

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА»
ФАКУЛЬТЕТ ПОЧВОВЕДЕНИЯ
НАПРАВЛЕНИЕ ПОДГОТОВКИ «ЭКОЛОГИЯ И
ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ»
КОД 05.03.06
КАФЕДРА БИОЛОГИИ ПОЧВ
БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА
**«ВЛИЯНИЕ ГЕРБИЦИДА ГЛИФОСАТА НА
БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ АГРОДЕРНОВО-
ПОДЗОЛИСТОЙ ПОЧВЫ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛЬНОГО
ЭКСПЕРИМЕНТА»**

Выполнил студент

Мазуров К.А.

Научные руководители:

д.б.н., в.н.с. Куликова Н.А.

к.б.н., доц. Костина Н.В.

Рецензент:

д.б.н., проф. каф. агрохимии и биохимии растений

Егоров В.С.

Допущена к защите 25.05.2021

Зав. Кафедрой _____

Москва 2021

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
1 Обзор литературы.....	7
1.1 Масштабы применения глифосата.....	7
1.2 Общая характеристика глифосата.....	8
1.3 Поведение глифосата в окружающей среде.....	10
1.4 Токсичность глифосата.....	12
1.5 Взаимодействие глифосата с почвенными микроорганизмами.....	14
2 Объекты и методы исследования.....	17
2.1 Отбор и характеристика почвенных образцов.....	17
2.2 Описание эксперимента.....	17
2.3 Определение нитрифицирующей способности почвы...18	
2.4 Определение азотфиксации.....	19
2.5 Определение денитрификации.....	20
2.6 Определение эмиссии углекислого газа.....	21
2.7 Определение общей численности микроорганизмов.....	21
2.8 Определение функционального разнообразия микроорганизмов методом МСТ.....	22
2.9 Проведение лабораторно-вегетационного опыта.....	23
2.10 Определение глифосата и АМФК.....	23
2.11 Статистическая обработка результатов.....	24
3 Результаты и их обсуждение.....	25
3.1 Влияние глифосата на азотфиксирующую активность дерново-подзолистой почвы.....	25
3.2 Влияние глифосата на денитрифицирующую активность дерново-подзолистой почвы.....	28
3.3 Влияние глифосата на нитрифицирующую активность дерново-подзолистой почвы.....	31
3.4 Влияние глифосата на общую численность микроорганизмов.....	34
3.5 Влияние глифосата на актуальное и потенциальное почвенное дыхание.....	35

3.6 Изменение концентрации глифосата в почве.....	38
3.7 Влияние глифосата на функциональное разнообразие микроорганизмов.....	39
3.7 Влияние глифосата на растения пшеницы.....	42
Выводы.....	45
Список литературы.....	47

ВВЕДЕНИЕ

Гербициды, содержащие глифосат, самые популярные в мире (Duke, 2017). Россия обладает одним из самых быстрорастущих рынков пестицидов в мире. Согласно данным агрономического портала АгроExpert, в 2019 г. рынок пестицидов РФ вырос на 28% и превысил 160 млрд руб. (<http://www.expert-agro.com>). Рост потребления пестицидов в России объясняется увеличением посевных площадей и интенсификацией сельскохозяйственного производства, а также внедрением современных технологий. Сейчас набирает популярность система нулевой обработки почвы (no-till): с 2016 г. по 2020 г. среди общего количества фермеров осведомлённость об этой технологии выросла с 30% до 80%, а количество использующих технологию фермеров увеличилось с 5% до 11–12%. Так как верхний слой почвы при использовании этой технологии не рыхлится, система подразумевает использование неселективного гербицида для контроля засоренности; чаще всего для этих целей используют глифосат. Каждый год общая площадь применения глифосата в мире растёт на 5–7%. В 2019 г. в городе Новочебоксарск построили первый в России завод по производству глифосата (<https://www.vedomosti.ru>). На данный момент российский рынок глифосата самый большой в Европе и представляет из себя 1/3 от общеевропейского рынка. В России глифосат применяется на 15% территории, в последние годы тенденция не меняется. Максимальная площадь территорий, обрабатываемых глифосатом, находится в Калининградской области и составляет 30%, в Центрально-Черноземной зоне этот показатель составляет 10%

(<https://www.businesswire.com>). Также о распространенности глифосата свидетельствует количество препаратов на российском рынке: всего в 2020 г. в нашей стране разрешено к применению более 100 препаратов на основе глифосата.

Европейский союз решил продлить лицензию на гербицид до 2022 г. (<http://news.agropages.com>); в России гербициды на основе глифосата разрешены не только для применения в сельском хозяйстве, но также и в личных хозяйствах (Государственный каталог..., 2020), что способствует бесконтрольному внесению гербицида в почву.

Гербицидные свойства глифосата открыл Джон Франц, который работал в компании Монсанто. В 1974 г. этой компанией был зарегистрирован патент и была выпущена первая коммерческая марка препарата «Roundup» (<https://ru.wikipedia.org/wiki/Глифосат>). С тех пор популярность глифосата увеличивалась, с каждым годом площадь применения пестицида растёт (<http://www.expert-agro.com>). В связи с этим появилась необходимость исследования взаимодействия глифосата с различными компонентами биосферы с точки зрения его безопасности. Об актуальности этой темы свидетельствует рост научных публикаций по запросу глифосат в системе Web of Science(web-of-science.com), по данным системы с 2015 по 2020 г. опубликовано столько же статей сколько с 2000 по 2015 г.. Особенно актуальными являются исследования, направленные на оценку воздействия глифосата на микробное сообщество почвы. Обычно исследователи выделяют микробиологический цикл азота как наиболее чувствительный к применению глифосата (Stratton & Stewart

1992; Kyaw & Toyota 2007; Jenkins et al., 2018). Однако приводимые в литературе данные в разных исследованиях противоречивы. В большинстве публикаций обращают внимание на зависимость влияния глифосата на микроорганизмы от конкретных условий и типа почв (Kyaw & Toyota, 2007; Stratton & Stewart 1992, Nivellet et al., 2017). Кроме того, исследованиях часто используются коммерческие препараты на основе глифосата, различающиеся по входящим в их состав адъювантов (Сох, 1998).

