

УДК 504.064.36:574.64

БИОТЕСТИРОВАНИЕ ГЕРБИЦИДОВ НА *STYLONYCHIA MYTILUS*

Н.Е. Шувалова, Е.А. Прутенская, Э.М. Сульман, М.Г. Сульман
Тверской государственный технический университет, Тверь

Для определения уровня токсичности гербицидов в качестве тест-реакции мы использовали биотестирование на стилонихиях (*Stylonychia mytilus*). Для определения уровня токсичности выбраны: клопиралид, глифосат, 2,4-Д. В работе описаны условия культивирования стилонихий, подготовка тест-организмов и оптимальное количество простейших для проведения исследования. Биотестирование на инфузориях является быстрым, удобным и показательным, с возможностью визуального отслеживания влияние различных факторов на простейшие. Оценка результата биотеста была выбрана реакция ингибирования размножения или гибель инфузорий. Оценка воздействия гербицидов проводилась при различных концентрациях гербицидов и времени экспозиции. В ходе данной работы определены минимальные концентрации гербицидов, не подавляющие рост клеток стилонихий, доказано, что гербициды влияют на физиологическое состояние стилонихий.

Ключевые слова: клопиралид, глифосат, 2,4-Д, биотестирование, *Stylonychia mytilus*.

DOI: 10.26456/vtbio44

Введение. Пестициды в сельском хозяйстве используются не только для уничтожения сорной растительности на полях, но и для повышения урожайности. Химический метод защиты посевов культурных растений от фитопатогенов, вредителей и регулирования нежелательной растительности в настоящее время является доминирующим (Спиридонов, 2009).

Спектр гербицидов сельскохозяйственного назначения систематически увеличивается и обновляется, с целью замены малоэффективных препаратов на более эффективные и экономически выгодные. К самым распространенным химическим веществам, входящих в состав торговых препаратов являются: клопиралид, метрибузин, глифосат, 2,4-Д, МЦПА (Спиридонов, 2010).

Наиболее продаваемым в мире химическим гербицидом является глифосат. Он широко используется в Европе и России в сельском, лесном хозяйствах, а также в садоводстве. Глифосатсодержащие гербициды являются ключевыми в выращивании генетически

модифицированных культур устойчивых к гербицидам. Миграция гербицидов по почвенному профилю ведет к попаданию и накоплению их в природных водах, включая поверхностные и грунтовые, которые употребляют для питья и бытовых целей (Спиридонов, 2009, 2010).

В некоторых научных изданиях поднимались вопросы о безопасности глифосата, 2,4-Д, но научные материалы противоречивы (Гроздов 2006, Потапов, 2010). Современные методы показали, что остатки глифосата обнаруживаются даже в моче тестируемых людей. Такие эксперименты производили в европейских странах. Считается, что глифосатсодержащие гербициды должны быть запрещены.

О токсичном действии 2,4-Д известно только на предприятиях, производящие данный гербицид. Однако, при изучении влияния 2,4-Д на биологические объекты в окружающей среде возникают трудности, так как отсутствуют простые качественные и количественные методики определения гербицида в биоматериале.

Широкое использование гербицидов, их токсичность, противоречивые данные о влиянии на биосферу объясняет актуальность исследования гербицидов с возможностью экологической оценки их использования в сельском хозяйстве.

Цель работы – исследование влияния токсического действия гербицидов (клопиралида, глифосата, 2,4-Д) на *Stylonychia mytilus*.

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

Для определения уровня токсичности гербицидов, в качестве тест-реакции было выбрано биотестирование на стилонихиях при суточной экспозиции инфузорий. Биологический метод исследования является быстрым, удобным и показательным, с возможностью визуального отслеживания влияния различных факторов на простейшие.

Культивирование стилонихий (температура, среда, корм), подготовка тест-организмов, обработка посуды проводилось согласно ГОСТ 31674-2012 «Корма, комбикорма, кормовое сырье. Методы определения общей токсичности». Средой для культивирования инфузорий служил раствор Лозина-Лозинского следующего состава: NaCl – 0,01 %-ный; KCl – 0,001 %-ный; CaCl₂ 2-водный – 0,001 %-ный; MgCl₂ 6-водный – 0,001 %-ный; NaHCO₃ – 0,002 %-ный. Для приготовления модельного токсиканта был использован 1 %-ный раствор 5-водной сернистой меди.

В связи с тем, что стилонихии в качестве субстрата используют микроорганизмы: бактерии, водоросли, дрожжи, то источником питания были взяты свежие хлебопекарные дрожжи, которые

предварительно тестируют на обычную токсичность, а затем измельчают и высушивают.

