эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, концентрацию гемоглобина, гематокрит, средний объем эритроцита. Биохимический анализ крови животных проводили с помощью полуавтоматического биохимического анализатора Screen-Master 3000 (Hospitex Diagnostics, Италия). Определяли следующие параметры: общий белок, глюкозу, мочевины, холестерин, креатинин, АлАТ, АсАТ, щелочную фосфатазу и билирубин. На 63-й день эксперимента отбирали образцы: легкого, печени, селезенки, почки, тонкой кишки с лимфоидным фолликулом и

семенников. Гистологические препараты исследовали методом световой микроскопии.

Выделение микроорганизмов-деструкторов глифосата проводили методом накопительных культур из образцов почв, загрязненных глифосатом, с опытного участка отдела гербологии ВНИИ Фитопатологии. Выделение микроорганизмов-деструкторов глифосата проводили на минимальных солевых питательных средах, где в качестве единственного источника углерода присутствовал в различных концентрациях этот токсикант. Культивирование проводили на качалке "Certomat" с перемешиванием при 190 ± 10 об./мин, при температуре 28 ± 1 °С в течение 7 дней, после чего проводился отбор наиболее активных штаммов-деструкторов ГФ.

Отбор микроорганизмов проводили в два этапа. На первом этапе для оценки деструктивного потенциала культуры выращивали в условиях периодического культивирования в жидкой минеральной среде MS1 с ГФ и глутаматом Na.

На втором этапе активность отобранных штаммов оценивали на почвах с внесением глифосата в разных концентрациях.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Изучение концентрации сапротрофной микробиоты на полевом участке, однократно и многократно в течение десяти лет загрязняемом гербицидами.

Эксперименты проводили на территории ОПИ ВНИИ Фитопатологии, где был заложен многолетний полевой опыт. В течение десяти лет (с 1999 по 2009 гг.) на исследуемых участках систематически применяли гербициды на основе глифосата (Раундап, 36 % ВР производства «Monsanto Co»), а также глюфосината (Либерти, 20 % ВР, производимый фирмой «Байер КропСайенс»), в дозах 3 л/га по препаратам. Время обработки определяли очередной волной сорняков. В течение трёх лет производили отбор проб для изучения микробного сообщества почвы. Пробы почвы отбирали в течение летнего вегетационного периода. Изучение микробного сообщества почвы проводили методом высевов на микробиологические питательные среды (ФГРМ) с последующим подсчётом выросших колоний.

Результаты микробиологических исследований показали, что оба препарата (Раундап и Либерти) оказывали влияние на микробную обсеменённость почвы (рис. 1, 2 и 3). При этом общая картина в течение трёх лет существенно отличалась, так как почвенные микроорганизмы подвержены влиянию природных климатических условий. На них влияют такие важные показатели, как влажность, среднесуточные температурные колебания, общий уровень солнечной инсоляции и многие другие.

Погодные условия 2007 года были засушливыми, что само по себе негативно повлияло на почвенную микробиоту. Сильнее всего на общее микробное число влиял уровень увлажнения. Причём подобная тенденция

наблюдалась также в течение последующих трёх лет исследований. В 2008 году погода была переменчивой, но в основном характеризовалась избыточной влажностью и высокой температурой воздуха. Такие природные условия были оптимальными для почвенных микроорганизмов. Особенно благоприятные условия были во второй половине лета, когда установилась теплая погода, а дожди шли практически каждую неделю. В 2009 году погодные условия были более засушливыми, чем в 2008 году. Исключением был июль, когда собственно и проводилась обработка гербицидами. Дожди шли практически каждый день, чем сильно осложнили проведение эксперимента.

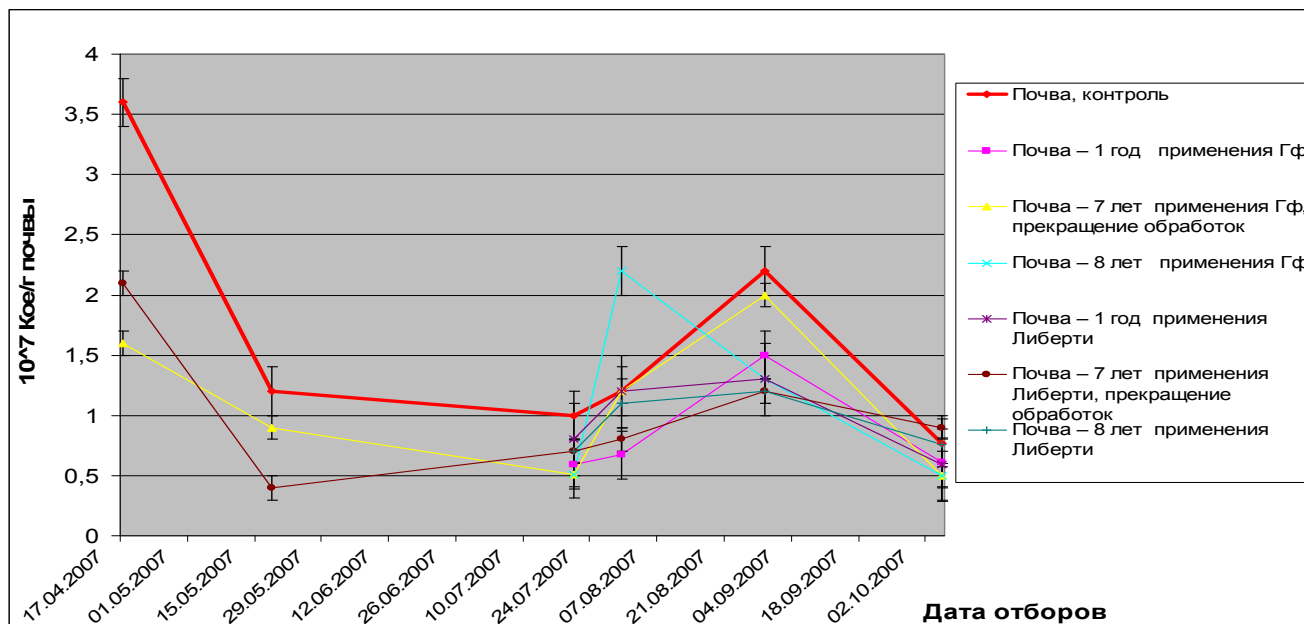


Рис.1. Общая микробная обсеменённость почвы на многолетнем полевом участке в 2007 г.