Целью работы является оценка влияния наиболее широко распространенного на территории РФ глифосатсодержащего гербицида раундапа на основные процессы цикла азота в дерново-подзолистой почве в условиях модельного лабораторного эксперимента. Для достижения цели были поставлены следующие задачи по оценке влияния раундапа на:

- актуальную и потенциальную азотфиксацию;
- актуальную и потенциальную денитрификацию;
- актуальную и потенциальную нитрифицирующую способность почвы;
- актуальное и потенциальное дыхание почвы;
- общую численность микроорганизмов;
- общее функциональное разнообразие микроорганизмов;
- на растения пшеницы.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Масштабы применения глифосата

Глифосат является наиболее распространённым гербицидом в мире, темпы роста глифосата также занимают лидирующие позиции среди пестицидов (Duke, 2017). В 1970-е годы применения масштабы использования глифосата во всем мире был относительно небольшими по сравнению с наиболее широко применяемыми тогда на рынке гербицидами (например, атразин, метолахлор). Глифосат стал наиболее широко используемым гербицидом в мире после внедрения генетически модифицированных (ГМ) культур «Roundup Ready», что позволило применять высокие дозы глифосата после появления всходов возделываемой культуры (<https://www.agroxxi.ru/zhurnal-agromir-xxi/stati-rastenievodstvo/istorija-i-perspektivy-primenenija-glifosata-v-ssha.html>). В середине 1980-х ГМ сорта сои, кукурузы и хлопка, устойчивые к глифосату, были одобрены для выращивания в США (Duke, 2017). Устойчивые к глифосату ГМ культуры позволили вносить большее количество пестицида, что улучшило уничтожение сорной растительности. С момента введения ГМ культур применение глифосата выросло более, чем в 15 раз. Две трети общего объема глифосата, применявшегося в США с 1974 г. по 2014 г., было применено за последние 10 лет. В 2016 г. на долю сельскохозяйственных культур, устойчивых к глифосату, приходилось до 56% от всего использованного глифосата в мире. В Аргентине и Бразилии ГМ соя, устойчивая к глифосату, занимает 100% и 93% от высеянных в 2014 г. соответственно. Использование глифосата в

сельском хозяйстве с 1974 г. по 2014 г. выросло 0,36 млн. кг до 113,4 млн. кг, т.е. в 300 раз (Duke, 2017). Использование глифосата на землях несельскохозяйственного использования возросло за тот же период времени в 43 раза (Duke, 2017).

В соответствии с Государственным реестром агрохимикатов Министерства сельского хозяйства Российской Федерации (Государственный каталог..., 2020), на территории РФ зарегистрировано более 105 гербицидных препаратов с глифосатом или его солями в качестве действующего вещества.

Всего по данным Россельхозцентра (<https://rosselhoccenter.com/>), в России в 2018 г. внесено было 36,2 тыс. т. гербицидов, или 55,6% от общего объема пестицидов. Среди наиболее используемых препаратов, содержат в качестве действующего вещества глифосат: Торнадо 500 (1,18 тыс. т.), Тотал (1,10 тыс. т.), Спрут Экстра (0,84 тыс. т.).

Наблюдаемый устойчивый рост применения глифосата во всем мире указывает на необходимость проведения исследований, направленных на изучение его поведения в окружающей среде и, прежде всего, в почве. Одним из основных процессов превращения гербицидов в почве, приводящих к их детоксикации, является разложение. В случае глифосата микробиологический путь разложения является преимущественным (Свиридов и др., 2015). Поэтому особое внимание в настоящее время уделяется исследованию взаимодействия глифосата с почвенной микрофлорой.

1.2 Общая характеристика глифосата

Глифосат (N-(фосфонометил) глицин) – неселективный системный гербицид (Franz et al., 1997), применяемый для борьбы с сорной растительностью или для полного уничтожения растительности. Действие гербициды проявляется в среднем через 2-10 дней, в зависимости от стадии развития, низкая температура замедляет действие глифосата. Повторное появление сорной растительности происходит через 30-50 дней (Захаренко, 1990; Безуглов, 1998).

Несмотря на то, что молекула глифосата была синтезирована намного раньше, гербецидные свойства глифосата были открыты в 1970 г. Джоном Францем, работавшим в американской компании Монсанто (Monsanto). Торговое название первого коммерческого и самого популярного препарата – раундап (Roundup). Впервые этот гербицид начали производить в США. Его применение позволило полностью контролировать численность сорняков как до всходов культуры, так и после их появления в случае возделывания ГМ культур (<https://www.agroxxi.ru>).

Глифосат представляет собой белые кристаллы без запаха. Он хорошо растворим в воде и плохо в органических растворителях. Растворимость глифосата в воде составляет 12 г/л при 25°C (Bronstad & Friestad, 1985). С химической точки зрения глифосат является слабой органической кислотой (рис. 1).

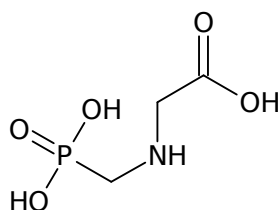


Рисунок 1. Структурная формула глифосата.

С органическими основаниями глифосат образует соли, которые хорошо растворимы в воде (Шутов и др., 2006). Поэтому для повышения растворимости в препаративных формах, непосредственно предназначенных для применения в сельском хозяйстве, глифосат переводят в солевую форму: калиевую, этаноламинную, диметиламинную, аммонийную или изопропиламинную. Растворимость солей возрастает до 144 г/л в случае аммонийной соли и до 1050 г/л в случае изопропиламинной соли (Bronstad & Friestad, 1985). Коммерческие препараты содержащие глифосат в качестве действующего вещества, используют его изопропиламинную соль для повышения растворимости, а также различные адъюванты (в частности, раундап) (рис. 2).

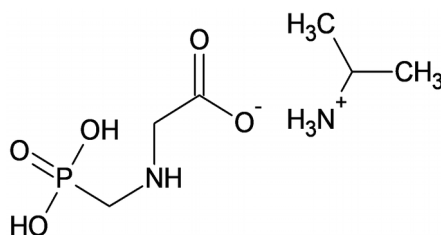


Рисунок 2. Структурная формула изопропиламинной соли глифосата.

Для повышения эффективности действия глифосата в препараты на основе его солей добавляют также поверхностно-активные вещества (ПАВ), которые увеличивают смачиваемость листьев растений, характеризующихся гидрофобностью, и облегчают проникновение глифосата в клетки растений. Существует мнение, что во многих случаях публикуемые данные о токсичности различных препаративных форм глифосата для

нецелевых организмов обусловлены именно ПАВ, входящим в его состав (Сох, 1998).

1.3 Поведение глифосата в окружающей среде

Наряду с установленной токсичностью глифосата для нецелевых организмов, все большее внимание в последнее время в научной литературе уделяется негативным последствиям применения этого гербицида для объектов окружающей среды (Milošević & Govedarica, 2002). Среди основных экологических последствий применения глифосата можно обозначить загрязнение сопредельных сред и накопление в объектах окружающей среды гербицида и его метаболитов.

Считается, что распределение глифосата в окружающей среде после применения препаратов на его основе может происходить в результате 4-х основных процессов (Tu et al., 2001):

- соиспарение с каплями рабочего раствора и обработанных поверхностей;
- образование комплексов в воде с ионами Ca^{2+} и Mg^{2+} ;
- адсорбция на донных отложениях и суспендированных частицах в воде и почве;
- поглощение растениями.

Процесс соиспарения приводит к перемещению гербицида при большой скорости ветра и приводит к попаданию на нецелевые растения (Bronstad & Friestad, 1985).

Наряду с поступлением в воздух, глифосат может загрязнять природные воды в следствии естественного сноса при сельскохозяйственном или лесохозяйственном

использовании, после попадания в водоем глифосат может транспортироваться многие километры из-за течения (Bronstad & Friestad, 1985) В воде глифосат химически стабилен: как показали эксперименты, проведенные Американским Агентством по охране окружающей среды (United States Environmental Protection Agency, EPA <https://www.epa.gov/>), он плохо разлагается в воде в диапазоне pH 3–9 и при температурах вплоть до 35°C, что приводит к загрязнению этим гербицидом не только поверхностных, но подземных вод (WHO, 2005).