Для оценки результата биотеста была выбрана реакция ингибирования размножения или гибель инфузорий. Инфузории поглощают все присутствующие в среде обитания растворимые вещества и мелкодисперсные частицы, что позволяет количественно определить ответную реакцию инфузорий на действие различных токсичных веществ.

Для проведения исследования были взяты концентрации гербицидов в диапазоне от 200 до 2 мг/л, которые готовились из основного раствора путем серийного разведения. Навески растворяли при температуре 60 °С в течении 30 мин. Для экспериментов использовался блок луночного микроаквариума, выполненного из органического стекла. В лунки микроаквариума вносили инфузории после суток культивирования по 100 мкл. Учет количества инфузорий производили при помощи микроскопа. После подсчета клеток в лунки добавляли по 100 мкл гербицида определенной концентрации, в контрольную лунку добавляли 100 мкл дистиллированной воды. Количество лунок для каждого гербицида составляло 12 шт, количество повторов опыта 3 раза. Блок лунок микроаквариума накрывали стеклом для предотвращения испарения. Критериями токсичности служили изменения численности инфузорий в опыте с временем экспозиции 2, 6, 24, 72 часа относительно численности клеток в начале опыта (0 часов).

При определении размеров инфузории фиксацию образцов проводили на предметном стекле с помощью покровного при нагревании на спиртовой горелке не выше 40°С. Фотографии сделаны на биологическом микроскопе CX41 OLYMPUS (Япония) с помощью USB-камеры DCM310 с программным обеспечением «Микро-Анализ база изображений».

Результаты и обсуждение. В клетку стиланихии токсичные вещества способны попадать двумя путями: фагоцитозом и через поверхность клетки. Поэтому в отличие от других биотест-систем, в инфузорию может увеличиваться скорость поступления вносимых ядохимикатов. При этом не до конца растворимые в воде гербициды могут быть захвачены простейшими подобно пищевому субстрату.

Количество гербицида, поглощенного инфузориями, зависит от количества клеток, помещенных в лунки. Определение оптимального числа клеток стилонихий для проведения исследований путем тестирования, проводилось с растворами глифосата и временем экспозиции 24 часа. Результаты опыта приведены в таблице 1.

Опыты показали, что при более высоких концентрациях гербицида единичные клетки инфузорий погибали, при этом происходил полный лизис клеток. В объективе не был обнаружен

опорный комплекс (кортекс) клетки простейших. При количестве клеток от 5-8 шт происходила частичная гибель изучаемых организмов, в тоже время при большем количестве – увеличивалось число клеток практически в 2 раза.

Т а б л и ц а 1

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

Концентрация глифосата, мг/л	Количество стилонихий в микролунке, шт						
Контроль, исходное значение	2	3	5	6	8	9	15
Контроль, через 24 часа	7	7	10	14	15	22	30
60	5	7	9	11	15	18	20
70	0	0	1	4	5	6	60
80	0	0	0	1	2	3	40

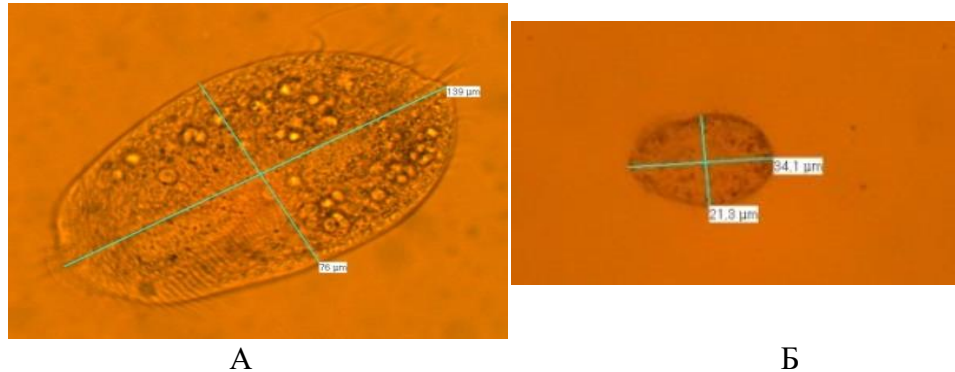
Однако, только при концентрации гербицида 60 мг/л количество клеток простейших практически совпадал с контролем. Численность в других опытах была значительно ниже контроля. Исключение составляют эксперименты с количеством простейших 15шт. При подсчете клеток при времени экспозиции 72 часа в лунках микроаквариума наблюдалось больше особей стилонихий, но в 3,5 - 4 раз меньше, чем материнские (рис.1). Изменение размера клеток инфузорий происходило при добавлении всех гербицидов (глифосата, клопиралида, 2,4-Д).