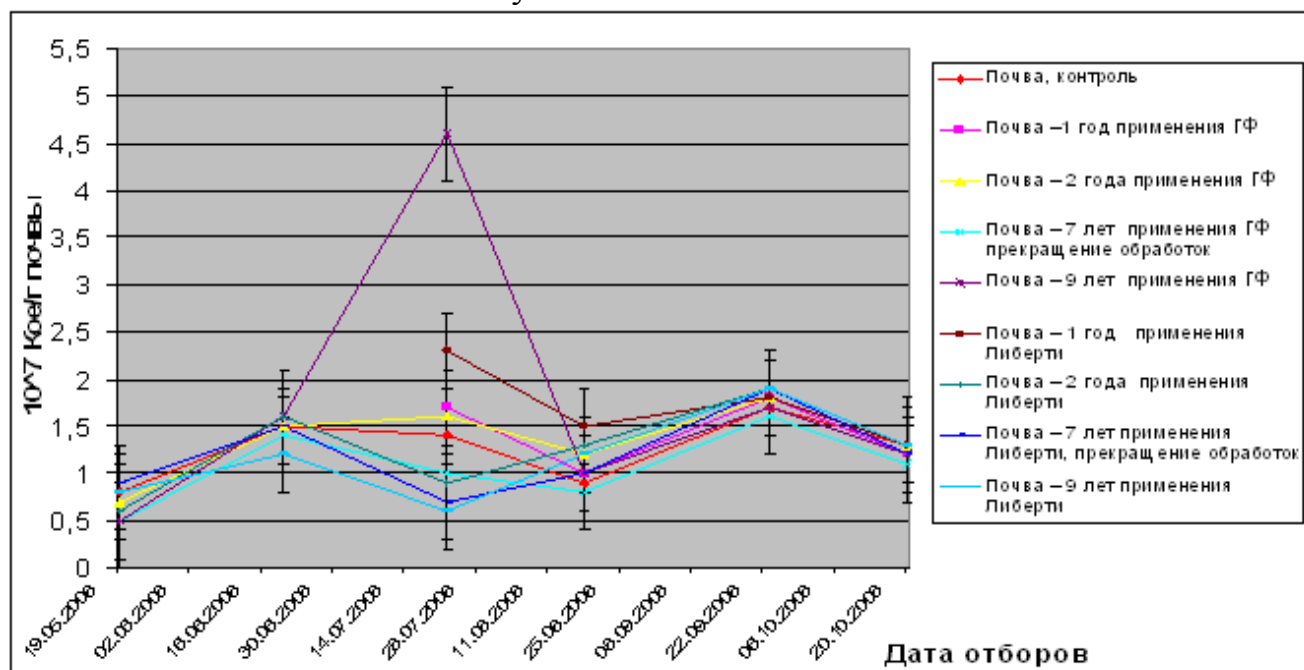


Рис.2. Общая микробная обсеменённость почвы на многолетнем полевом участке в 2008 г.