При попадании в почву глифосат, несмотря на высокую растворимость в воде, активно адсорбируется почвенными частицами (Ravanel et al., 1999). Коэффициент связывания пестицида почвой, нормированный на содержание органического вещества, является количественной оценкой сорбции, и для глифосата он равен 24000 л/кг, что является крайне высоким показателем (U.S. Department of Energy, 2000). Связывание глифосата возрастает по мере увеличения содержания в ней глины, возрастания катионообменной емкости и уменьшения pH, также важнейшим фактором является уровень фосфатов в почве, фосфаты способны вытеснять гербицид из его комплексов с переходными металлами (Nomura & Hilton, 1977). В адсорбированном состоянии глифосат не проявляет гербицидных свойств (Hance 1976; Glass, 1987; Tu et al., 2001.).

Период разложения глифосата, зависимости от типа почв, находится в диапазоне от 3 до 130 дней, но в отдельных случаях может достигать 1000 дней (Catão J. L. & López-Castillo A., 2018). В последнее время ряд исследований был

сосредоточен на экологическом значении основного метаболита глифосата - аминометилфосфоновой кислоты (АМФК). Даже в случае быстрого разложения самого глифосата в почве, к негативным экологическим последствиям может привести накопление АМФК, действие которой как на почву, так и на растения еще мало изучено (Franz et al., 1997).

Глифосат разлагается в объектах окружающей среды в результате действия солнечной радиации, химического разложения а также микробиологическим путём (Lund-Noie & Friestad, 1986). В почве путем деградации является микробиологический. Также является наиболее быстрым путём деградации глифосата в природе (Свиридов и др., 2015).

1.4 Токсичность глифосата

Токсическое действие глифосата на растения заключается в ингибировании энзима 5-энолпирувил-шикимат-3-фосфат синтазы (ЕПШФ синтаза). Этот фермент является компонентом ферментной системы шикиматного пути биосинтеза ароматических аминокислот (рис. 3) и осуществляет одну из стадий превращения шикимата в хоризмат - предшественник фенилаланина, тирозина и триптофана (Siehl, 1997).

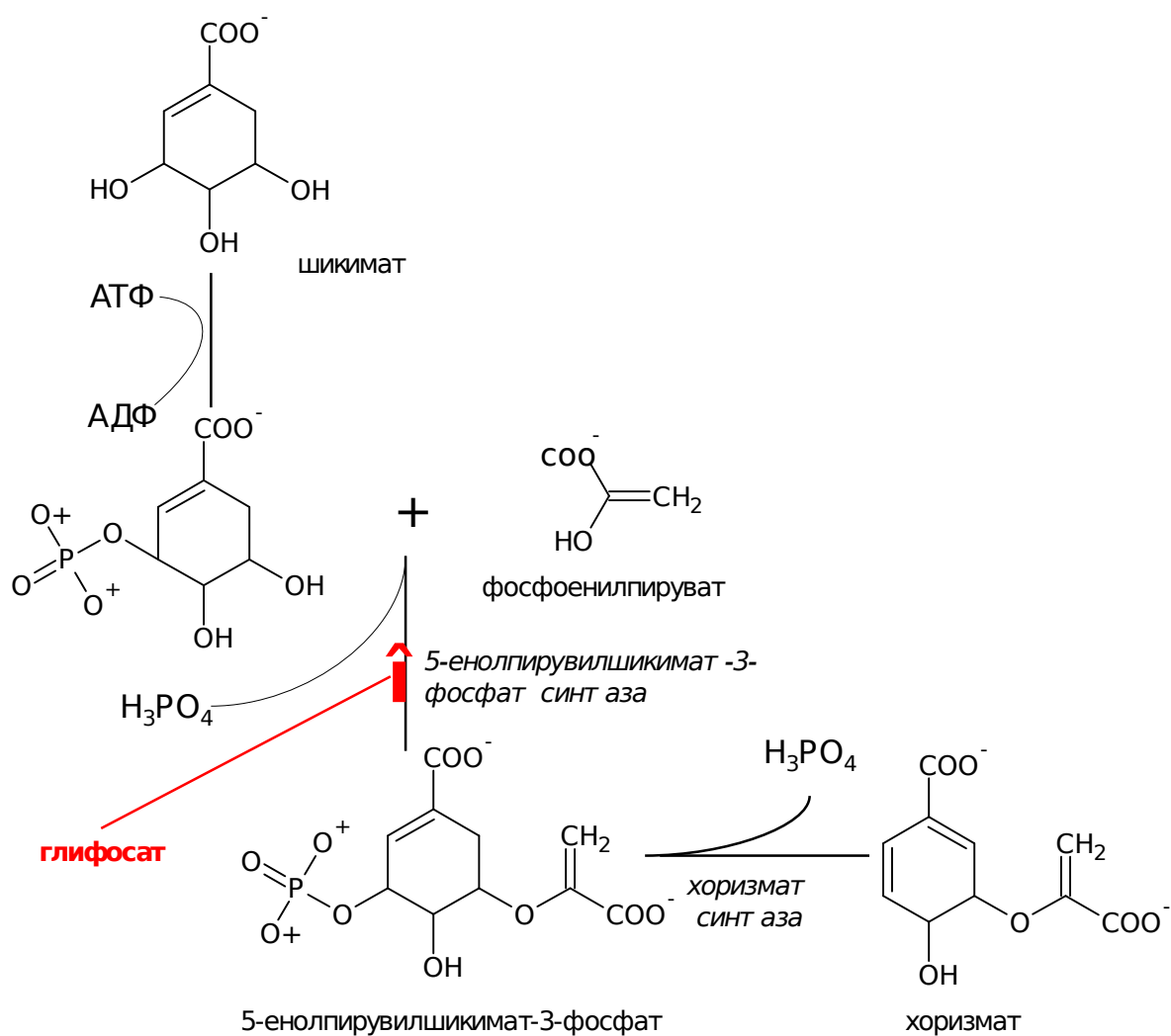


Рисунок 3. Образование хоризмата по шикиматному пути и сайт действия глифосата.

Глифосат хорошо поглощается надземными органами растений и передвигается по растению медленно, но на большие расстояния, что вызывает гибель корневищ многолетних сорняков в радиусе 30 см от места применения. (Справочник пестицидов, 2019).