Размер особи имеет большое значение при освоении субстрата и местообитания. Увеличение числа мелких особей может быть связано с недостатком питания или с уменьшением времени на начальные этапы онтогенеза простейших, когда происходит наибольший прирост биомассы стилонихии.

Исходя их вышеуказанных данных, оптимальное количество клеток для проведения исследования биомониторинга приняли 6-9 шт. Следующим этапом работы стало изучение выживаемости стилонихий от концентрации гербицидов.

При концентрации глифосата 100, 90 мг/л происходит полная гибель клеток, ингибирующая концентрация (частичная гибель клеток) составляет 70, 80 мг/л. На основании экспериментальных литературных данных (Саратовских Е.А., 2005), можно предположить, что глифосат образует комплекс с фосфатилихолином, который определяет скорость переноса гербицида через билипидный слой. При повышении концентрации глифосата в растворе скорость переноса в клетку увеличивается и это приводит к бесконкурентному ингибированию

НАДН-оксидоредуктазы. Данный тип ингибирования, не снижает родство к субстрату, но значительно снижает активность фермента, что ведет к изменению внутриклеточного обмена веществ в клетке.



Р и с . 1 . Микрофотографии стилонихий:
А – размеры стилонихии в контрольном опыте
Б – размеры стилонихии в опытном растворе с глифосатом (80 г/л)

При концентрации глифосфата от 10 до 40 мг/л через 24 часа происходит накопление биомассы, прирост клеток при времени экспозиции 24, 72 часа увеличивался. Минимальная концентрация гербицида, которая не подавляет рост клеток 60 мг/л.

Ингибирующая концентрация гербицида 2,4-Д составляет 50 мг/л, 40 мг/л, минимальная концентрация гербицида, которая не подавляет рост клеток, составляет 30 мг/л.

Результаты исследования при определении токсичности клопиралида показывают, что концентрация, подавляющая рост клеток составляет 50, 40 мг/л, в тоже время концентрация, не влияющая на рост простейших также составляет 30 мг/л. Данная сопоставимость объясняется наличием в структурной формуле обоих гербицидов фенольного кольца, которое оказывает подавляющее действие в токсичности гербицидов.

При наименьшей концентрации гербицидов 1 мг/л наблюдается более замедленный рост клеток по сравнению с контрольным опытом.

Для сопоставления экспериментальных данных с концентрациями фактически используемых препаратов в сельском хозяйстве, был проведен анализ регламента применения некоторых гербицидов указанных в «Справочнике пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации 2017». Данные расчета приведены в таблице 2.

Таблица 2

Концентрация гербицидов в торговых препаратах

Наименование препарата	Наименование действующего вещества (гербицида)	Расчетная концентрация действующего вещества в рабочем растворе (C_{\min} , C_{\max}), г/л	Минимальная концентрация гербицида, не подавляющая рост клеток (опыт) $C_{\text{оп}}$, г/л	Примечание
«Горнадо 500, ВР»	Глифосат	$C_{\min} = 7,5$, $C_{\max} = 20$	$C_{\text{оп}} = 0,08$	Минимальное превышение концентрации расчетной по сравнению с опытной составляет в 94 раза, максимальное – в 250 раз
«Дикопур Ф, ВР»	2,4-Д	$C_{\min} = 2$, $C_{\max} = 4,8$	$C_{\text{оп}} = 0,05$	Минимальное превышение концентрации расчетной по сравнению с опытной составляет в 40 раза, максимальное – в 96 раз
«Лорнет, ВР»	Клопиралид	$C_{\min} = 0,16$, $C_{\max} = 0,99$	$C_{\text{оп}} = 0,05$	Минимальное превышение концентрации расчетной по сравнению с опытной составляет в 3,2 раза, максимальное – в 20 раз

Из приведенных в таблице 2 данных, можно сделать вывод, что концентрация гербицидов в рабочих растворах коммерческих препаратов превышает «безопасную» в десятки и/или сотни раз. В то же время для повышения действия гербицида и увеличения проникновения его во внутрь клетки растений в состав коммерческого препарата добавляют поверхностно-активные вещества, которые за частую усиливают токсичность (Гроздов, 2006).