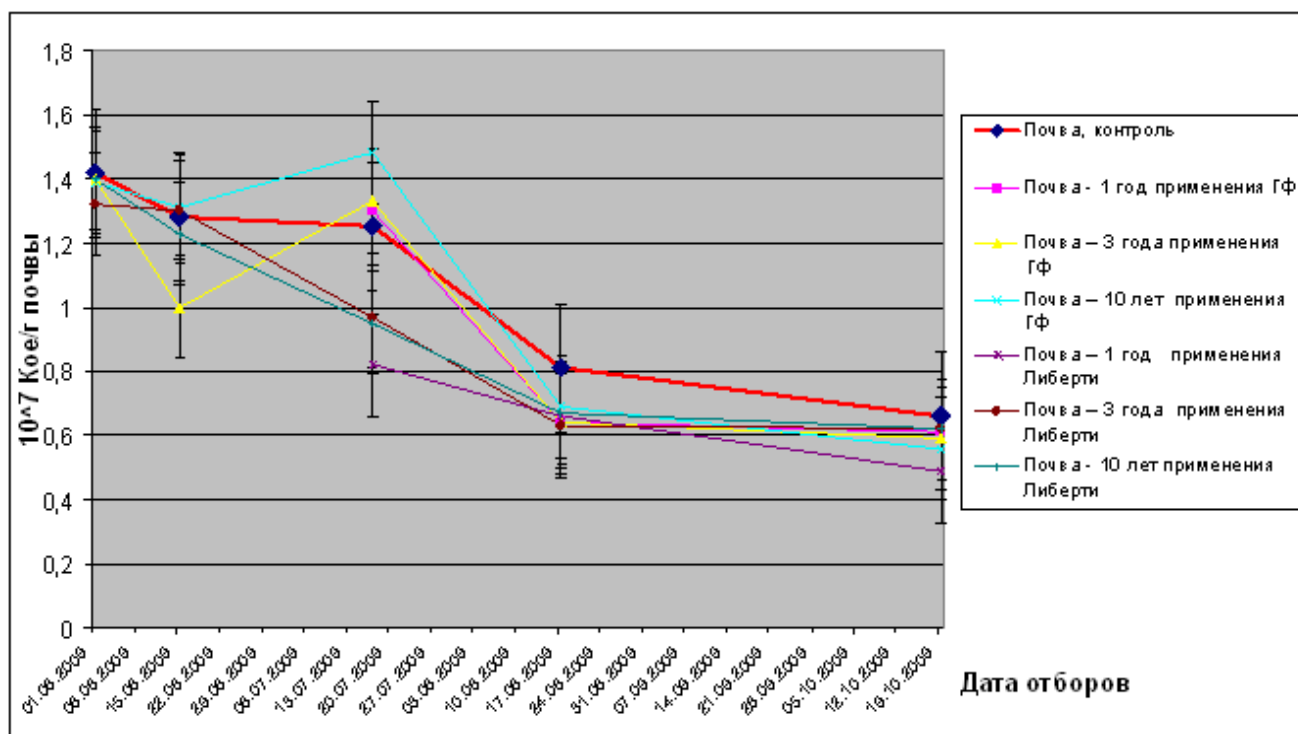


Рис.3. Общая микробная обсеменённость почвы на многолетнем полевом участке в 2009 г.

Как видно из графиков (рис. 1, 2 и 3) в течение 2007-2009 года общая микробная обсеменённость достоверно превысила уровень контроля только в одном варианте. Сразу после обработки глифосатом происходил резкий скачок численности микроорганизмов в варианте, где глифосат систематически, длительно применялся от 8 до 10 лет. Это позволило нам сделать предположение, что в данной почве за 8 лет применения глифосатсодержащих гербицидов, произошла первичная селекция микроорганизмов и появились штаммы деструкторов глифосата. При высеве почвенной микробиоты на чашки Петри основную массу выросших микроорганизмов составляли колонии кокков. Как уже отмечалось в различных литературных источниках (Zboinska et al., 1992, Pirke et al., 1987), именно эту группу микроорганизмов-деструкторов глифосата чаще всего выделяют из природных образцов (почвы, воды, бытовых и промышленных стоков), содержащих этот токсикант.

Однократная обработка почвы глифосатом показала слабый стимулирующий эффект на почвенные микроорганизмы. Это хорошо согласуется с литературными данными. Однократная обработка почвы глюфосинатом (Либерти) выявила токсический эффект на сапротрофную микробиоту. На графиках (рис 1, 2 и 3) видно, что после обработки почвы глюфосинатом, уровень общей микробной обсеменённости обычно снижался. Также произошло изменение состава микроорганизмов. Основную массу высеваемых на питательную среду микроорганизмов составляли колонии плесневых грибов рода *Aspergillus* и *Penicillium*, а также актиномицетов из рода *Actinomyces*.

Многokратная обработка почвы Либерти (в течение 8-10 лет) приводит к увеличению численности *Aspergillus* и *Penicillium*, а также актиномицетов из рода *Actinomyces*. Вероятно, они более устойчивы к глюфосинату. По результатам исследований можно также отметить, что при обработке почвы глюфосинатом доля несовершенных грибов и актиномицетов из рода *Actinomyces*, высеваемых на чашках Петри, в течение трёх лет возросла приблизительно на 15-20% по сравнению с контролем. Отсюда можно сделать вывод, что глюфосинат стимулирует их размножение.

При многолетнем систематическом применении глифосата и глюфосината отмечено достоверное изменение структуры микробного сообщества за счёт значительного увеличения численности родококков, микрококков и некоторых анаэробных видов бактерий, сопровождающееся резким снижением численности артробактера *Arthrobacter globiformis*. Этот вид относится к широко распространенным почвенным бактериям. Он участвует в ряде этапов круговорота углерода и азота в почве, поэтому снижение его численности следует считать следствием воздействия изучаемых гербицидов на микробный ценоз почвы (Спиридонов Ю.Я., и др., 2006).

Прекращение обработок почвы, в течение 7 лет загрязняемых глифосатом и глюфосинатом, приводит в последующие 2 года к восстановлению сапротрофной микробиоты до уровня незагрязненной почвы.

Было установлено, что глюфосинат слабее воздействовал на микробное сообщество загрязнённой почвы. Таких резких изменений численности микроорганизмов, как в случае с глифосатом, в течение ряда лет не наблюдалось.

Полученные результаты послужили основой для исследований по выделению штаммов деструкторов глифосата из длительно загрязнённых почв.

4.2. Выделение микроорганизмов-деструкторов глифосата из загрязнённой почвы.

Выделение микроорганизмов-деструкторов проводили из образцов почв, отобранных на полях ОПИ ВНИИФ, в течение 10 лет обрабатываемых глифосатом.

Почвенные экстракты высевали на минимальной солевой среде MS1, где в качестве единственного источника фосфора и углерода использовали глифосат. Выросшие колонии разделяли для получения чистых культур, которые затем пересевали в чашки с агаризованной средой ФГРМ с глифосатом.

Активность отобранных штаммов оценивали на питательных средах с внесением глифосата в различных концентрациях. Были выделены два штамма-деструктора глифосата, которые были помещены в рабочую коллекцию НИЦ ТБП. Проводили родовое определение данных микроорганизмов. Изучение морфологии клеток этих микроорганизмов под световым микроскопом позволило сделать вывод, что один из этих микроорганизмов относится к коринебактериям (*Corynebacterium* sp.). Данный микроорганизм является

Грам+. Ему было присвоено обозначение Z-1. Второй штамм-деструктор глифосата также является Грам+ и относится к роду *Micrococcus*. Более точной идентификации провести не удалось. Деструктивная активность у бактерии рода *Corynebacterium* sp. была выявлена нами впервые.