Изначально безопасность глифосата для животных не вызывала сомнений, поскольку молекулы глифосата блокируют шикиматный путь биосинтеза бензоидных ароматических соединений, который присутствует у растений и микроорганизмов, но отсутствует у животных. Однако современные исследования показывают, что глифосат влияет

на нервную, мышечную и другие системы у крыс. Особенно токсичен глифосат для беспозвоночных: дафний и круглых червей (Folmar et al., 1979; Tate et al., 1997; Tsui et al., 2003.). Показано, что глифосат оказывает тормозящее действие на амилитическую активность слизистой оболочки кишечника рыб (каarp, окунь, туюлка) и беспозвоночных (рачковый зоопланктон, личинки хирономид). При этом установлено, что токсическое действие более выражено при низких значениях pH среды и низкой температуре (Голованова и Аминов, 2013). В связи с тем, что ГМ культуры, устойчивые к глифосату, могут его накапливать, возникла необходимость оценки влияния гербицида на микрофлору кишечника животных. Установлено, что кишечные бактерии, продуцирующие молочную кислоту, как правило, подвержены отрицательному влиянию на глифосат. Эти бактерии в норме производят антибиотики и могут подавлять патогенные бактерии, такие как *Clostridium botulinum*, возбудитель ботулизма. Следствием угнетения непатогенной микрофлоры глифосатом является то, что ботулизм все чаще встречается у коров, которые потребляют корм с высоким содержанием глифосата (Van Bruggen et al., 2017).

Наконец, в последнее время появился ряд работ, которые указывают на его токсичность по отношению ко всем живым организмам, включая человека (Сох, 1998). Было установлено, что основной глифосатсодержащий гербицид раундап ингибирует активность некоторых ферментов печени и пищеварительного тракта у крыс. Считается, что препаративные формы глифосата, содержащие ПАВ, более токсичны, чем чистый гербицид. Количество раундапа,

приводящее к гибели крыс, составляет только около 1/3 количества химически чистого глифосата (Сох, 1998).

Таким образом, обзор существующих литературных источников указывает на растущий интерес к возможным негативным последствиям применения глифосата для окружающей среды. Особая актуальность этой проблемы обусловлена возрастающими масштабами применения этого гербицида (Вопну, 2008). В связи с тем, что разложение глифосата в окружающей среде происходит преимущественно микробиологическим путем, значительный интерес направлен на изучение взаимодействия пестицида с почвенными микроорганизмами.

1.5 Взаимодействие глифосата с почвенными микроорганизмами

После попадания в почву глифосат активно разлагается микроорганизмами. Большинство бактерий в почве превращают глифосат в аминометилфосоновую кислоту (АМФК), путем разрыва С—N связей. Пестицид может выступать в качестве субстрата, микроорганизмы используют его как источника фосфора. Важную роль в этом процессе играет взаимодействие различных микроорганизмов. Существует второй путь разложения глифосата в почве, некоторые микроорганизмы могут использовать глифосат в качестве источника фосфора при недостатке его в почве, например, *Pseudomonas sp.* PG2982. (Свиридов и др., 2015). Путь потребления глифосата в качестве субстрата встречается реже, однако составляет важную часть при описании общего влияния пестицида на микробные сообщества почвы. В следствии сильной модификации

глифосата микроорганизмами образуются устойчивые комплексы в почве (Hance, 1976; Glass, 1987), но может оказывать влияние на почвенное дыхание и приводить к адаптационным изменениям в структуре почвенного микробного сообщества (Железова и др., 2018).

Основным следствием применения глифосата является подавление синтеза аминокислот путём ингибирования шикиматного пути. В связи с тем, что шикиматный путь, ингибируемый глифосатом, присутствует не только у растений, но у некоторых грибов и бактерий, ряд таксонов микроорганизмов чувствительны к токсическому действию глифосата (Siehl, 1997). Чувствительность микроорганизмов к глифосату зависит, главным образом, от класса ЕПШФ синтаз, который они синтезируют. Микроорганизмы, синтезирующие ЕПШФ синтазы, чувствительные к гербициду, относят к 1-му классу, а резистентные – к 2-му классу (Cao et al., 2012). Например, *Agrobacterium sp.*, штамм CP4, является природным устойчивым к действию глифосата микроорганизмом, а синтезируемая им ЕПШФ синтаза используется в ГМ культурах (Cao et al., 2012).

Согласно существующим данным, наиболее чувствительными к токсическому действию глифосата являются микроорганизмы, участвующие в процессах превращения азота (Jenkins et al., 2017). Однако следует подчеркнуть, что единого мнения о влиянии глифосата на эту группу микроорганизмов нет. Так, в ряде работ сообщается об отсутствии влияния глифосата на фиксацию азота, нитрифицирующую или денитрифицирующую активность почвы (Muller et al., 1981). В работе проведён многолетний

эксперимент на кислых (рН 5) лесных почвах. Авторы отмечают, что в кислых условиях глифосат интенсивно связывался почвой, это является причиной отсутствия отклика на внесение глифосата.

В ряде работ, напротив, показано негативное влияние глифосата на нитрификацию в кислых почвах (Weier, Gilliam, 1986). Однако некоторые авторы продемонстрировали, что угнетение микроорганизмов, участвующих в цикле превращения азота в почве, сопровождается положительным влиянием на другие микроорганизмы. Показано, что, несмотря на значительное снижение количества бактерий рода *Azotobacter* в период 7–14 дней после применения гербицида, в этот период наблюдается увеличение количества актиномицетов и грибов, использующих глифосат как источник фосфора (Milošević & Govedarica, 2002).

С другой стороны, существует исследование, которое продемонстрировало стимулирующее действие глифосата на нитрифицирующую способность почвы до 126% от контроля (Nivelle et al., 2017). Наконец, существует множество исследований, показывающих большое разнообразие физиологических и экологических ответов почвенных микроорганизмов на применение гербицида (Milošević & Govedarica, 2002; Горленко и др. 2012; Железова и др. 2018). В целом можно говорить, что в почвах, постоянно загрязняемых глифосатом, происходит развитие микробиоты, устойчивой к токсическому действию гербицида. Это приводит к развитию в таких почвах микробиологических сообществ, существенно отличающихся по видовому составу от почв, на которых глифосат не применялся. Изменение

экосистемных показателей почвенной микробиоты, прежде всего, связано с изменением почвенного дыхания или цикла азота (Nguyen et al., 2016).

Таким образом, анализ существующих литературных данных свидетельствует о том, что влияние глифосата на почвенные микроорганизмы зависит почвенных условий (Rose 2018; Milošević & Govedarica, 2002). Поэтому целью работы была оценка влияния глифосата на почвенные микроорганизмы, участвующие в основных процессах цикла азота в широко распространенных в РФ дерново-подзолистых почвах.

2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Отбор и характеристика почвенных образцов

Образец дерново-подзолистой почвы и ее характеристики были предоставлены кафедрой земледелия и агроэкологии факультета почвоведения МГУ. Почву отбирали в Ногинском р-не Московской обл. ($55^{\circ}48.173'N$ $38^{\circ}14.908'E$) с глубины 0–20 см. Общая характеристика почвы: агродерново-подзолистая типичная бескарбонатная малопахотная неглубокоподзолистая супесчаная, с средне-развитым профилем на флювиогляциальных отложениях рН водн. 5,3; содержание органического углерода ОС 1,83%; общее содержание азота N 0,12%; содержание подвижного калия K_2O 46 мг/кг почвы; содержание подвижного фосфора P_2O_5 175 мг/кг.