Заключение. Таким образом, на основании проведенных исследований можно заключить, что *S. mytilus* можно использовать в качестве тест-культуры для определения токсичности гербицидов: глифосата, 2,4-Д, клопиралида. Оптимальная численность для контроля

6-9 штук. Выживаемость стилонихий начинается снижаться по мере повышения концентрации гербицидов. Для глифосата минимальная концентрация гербицида, которая не подавляет рост клеток стилонихий 60 мг/л. Для фенолсодержащих препаратов (2,4-Д, клопиралида) - 30 мг/л.

Выявлены физиологические особенности стилонихий. При концентрации особей 10-15 штук в микроаквариуме независимо от наличия токсикантов происходит увеличение количества простейших, за счет активного их деления, что приводит к снижению размера клетки исследуемого объекта в 3,5-4 раза.

Концентрация гербицидов в рабочих растворах коммерческих препаратов превышает «безопасную» в десятки и/или сотни раз, что оказывает губительное действие на простейших.

Список литературы

- Спирidonov Ю.А., Ларина Г.Е., Шестаков В.Г.* 2009. Методическое руководство по изучению гербицидов, применяемых в растениеводстве. М: Печатный город. 252 с.
- Спирidonov Ю.Я., Ларина Г.Е., Протасова Л.Д., Абубикеров В.А.* 2010. Многолетнее применение общеистребительного гербицида Раундап в центральном регионе нечерноземья // *Агрoхимия*. №2. С. 29-36.
- Потапов П.П., Рулева Т.Н., Мезенова О.Я.* 2010. Исследование реакций инфузорий *Stylonychia mytilus* на факторы безопасности стерилизованных рыбных консервов по содержанию бенз(а)пирена // *Известия ВУЗОВ. Пищевая технология*. № 5-6. С.88-91
- Гроздов А.* 2006. О новом стандарте по определению общей токсичности // *Комбикорма*. № 6. С. 72-73.
- Саратовских Е.А., Коришнова Л.А., Гвоздев Р.И., Куликов А.В.* 2005. Ингибирование НАДН-оксидоредуктазой реакции гербицидами и фунгицидами различного строения// *Известия АН Сер хим.* № 5. С. 1284-1289.

BIOTESTING OF HERBICIDES ON *STYLONYCHIA MYTILUS*

N.E. Shuvalova, E.A. Prutenskaya, E.M. Sulman, M.G. Sulman
Tver State Technical University, Tver

We used stylonychia (*Stylonychia mytilus*) to determine the level of toxicity of herbicides. Chemical clopyralid, glyphosate, 2,4-D was used for the experiment. Full details of the experiment such as stylonychia cultivation conditions, optimal number of protozoa for research are provided. We varied the herbicide's concentrations and the time of an exposure to evaluate its influence on stylonichias. We determined the lowest concentration of

herbicide which does not suppress the growth of *stylonichia*'s cells. We proved that herbicide changes the physiological state of the *stylonichias*' cells. Testing the herbicides on *stilonichias* is thus fast, convenient and productive method due to the easiness of the visual tracking of protozoans.

Keywords: *glyphosate, 2,4-D, clopyralid, biotesting, Stylonichia mytilus.*

Об авторах:

ШУВАЛОВА Наталья Евгеньевна – аспирант, ФГБОУ ВО «Тверской государственной технической университет», 170026, Тверь, наб. А. Никитина, 22, e-mail: ne.shuvalova@tmvl.ru.

ПРУТЕНСКАЯ Екатерина Анатольевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры Биотехнологии и химии, ФГБОУ ВО «Тверской государственной технической университет», 170026, Тверь, наб. А. Никитина, 22, e-mail: prutenskaya@mail.ru.

СУЛЬМАН Эсфирь Михайловна – профессор, доктор химических наук, заведующий кафедрой биотехнологии и химии, ФГБОУ ВО «Тверской государственной технической университет», 170026, Тверь, наб. А. Никитина, 22, e-mail: sulman@online.tver.ru.

СУЛЬМАН Михаил Геннадьевич – профессор, доктор химических наук, заведующий кафедрой стандартизации и сертификации, ФГБОУ ВО «Тверской государственной технической университет», 170026, Тверь, наб. А. Никитина, 22, e-mail: sulmanmikhail@yandex.ru.

Шувалова Н.Е. Биотестирование гербицидов на *Stylonichia mytilus* / Н.Е. Шувалова, Е.А. Прутенская, Э.М. Сульман, М.Г. Сульман // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2018. № 4. С. 262-269.