4.3. Изучение интегральной токсичности почвы, загрязнённой глифосатом, для животных биотестов (дафний, рыб гуппи и дождевых червей).

По чувствительности и степени изученности среди других тест-объектов выделяют дафний (*Daphnia magna*) и аквариумных рыб гуппи (*Poecilia reticulata*). Для биотестирования почвенных образцов также применяют дождевых червей (*Eisenia fetida*). Опыт токсикологического нормирования показывает, что при использовании этих видов биотестированием может быть охвачено более 80% подлежащих контролю загрязняющих почву химикатов.

Изучена интегральная токсичность почвы, загрязнённой глифосатом, для дафний *Daphnia magna*. Минимально действующая концентрация глифосата в почве составила 0,125 мг/л. Максимально недействующая 0,0625 мг/л по отношению к рачкам *Daphnia magna*. Изучено влияние на выживаемость дафний воды, загрязненной "Граунд Био" в концентрациях от 1 мг/л до 10 мг/л глифосата. Контролем служила чистая вода. Концентрация глифосата 4 мг/л вызывала гибель 50% дафний, т.е. по существующим методикам оценки глифосат относится к слаботоксичным веществам.

Изучена интегральная токсичность воды, загрязнённой глифосатом, для рыб гуппи. Концентрация глифосата 16 мг/л вызывает гибель 50% тест-объектов за 96-часовую экспозицию, что соответствует LD₅₀.

Изучена интегральная токсичность почвы, загрязнённой глифосатом, для дождевых червей. ГФ в концентрации 10 мг и более на 500 грамм почвы оказывает острое токсическое воздействие на особей дождевых червей, а концентрация ГФ – 12 мг вызывает 100 % гибель дождевых червей.

Результаты исследований показали, что наиболее чувствительным тест-объектом для почвы и воды, загрязнённых глифосатом, являются дафнии.

4.4. Изучение влияния рекомендуемых доз глифосата на почву. Оценка необходимости биоремедиации при применении рекомендуемых доз глифосата

На базе НИЦ ТБП проведена оценка биологических свойств почвы, загрязнённой глифосатом, до и после микробиологической ремедиации.

Исследования проводили в лабораторных условиях в пластиковых ванночках вместимостью 3,0 литра. В эксперименте использовали дерново-подзолистую почву. Рабочие концентрации загрязнителя в почве создавали путем внесения Граунд Био в виде водного раствора из расчета: 3,67 мг ГФ/кг, 11 мг ГФ/кг и 110 мг ГФ/кг. Это соответствует условиям обработки растений и почвы на полях гербицидами в дозах 3, 10 и 100 л/га. Для биоремедиации

использовали наиболее активный штамм-деструктор глифосата *Achromobacter* sp. Kg 16.

Проведённая оценка фитотоксичности почвы, загрязненной глифосатом, до микробной ремедиации показала, что глифосат в концентрации 110 мг ГФ/кг, что соответствует дозе 100 л/га, обладает фитотоксичностью для овса. Это проявилось в достоверном уменьшении (в 1,5 раза) длины корешков овса по сравнению с контролем (чистая почва). После биоремедиации фитотоксичность почвы значительно снизилась.

Глифосат в концентрациях 3,67 мг ГФ/кг и 11 мг ГФ/кг фитотоксичностью для овса не обладал.

Контроль за численностью микроорганизмов в почве во время биоремедиации показал, что микробная обсеменённость в течение лабораторного эксперимента подвергалась значительным изменениям. Внесение микроорганизмов-деструкторов глифосата увеличило общий уровень микробной обсеменённости, который постепенно достиг уровня контрольной почвы. Через месяц биоремедиации общая микробная обсеменённость почвы уже мало отличалась от уровня контроля.

Дегидрогеназная активность почвы является индикатором активности почвенного микробного комплекса. Результаты экспериментальных исследований показали (рис. 4), что загрязнение почвы глифосатом приводит к снижению ее дегидрогеназной активности. Внесение микроорганизмов-деструкторов способствовало восстановлению биологических свойств почвы, то есть ее реабилитации.