2.2 Описание эксперимента

Для исследования почву высушивали и просеивали через сито 2 мм, предварительно удалив остатки корней. Для проведения эксперимента в пластиковые вегетационные стаканы вносили по 100 г воздушно-сухой почвы. Навеску брали на лабораторных весах с точностью $\pm 0,02$ г. Глифосат вносили в виде водного раствора до влажности, соответствующей 70% полной влагоемкости почвы (23,8 мл), для создания концентрации гербицида 9,6 мг/кг, что соответствует дозе внесения 8 л/га. Выбор содержания глифосата в почве основан на максимальной рекомендуемой дозе внесения (Государственный каталог..., 2020) и предположения, что весь гербицид удерживается в верхнем слое почвы 2–5 см (Bott et al., 2011). В контрольные стаканы вносили такой же объем дистиллированной воды.

Стаканы взвешивали, чтобы в дальнейшем проводить контроль влажности по весу, прикрывали крышками для вентиляции и постепенного испарения влаги, и помещали в темноту, в термостат при температуре 24°C. Через 1 сут., 7 сут., 14 сут. и 28 сут. часть стаканов извлекали для проведения пробоотбора с целью определения следующих показателей:

- потенциальная и актуальная нитрификация;
- потенциальная и актуальная азотфиксация;
- потенциальная и актуальная денитрификация;
- актуальная и потенциальная эмиссия углекислого газа;
- определение функционального разнообразия микроорганизмов (МСТ)
- определение общей численности микроорганизмов.

Оставшуюся после проведения пробоотбора почву помещали в холодильник при температуре 4°C и в дальнейшем использовали для проведения вегетационного эксперимента.

Повторность трехкратная. Схема эксперимента приведена на рис. 4.

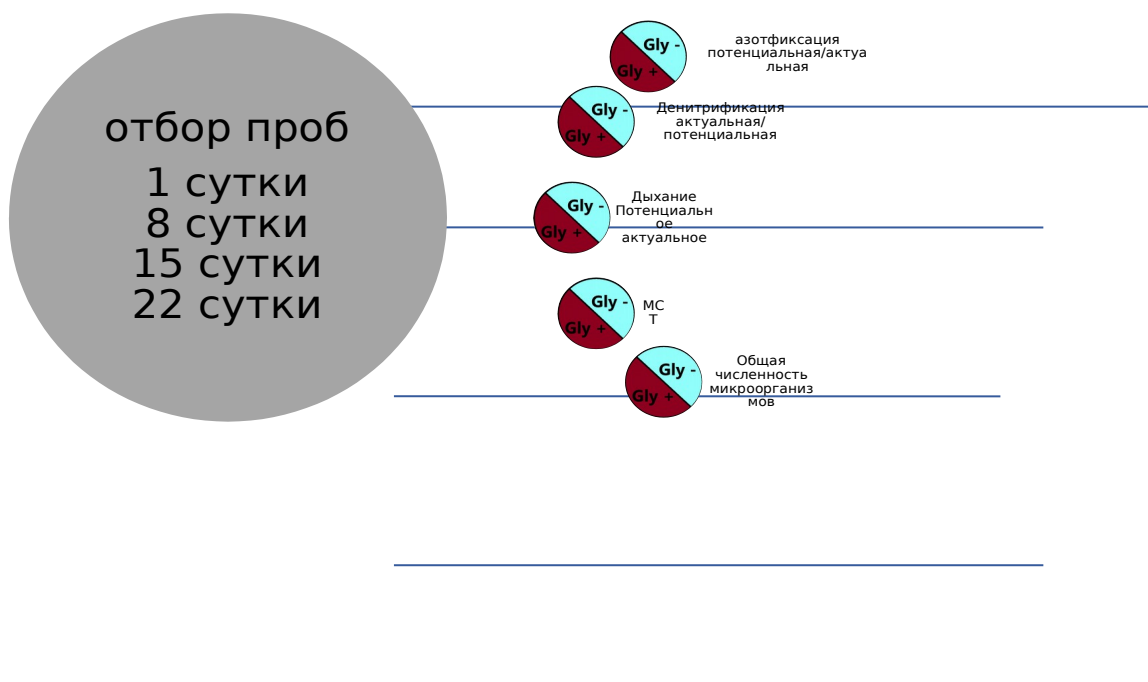


Рисунок 4. Схема эксперимента.

2.3 Определение нитрифицирующей способности почвы

В пробирку с почвой, содержащей 5 г. почвы после инкубирования, приливали 12.5 мл 0.25М раствора $Mg(CH_3COO)_2$, взбалтывали в течение 1 ч на встряхивателе Intelli-Mixer в режиме C1 (ELMI, Латвия), центрифугировали при 2000 об./мин в течение 15 мин в центрифуге CM-6M (ELMI, Латвия) и в центрифугате при помощи ион-селективного электрода «Эком - NO_3^- » и иономера Экотест-120 (Эконикс, РФ) измеряли содержание азота в нитратной форме. Для построения калибровочной зависимости использовали растворы KNO_3 10^{-5} - 10^{-2} М в 0.25М $Mg(CH_3COO)_2$.

На основании полученных данных для каждого варианта опыта рассчитывали среднее и стандартное отклонение. Сравнение вариантов проводили на основании дисперсионного анализа с расчетом НСР.

2.4 Определение азотфиксации

Азотфиксацию определяли ацетиленовым методом. Метод основан на том, что нитрогеназа азотфиксирующих микроорганизмов способна восстанавливать ацетилен C_2H_2 до этилена C_2H_4 . Оба непредельных углеводорода легко идентифицируют при помощи газового хроматографа. Процессы восстановления молекулярного азота и восстановления ацетилена аналогичны, это используют для определения азотфиксации. Если в газовой среде присутствуют одновременно N_2 и C_2H_2 , то в первую очередь произойдет восстановление ацетилена вследствие большего сродства электронов к атому углерода. Таким образом определение азотфиксации осуществляется с высокой точностью (Степанов и Лысак, 2002).

Для определения актуальной азотфиксации, навески свежей почвы 5 г. помещали в пенициллиновые флаконы объемом 10 мл. Флаконы закупоривали резиновой пробкой, вводили 1 мл. ацетилена и инкубировали в термостате, при постоянной температуре $28^{\circ}C$ в течение суток. После этого производили измерения.

Для определения потенциальной азотфиксации, навески свежей почвы 5 г. помещали в пенициллиновые флаконы объемом 10 мл., добавляли раствор глюкозы в расчете 1% глюкозы от массы воздушно-сухой почвы. Увлажняли стерильной водой до влажности 60% от полной влагоемкости почвы. После этого почву перемешивали стеклянной палочкой для полного распределения глюкозы, флаконы закрывали ватной пробкой и помещали в термостат при температуре $28^{\circ}C$ на 1 сут. Через 1 сут. инкубации флаконы

укупоривали резиновой пробкой, вводили 1 мл ацетилена и инкубировали в термостате при 28°C в течение 1 ч. Затем из флаконов шприцем отбирали пробу газа объемом 1 мл и вводили в хроматограф «Кристалл-2000» (Хроматэк, Россия) с пламенно-ионизационным детектором (ПИД) для определения количества образовавшегося этилена.