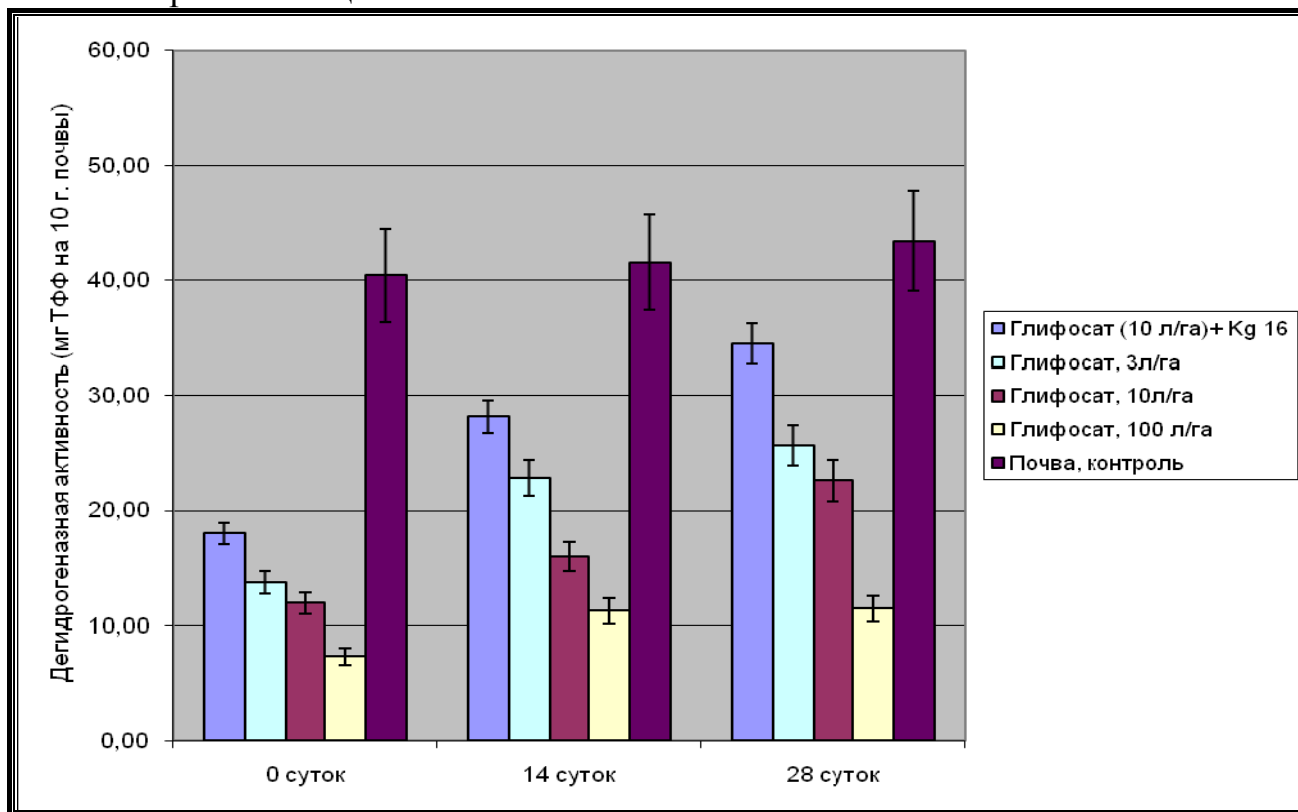


Рис. 4. Дегидрогеназная активность почвы в ходе лабораторного эксперимента

Дегидрогеназная активность почвы, загрязненной ГФ в дозе 100 л/га, была минимальной на всех этапах исследований (на 0, 14 и 28 сутки) и составила всего лишь 18%, 27% и 26% от уровня чистой почвы, соответственно. Последние два уровня дегидрогеназной активности говорят о том, что почва так и не смогла справиться с последствиями негативного воздействия такой высокой дозы гербицида.

Биотестирование на дафниях показало, что почва, загрязнённая глифосатом в концентрации 110 мг ГФ/кг, является токсичной и вызывает 100% гибель биотестов. Применение микроорганизмов-деструкторов способствовало снижению интегральной токсичности почвы в течение недели до безопасного уровня.

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что даже рекомендуемые дозы применения ГФ могут оказывать негативное влияние на биологические свойства почвы. Внесение микроорганизмов-деструкторов глифосата положительно влияет на биологические свойства почвы и в течение двух недель возвращает почву в исходное состояние.

4.5. Эколого-токсикологическая оценка результатов полевых испытаний технологии биоремедиации почв.

В 2007 г. на базе НИЦ ТБП были проведены полевые испытания технологии биоремедиации почв, загрязненных глифосатом, с помощью 2 штаммов микроорганизмов-деструкторов Kg16 и Kg18. Испытания проводили на специально выделенном участке в районе поселка «Калиновские выселки» Серпуховского района Московской области. На полигоне было подготовлено 7 участков размером 1 x 2 метра каждый. Почву на участках перекопали, удалили корни растений и прорыхлили.

В почву внесли глифосат из расчета 10 л/га (концентрация, рекомендуемая для обработки сельскохозяйственных полей) и 100 л/га (концентрация при аварийном разливе ядохимиката) и выдержали в течение 2 суток для стабилизации внутрипочвенных процессов.

Результаты химического анализа показали, что под действием микроорганизмов-деструкторов в течение месяца происходит снижение концентрации внесенного глифосата. Внесение штаммов-деструкторов статистически достоверно увеличивало разложение глифосата в почве до 73% (штамм Kg18) и 87% (штамм Kg16), таблица 2.

Таблица 2

Содержание глифосата в почве в течение полевого эксперимента

Характеристика участка	Концентрация глифосата в почве, л/га абс. сухой почвы					Степень деструкции ГФ, %
	Исходная	1 нед.	2 нед.	3 нед.	4 нед.	
Почва – контроль	0	0	0	0	0	-
Почва + ГФ 100 л/га	51,10 ± 7,67	49,57 ± 7,44	24,60 ± 3,69	25,50 ± 3,83	23,00 ± 3,45	55
Почва + ГФ 100 л/га + пит. среда	46,77 ± 7,02	39,47 ± 5,92	25,87 ± 3,88	24,80 ± 3,72	22,00 ± 3,3	53
Почва + ГФ 100 л/га + штамм Kg16	49,10 ± 7,37	20,97 ± 3,15	11,13 ± 1,67	12,90 ± 1,94	5,43 ± 0,82	89
Почва + ГФ 100 л/га + шт. Kg18	51,60 ± 7,74	31,17 ± 4,68	14,10 ± 2,12	15,57 ± 2,34	13,70 ± 2,06	73
Почва + ГФ 10 л/га + шт. Kg16	7,75 ± 1,16	-	-	-	-	100
Почва + ГФ 10 л/га	8,95 ± 1,34	2,30 ± 0,35	-	-	-	100

Изучена фитотоксичность почвы, загрязненной глифосатом, до и после микробной ремедиации. Глифосат в дозе 100 л/га обладал фитотоксичностью для овса до биоремедиации. Это проявилось в достоверном уменьшении (в 1,5 раза) длины корешков овса по сравнению с контролем (почва). Во время проведения биоремедиации выявлено достоверное снижение фитотоксичности почвы на участках с питательной средой - в 1,3 раза, со штаммом Kg18 – в 1,5 раза, со штаммом Kg16 – в 2,9 раза, по сравнению с почвой с глифосатом. Глифосат в дозе 10 л/га фитотоксичностью не обладал.

Контроль за численностью микроорганизмов в почве во время биоремедиации показал, что концентрация аборигенной почвенной микрофлоры изменилась незначительно (в соответствии с погодными условиями). Численность микроорганизмов-деструкторов Kg16 и Kg18 в ходе биоремедиации постепенно снижалась.

Дегидрогеназная активность почвы. Результаты экспериментальных исследований показали, что загрязнение почвы глифосатом приводит к снижению ее дегидрогеназной активности (рис. 5). Внесение микроорганизмов-деструкторов способствовало восстановлению биологических свойств почвы, то есть ее реабилитации.

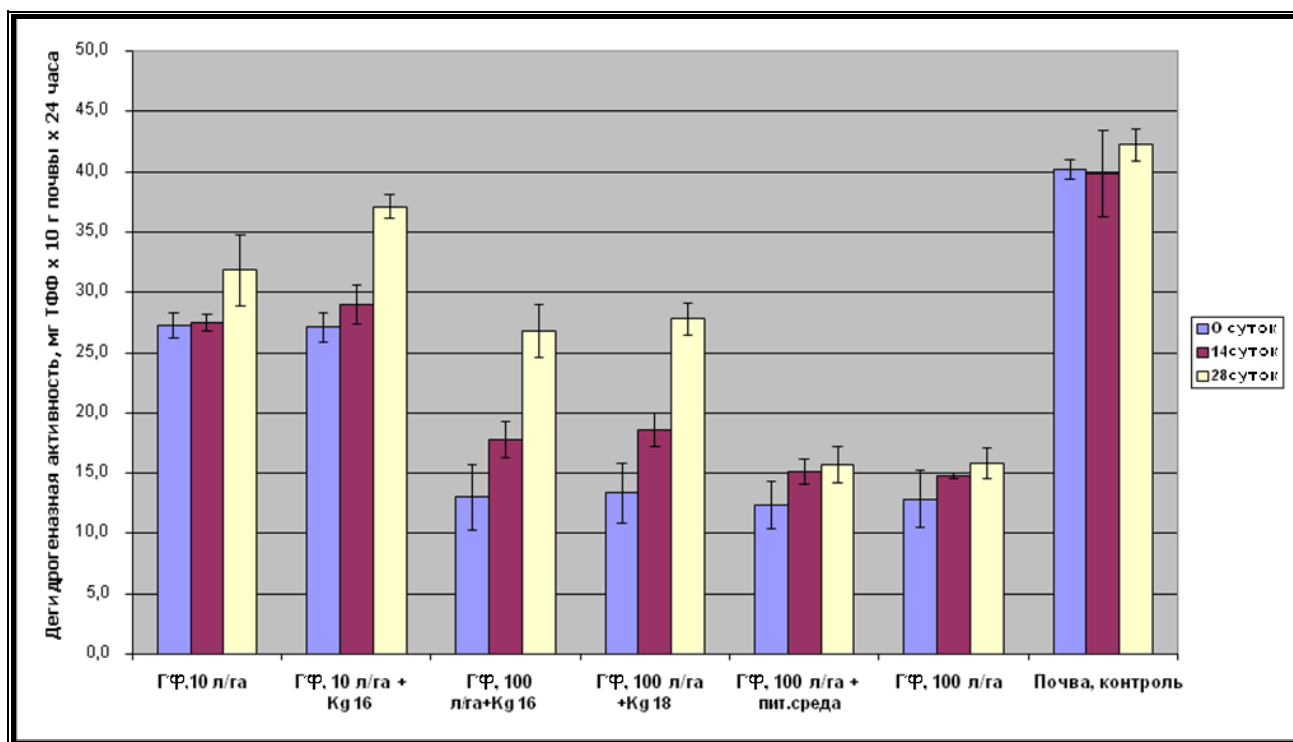


Рис. 5. Дегидрогеназная активность почвы во время биоремедиации

Интегральную токсичность почвы, загрязненной ГФ, до и после биоремедиации оценивали на дафниях *Daphnia magna*. В варианте, где микроорганизмы не вносились в загрязнённую почву (контроль положительный) гибель тест-объектов сохранялась до конца эксперимента. Внесение питательной среды для активизации почвенной микрофлоры дало незначительный эффект. Скорее всего, это связано с тем, что данный токсикант требует много времени для адаптации потребления его имеющимися в почве микроорганизмами. Проведение биоремедиации загрязнённой почвы приводило к резкому снижению интегральной токсичности.

4.6. Изучение вертикальной миграции глифосата по почвенному профилю.

Изучение вертикальной миграции глифосата по почвенному профилю проводилось во время полевых испытаний штаммов-деструкторов глифосата на опытном участке п. Дашковка в 2007 г. В почву вносили глифосат из расчёта 10 л/га (концентрация, рекомендуемая для обработки сельскохозяйственных полей) и 100 л/га (концентрация при аварийном разливе ядохимиката).