Характеристики прибора: длина колонки 1 м, диаметр 3 мм, наполнитель Porapak N 80/100, температура колонки 60°C, температура детектора 160°C, температура испарителя 100°, расход газа-носителя (N₂) 50 мл/мин, воздуха 280 мл/мин, водорода 28 мл/мин. Определение проводили в 3-х кратной повторности. Активность азотфиксации выражена в нг C₂H₄/(г×ч).

2.5 Определение денитрификации

В процессе денитрификации в почве происходит восстановление нитратов до молекулярного азота, помимо этого образуются промежуточные продукты: NO₂⁻, NO, N₂O. Для определения денитрифицирующей активности почвы используют ацетилен, который ингибирует редуктазу закиси азота, это позволяет судить об активности процесса по накоплению N₂O в газовой фазе.

Для определения актуальной денитрификации навеску свежей почвы 5 г. помещали в пенициллиновые флаконы объемом 10 мл, герметично закрывали резиновыми пробками и в течение 1 мин продували аргоном. Далее вводили 1 мл ацетилена и инкубировали при температуре 28°C. Измерение концентрации закиси азота проводили на 5-е сут. на газовом хроматографе «Кристалл-2000» с детектором электронного захвата (ДЭЗ).

Для определения потенциальной навески почвы 5 г помещали в пенициллиновые флаконы, увлажняли до 60% от полной влагоёмкости, затем вносили глюкозу (2,5 мг. на 1 г воздушно-сухой почвы), нитрат калия (0,3 мг на 1 г воздушно-сухой почвы) и добавляли 3 мл стерильной воды. Флаконы герметично закрывали резиновыми пробками и в течение 1 мин. продували аргоном, затем шприцем вводили 1 мл ацетилен для ингибирования редуктазы закиси азота. Флаконы тщательно встряхивали и помещали в термостат при 28°C на 1 сут., после чего проводили измерение концентрации закиси азота.

Характеристика прибора: длина колонки 1 м, диаметр 3 мм, наполнитель Porapak N 80/100, расход газа-носителя (N_2) 90 мл/мин, температура детектора 240°C, температура колонки 50°C, испарителя 100°C. Определение активности денитрификации проводили в 3-х кратной повторности. Активность денитрификации выражена в мкг $N_2O/(г \times ч)$.

2.6 Определение эмиссии углекислого газа

Для определение актуальной эмиссии CO_2 навеску свежей почвы 5 г помещали в пенициллиновые флаконы, герметично закрывали резиновыми пробками и проводили инкубацию в течение 1 сут. при температуре 28°C, затем проводил измерения.

Для определение потенциальной эмиссии CO_2 навеску свежей почвы 5 г помещали в пенициллиновые флаконы, увлажняли до 60% от ПВ. Затем вносили глюкозу из расчета 2,5 мг на 1 г воздушно-сухой почвы, герметично закрывали резиновыми пробками и инкубировали в течение 1 сут. при температуре 28°C.

Анализ содержания CO_2 проводили на газовом хроматографе «М-3700» с детектором по теплопроводности. Длина колонки 3 м, диаметр 3 мм, наполнитель Полисорб-1, температура испарителя 30°C , температура катарометра 100°C , измерительных элементов 150°C , сила тока 148 мА, расход газа-носителя (гелия) 30 мл/мин. Эмиссию углекислого газа выражали в мкмоль $\text{CO}_2/(\text{г}\times\text{ч})$. Определение активности дыхания проводили в 3-х кратной повторности.

2.7 Определение общей численности микроорганизмов

Определение биомассы бактерий и грибов в почвах проводили при помощи метода люминесцентной микроскопии с окрашиванием акридином оранжевым. Количество бактерий определяли при прямом микроскопировании (микроскоп «Axioskop 2+»). Водно-почвенные суспензии (1:100) обрабатывали на низкочастотном диспергаторе Sonopuls (Швейцария) (22 кГц, 0.44 А, 2 мин) (Методы..., 1991). Микропипеткой наносили по 0,01 мл суспензии на обезжиренные предметные стекла и равномерно распределяли ее петлей. После полного высыхания капли препарат фиксировали легким нагреванием на пламени горелки. Для одного образца готовили 3 препарата. На каждом мазке просматривали по 50–100 полей зрения. Препараты для подсчета бактерий окрашивали раствором акридина оранжевого (1:10000) в течение 2–3 мин. Расчет количества клеток на 1 г почвы проводили по формуле:

$$N = \frac{S1an}{VS2C}$$

где N - количество клеток в 1 г почвы; S_1 - площадь препарата (мкм^2); n - показатель разведения почвенной суспензии; a - среднее число клеток в поле зрения; V - объем капли, наносимой на стекло (мл); S_2 - площадь поля зрения микроскопа (мкм^2); c - навеска почвы (г).

2.8 Определение функционального разнообразия микроорганизмов методом МСТ

Для оценки влияния глифосата использовали метод мультисубстратного тестирования (Горленко, 2010; Горленко и Кожевин, 2005) Метод заключается в анализе спектров потребления субстратов изучаемым микробным сообществом. При анализе использовали стандартные планшеты для иммунологических тестов с 96 ячейками. В каждую ячейку помещали один из 47 субстратов (соли органических кислот, сахара, аминокислоты, амины, спирты, полимеры, амиды, нуклеозиды), набор минеральных солей и тетразолий фиолетовый в качестве индикатора роста микроорганизмов. Далее подготавливали почвенную суспензию, из 3-х проб подготавливали смешанную пробу, одну без глифосата и одну с глифосатом из каждого пробоотбора, всего 8 проб. К навеске почвы 0,7 г добавляли 50 мл дистиллированной воды, после обработки на орбитальном шейкере типа VORTEX (1,5 мин, 3000 об/мин) и центрифугирования ($g_{2,2}$, 2 мин). Планшеты инкубировали 3-е сут. при температуре 28°C. По мере роста микроорганизмов соли тетразолия восстанавливаются до окрашенного формазана. Окраска пропорциональна интенсивности потребления субстрата, её регистрацию осуществляли с помощью многоканального фотометра «Униплан» на длине

волны 510 нм. Далее информация автоматически поступала в базу данных компьютера и обрабатывалась с помощью оригинального программного обеспечения ЭКОЛОГ (Горленко, 2010) Данные обработаны в программах Excel и STATISTICA. Проведены корреляционные и кластерный анализы (Евклид-Вард) для данных МСТ.

2.9 Проведение лабораторно-вегетационного опыта

В стаканы с почвой помещали предварительно откалиброванные, простерилизованные и замоченные (24 ч, 24°C, термостат) семена пшеницы мягкой (Л-1), отбирая для посадки только наклюнувшиеся семена. Стерилизация семян: семена заливали на 30 мин 8% раствором H_2O_2 , потом семена промывают 5–6 раз стерильной дистиллированной водой (Nardi et al., 2000). Посадку производили на глубину ~ 1 см, по 5 семян на 1 стакан. Для выращивания стаканы с семенами помещали в вегетационную камеру на 21 сут. (фотопериод 12 ч, 24°C). Полив проводили по мере необходимости. В конце опыта проводили учет длины побегов и корней, сырой и воздушно-сухой надземной биомассы.

На основании полученных данных для каждого варианта опыта рассчитывали среднее и стандартное отклонение. Сравнение вариантов проводили на основании дисперсионного анализа с расчетом НСР.