В ходе полевого эксперимента через 2 недели и в конце месяца биоремедиации отбирали пробы на глубину 0-10 см, 10-20 см, 20-30 см. Отбор осуществлялся специальным пробоотборником производства США Tube auger.

Результаты химического анализа показали, что миграции глифосата по почвенным горизонтам во всех вариантах опыта во время биоремедиации не выявлено. Основная аккумуляция глифосата происходила в верхнем 10 сантиметровом слое.

4.7. Изучение токсичности почвы, загрязненной глифосатом, до и после биоремедиации для теплокровных животных (белых крыс).

Экспериментальное изучение токсичности почвенных экстрактов проводили на самцах белых крыс линии Wistar.

Крысам в качестве постоянного и единственного питья в течение всего эксперимента (до 62 суток) давали экстракты из почвы. Ежедневно отмечали количество выпитой жидкости, оценивали клиническое состояние животных. Ежеженедельно определяли массу тела.

На протяжении всего эксперимента не было отмечено признаков изменения клинического состояния животных. Потребление экстрактов почвы не сказывалось на поведении, рефлексах, состоянии кожи и шерстного покрова, видимых слизистых оболочек подопытных животных. Потребление корма в различные сроки определения не имело различий.

Результаты токсикологических испытаний показали, что почва, загрязненная глифосатом в дозе 100 л/га, оказывает токсическое действие на организм лабораторных животных. У животных при выпаивании экстракта загрязненной почвы, достоверно уменьшается общее количество эритроцитов и лейкоцитов, гематокритная величина, общее количество гемоглобина. Отмечено увеличение количества эозинофилов.

При изучении морфологии клеток в мазках периферической крови крыс, подвергшихся выпаиванию экстрактом загрязненной почвы, отмечено появление единичных (1-2%) нейтрофилов с выраженной оксидазной реакцией цитоплазмы и единичных (1-2%) эозинофилов с выраженной пероксидазной реакцией цитоплазмы.

При анализе биохимических показателей сыворотки крови в группе, получавшей экстракт загрязненной почвы, статистически достоверно повысился уровень глюкозы, холестерина и снизился уровень креатинина.

При микроскопическом исследовании структуры органов животных не было установлено каких-либо специфических изменений, связанных с действием загрязненной почвы.

Выпаивание животным экстрактов почвы после биоремедиации показало, что все физиологические показатели у животных соответствовали норме.

Таким образом, в процессе микробиологической биоремедиации почвы, загрязнённой глифосатом, не образуется токсических продуктов его деструкции. Следовательно, технология микробиологической ремедиации почвы является безопасной для теплокровных животных.

4.8. Изучения влияния процессов биоремедиации на сапротрофную микробиоту после полевого эксперимента

Для изучения последствий биоремедиации на почву в НИЦ ТБП на протяжении двух лет (2008-2009 гг.) проводили отбор проб почвы для изучения влияния ГФ на сапротрофные микроорганизмы.

В 2008 году общая микробная обсеменённость почвы, ранее загрязнённой глифосатом, была ниже контроля. В вариантах, где микроорганизмы-деструкторы в загрязнённую почву не вносились, наблюдалось снижение общей микробной обсеменённости в 1,5 раза. Подобная динамика сохранялась и на следующий год.

В варианте, где почва была обработана микроорганизмами-деструкторами, общая микробная обсеменённость почвы мало отличалась от контрольной (не загрязнённой). В процессе двухлетних исследований не было выявлено каких-либо функциональных изменений почвы после внесения микроорганизмов-деструкторов.

Исходя из полученных результатов можно сделать вывод, что биоремедиация с помощью микроорганизмов-деструкторов глифосата безопасна для почвы и приводит к восстановлению численности сапротрофной микрофлоры.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Почве отведена одна из ведущих ролей в производстве сельскохозяйственной продукции. В погоне за увеличением производимой сельхозпродукции производителями очень часто ей наносится значительный вред. Неумеренная химизация приводит не только к увеличению продуктивности почвы, но и к её загрязнению остатками пестицидов. Согласно официальным данным (Справочник пестицидов и агрохимикатов, разрешённых к применению на территории РФ, 2009 г.), глифосат разлагается в почве в течение двух недель при применении в рекомендуемых дозах. При аварийных разливах и при систематическом применении препарата для этого требуется значительно большее количество времени.

В качестве оценочных критериев состояния природной среды нами была выбрана реакция микробного сообщества почвы. Почвенные микроорганизмы достаточно чувствительны к химическому загрязнению и поэтому вполне могут быть объективными индикаторами состояния качества почвы.

В ходе полевых и лабораторных исследований было выявлено негативное влияние глифосата на агроценоз. Данный гербицид оказывает негативное влияние на такие показатели почвы, как её общая микробная обсеменённость и ферментативная активность, а они являются ключевыми показателями плодородия почвы. Глифосат является одним из наиболее популярных гербицидов в мире и от него вряд ли откажутся в течение ближайших лет, поскольку больше половины выращиваемых в мире генномодифицированных растений является глифосатустойчивыми.

В результате проведённой эколого-токсикологической оценки влияния глифосата и глюфосината на почву было установлено, что дерново-подзолистая почва способна в течение двух лет справляться с загрязнителем, при применении их в рекомендуемых дозах. С аварийными разливами, когда глифосат и глюфосинат попадают в почву в больших количествах, почвенные микроорганизмы уже не справляются. Эти деструктивные процессы продолжаются в течение не менее 3 лет (срок наблюдения).

Микроорганизмы-деструкторы глифосата могут сами появиться в почве только в результате многолетних обработок глифосатом, но это неуправляемый процесс, который может впоследствии негативно сказаться на проживающих рядом людях, поскольку эти микроорганизмы могут быть продуцентами токсинов.

После систематического, длительного использования гербицидов (до 10 лет) гербициды оказывают токсическое действие и необходимо проводить мероприятия по ремедиации загрязнённой почвы.

Проведённая эколого-токсикологическая оценка технологии биоремедиации с помощью микроорганизмов-деструкторов показала: концентрация загрязнителя в почве значительно снижается, уменьшается ее интегральная токсичность, восстанавливается концентрация сапротрофной микробиоты. Таким образом, биотехнология безопасна для почвы и восстанавливает ее плодородие.

Выделенные во ФГУН НИЦ ТБП микроорганизмы-деструкторы глифосата и разработанная технология рекомендуются для биоремедиации загрязнённых глифосатом почв.

6. ВЫВОДЫ

1. Исследования показали, что однократное применение глифосата в рекомендуемых дозах не вызывает негативных изменений основных биологических свойств почвы.

2. Многолетнее, систематическое применение глифосата приводит к снижению численности сапротрофных микроорганизмов почвы и достоверному изменению структуры микробного сообщества за счёт значительного увеличения численности родококков, микрококков, снижению численности артробактера *Arthrobacter globiformis*. В случае глюфосината выявлено увеличение численности *Aspergillus* и *Penicillium*, а также *Actinomyces*.

3. Загрязнение почвы глифосатом при многократном систематическом применении в дозах 3 и 10 л/га приводит к повышению ее интегральной токсичности и снижению дегидрогеназной активности.

4. Из природных образцов почв, загрязнённых глифосатом в течение 8-10 лет, выделены 2 штамма микроорганизмов-деструкторов глифосата *Carinobacterium* sp. Z-1 и *Micrococcus* sp. Z-2. Они депонированы в рабочей коллекции ФГУН НИЦ ТБП.

5. Проведены полевые микроделяночные испытания технологии биоремедиации почвы, загрязненной глифосатом в дозах 10 и 100 л/га. Результаты испытаний показали, что в течение 1 месяца микробной деструкции концентрация глифосата в загрязненной почве снизилась на 100-89% соответственно.

6. Эколого-токсикологическая оценка технологии показала, что использование микроорганизмов-деструкторов приводит в течение 1 месяца к снижению интегральной токсичности почвы, уменьшению загрязненности глифосатом и восстановлению биологической активности.

7. Изучение почвы, загрязненной глифосатом при аварийном разливе в дозе 100 л/га, на белых крысах выявило, что она обладает токсическим действием. После проведенной биоремедиации почва становится безопасной для теплокровных животных.

8. Исследования показали, что биоремедиация загрязненной почвы с помощью микроорганизмов-деструкторов приводит к восстановлению численности и структуры сапротрофной микробиоты.

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Жариков, М.Г. Эколого-токсикологическая оценка воздействия глифосата на почву во время биоремедиации / М.Г. Жариков, Г.А. Жариков, Ю.Я. Спиридонов // - Тез. докл. 9 Международного Форума по пестицидам «Obsolete Pesticides in Central and Eastern European, Caucasus and Central Asia Region: Start of clean up» (Кишинев, Молдавия, 20-22 сентября 2007). - 2007, с. 95-96.
2. Жариков, М.Г. Изучение влияния глифосатсодержащих гербицидов на агроценоз (обоснование методологии) /М.Г. Жариков, Ю.Я. Спиридонов // Агрохимия, 2008, № 8, с. 46-49.
3. Жариков, М.Г. Технология «IN SITU» биоремедиации почв, загрязнённых фосфорорганическими соединениями. / Г.А. Жариков, Н.И. Киселёва, О.А. Крайнова, В.П. Дядищева, М.Г. Жариков, А.А. Леонтьевский, Т.В. Шушкова, И.Т. Ермакова // - Тез. докл. 5 Московского Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 16-20 марта, 2009 г.).- 2009, с. 186-187.
4. Жариков, М.Г. Эколого-токсикологическая оценка воздействия гербицида глифосата на почвенный агроценоз.. – Тезисы доклада Всероссийской конф. «Экотоксикология – 2009. Современные биоаналитические системы, методы и технологии» (Пушино, 26-30 октября 2009). – 2009, с. 91-92.
5. Жариков, М.Г. Многолетнее применение общеистребительного гербицида раундап в центральном регионе Нечерноземья / Ю.Я. Спиридонов, Г.Е. Ларина, Л.Д. Протасова, В.А. Абубикеров, М.Г. Жариков // – Агрохимия, 2010, № 2, с. 29–36.
6. Жариков, М.Г. Эколого-токсикологическая оценка воздействия гербицида глифосата на почвенный агроценоз / М.Г. Жариков, Г.А. Жариков // – Тезисы доклада 2 Междунар. научно-практической конф. «Вермикомпостирование и вермикультивирование как основа экологического земледелия в 21 веке» (Минск, 7-11 июня 2010). – 2010, с. 74-76.
7. Zharikov, M.G. Bioremediation of glyphosate-contaminated soils. (Биоремедиация глифосата в почве) / I.T. Ermakova, N.I. Kiseleva, T.N. Shushkova, M.G. Zharikov, G.A. Zharikov, A.A. Leontievsky // – Applied and microbiology biotechnology, 2010, № 2, pp. 585-594.
8. Жариков, М.Г. Экологическое нормирование в экологическом земледелии – обязательная составляющая УМК вузов РФ / М.Г. Жариков //– Тезисы доклада 17 Международной конференции «Экологическое образование в интересах устойчивого развития» (Москва, 29-30 июня 2011) – 2011, с. 219-220.