2.10 Определение глифосата и АМФК

Определение содержания глифосата и АМФК было проведено И.В. Плющенко (Химический факультет МГУ). Водную экстракцию гербицида и его основного метаболита осуществляли согласно (Druart et al., 2011), хроматографическое разделение и масс-спектрометрическое

определение – согласно (Chen et al. 2013). Для определения содержания глифосата и АМФК использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием на жидкостном хроматографе Ultimate 3000 (Dionex, США) с диодно-матричным детектором и гибридного тандемного тройного квадрупольного масс-спектрометра Qtrap 3200 (ABSciex, Канада), оснащенного источником ионизации электрораспылением. Пределы обнаружения глифосата и АМФК составили 80 и 140 мкг/кг соответственно.

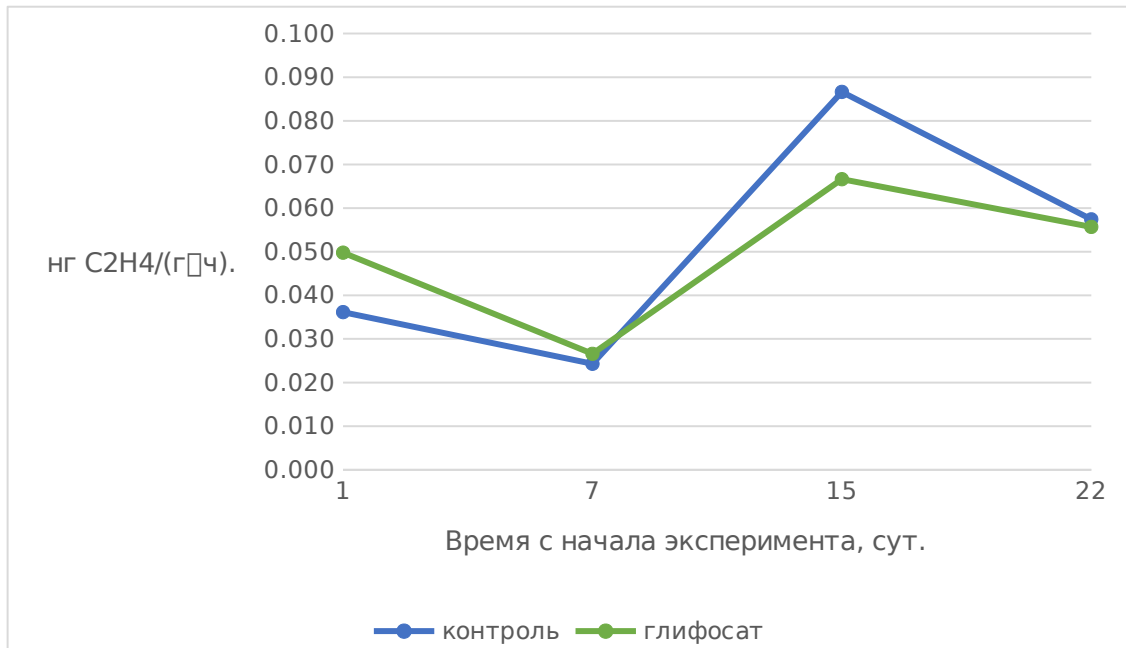
2.11 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку проводили с использованием Excel 2019 (Microsoft, США). Обработка результатов включала в себя расчет среднего и стандартного отклонения. Значимость различия средних значений в большинстве случаев оценивали на основании критерия Краскела-Уоллиса (<https://www.socscistatistics.com/tests/kruskal/default.aspx>). В некоторых случаях для этой цели использовали однофакторный дисперсионный анализ с последующим расчетом НСР. Выбранный уровень доверительной вероятности 95%.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Влияние глифосата на азотфиксирующую активность дерново-подзолистой почвы

Данные по влиянию глифосата на азотфиксирующую активность почвы представлены в табл. 1 и 2, а также рисунках 5 и 6.



Рисун

ок 5. Динамика изменения актуальной азотфиксации в дерново-подзолистой почве в условиях модельного эксперимента. Планки погрешности на графике отражают стандартное отклонение ($n = 3$).

Таблица 1. Влияние глифосата на актуальную азотфиксацию дерново-подзолистой почвы в условиях модельного эксперимента при различном времени инкубирования. Среднее \pm стандартное отклонение ($n = 3$).

Время после внесения глифосата, сут.	Актуальная азотфиксация, нг C ₂ H ₄ / (г×ч)	
	Контроль	Глифосат
1	0,036±0,05	0,05*±0,01
8	0,023±0,00	0,027±0,00

	1	4
15	0,087±0,0 67	0,067*±0,00 3
22	0,057±0,0 02	0,056±0,01

* – значимое отличие от контроля

Эксперимент показал очень низкие показатели актуальной азотфиксации, это свидетельствует о низком содержании органического вещества и общей обеднённости почвы. Достоверное увеличение актуальной азотфиксации в образце с применением глифосата обнаружено на 1-е сутки, что тоже может свидетельствовать об обеднённости почвы и связано, по-видимому, с поступлением дополнительного количества органического вещества в виде глифосата и его адьювантов. При отсутствии других источников, микроорганизмы могут использовать глифосат в качестве субстрата. Как в контрольном варианте, так в почве с внесением глифосата, на 15-е сутки наблюдали максимальную скорость азотфиксации. Можно предположить, что наблюдаемая тенденция связана с особенностями проведения эксперимента. Так как для эксперимента использовали предварительно высушенную почву, то в первые две недели эксперимента проходило ее «оживление», чем и объясняется рост микробиологической активности.

На 15-е сутки азотфиксация в присутствии глифосата была значимо ниже, чем в контрольном варианте, и составляла 77% от контрольного значения. Это свидетельствует об ингибирующем влиянии глифосата, по крайней мере, на определенные группы азотфиксирующих

организмов. На 22-е сутки скорость актуальной азотфиксации в контрольном варианте и варианте с внесением глифосата не отличались. Это может указывать на практически полную деградацию гербицида в почве к этому времени.

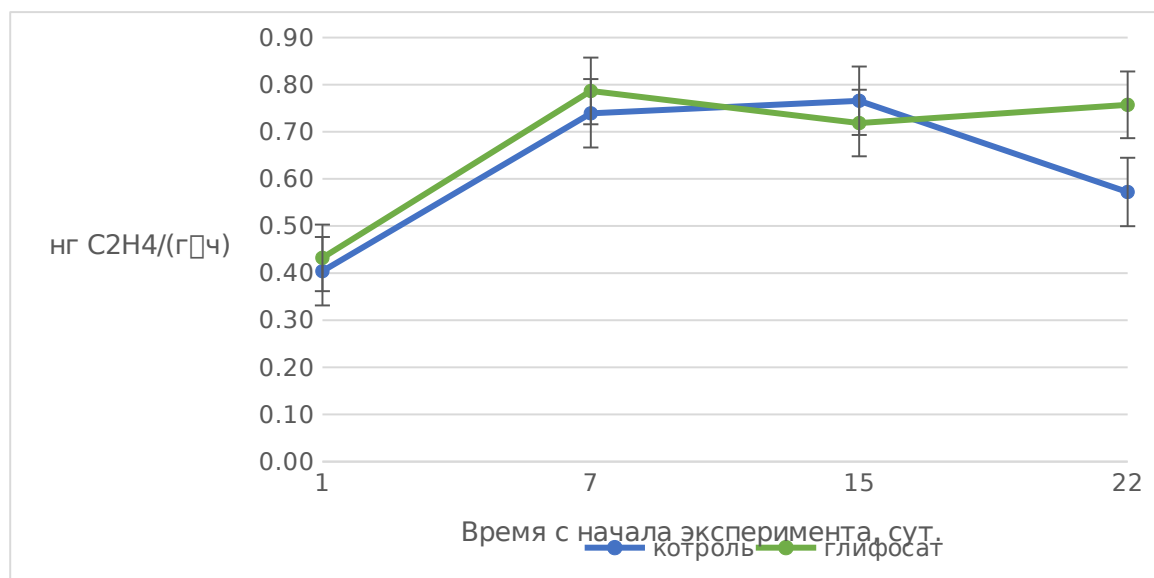


Рисунок 6. Динамика изменения потенциальной азотфиксации в дерново-подзолистой почве в условиях модельного эксперимента. Планки погрешности на графике отражают стандартное отклонение (n = 3).

Таблица 2. Влияние глифосата на потенциальную азотфиксацию дерново-подзолистой почвы в условиях модельного эксперимента при различном времени инкубирования. Среднее ± стандартное отклонение (n = 3).

Время после внесения глифосата, сут.	Потенциальная азотфиксация, нг C ₂ H ₄ / (г×ч)	
	Контроль	Глифосат
1	0,40±0,03	0,43±0,04
8	0,74±0,04	0,79±0,08
15	0,77±0,06	0,72±0,08
22	0,57±0,39	0,76±0,39

* – значимое отличие от контроля

При измерении потенциальной азотфиксации не было отмечено значимого влияния глифосата на этот показатель, поскольку это нивелировалось внесением глюкозы – легкодоступного субстрата.

Похожий эксперимент был поставлен Горленко с соавторами (Горленко и др., 2012). Для эксперимента также использовали дерново-подзолистую почву, а внесение глифосата проводили в сходных дозах (0,5–50,0 мг/кг). Согласно полученным результатам, глифосат не оказывал влияния на азотфиксирующую активность почвы. Основным отличием в методике проведения эксперимента было выбранное время инкубирования, которое значительно превышало использованное в нашей работе и составило 45 сут. В нашем эксперименте негативное влияние глифосата на скорость азотфиксации было обнаружено только при небольшой длительности инкубации (15 сут.), в то время как обнаруженные отличия нивелировались при более длительном сроке (22 сут.). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что глифосат влияет на скорость азотфиксации в почве только в течение первых двух недель после внесения; в дальнейшем эффекта глифосата не наблюдается.

3.2 Влияние глифосата на денитрифицирующую активность дерново-подзолистой почвы

Данные по влиянию глифосата на денитрифицирующую активность почвы представлены в табл. 3 и 4, а также рисунках 7 и 8.

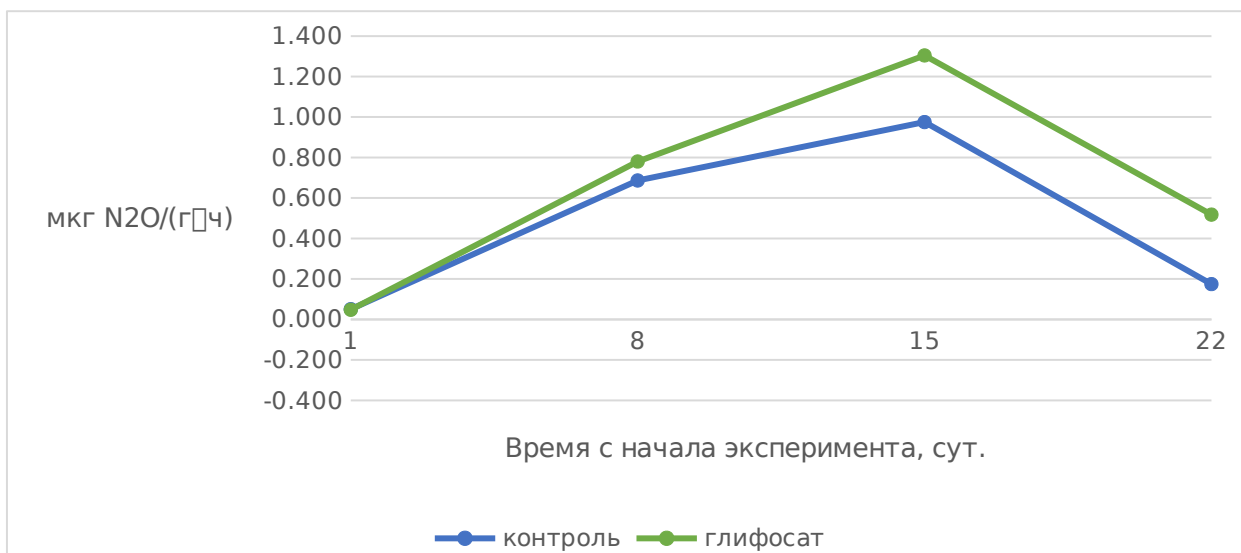


Рисунок 7. Динамика актуальной денитрификации в дерново-подзолистой почве в условиях модельного эксперимента. Планки погрешности на графике отражают стандартное отклонение ($n = 3$).

Таблица 3. Влияние глифосата на актуальную денитрификацию дерново-подзолистой почвы в условиях модельного эксперимента при различном времени инкубирования. Среднее \pm стандартное отклонение ($n = 3$).

Время после внесения глифосата, сут.	Актуальная денитрификация, мкг N ₂ O / (г×ч)	
	Контроль	Глифосат
1	0,05±0,019	0,048±0,036
8	0,69±0,34	0,78±0,02
15	0,97±0,32	1,3±0,14
22	0,17±0,2	0,52*±0,32

* – значимое отличие от контроля

Максимальное значение скорости актуальной денитрификации в контрольном варианте и в варианте с внесением глифосата наблюдали на 15-ый день инкубации; она составила 0,97 мкг N₂O/(г×ч) и 1,3 мкг N₂O/(г×ч) соответственно. Наименьшее значение было отмечено на 1-е сутки, это можно объяснить низкой микробиологической

активностью почвы вследствие длительного хранения в сухом состоянии.

Рост актуальной денитрификации в исследуемых образцах с увеличением времени инкубирования до 15 суток и ее стабилизация на 22-е сутки эксперимента, как и в случае с азотфиксацией, могут быть связаны с тем, что почва длительное время хранилась в сухом состоянии и потребовалось время на восстановление ее микробиологической активности. На 22-е сутки почва, содержащая глифосат, показывает статистически значимую более высокую денитрифицирующую активность (306% от контроля). Это может быть связано с тем, что микроорганизмы используют глифосат в качестве субстрата.

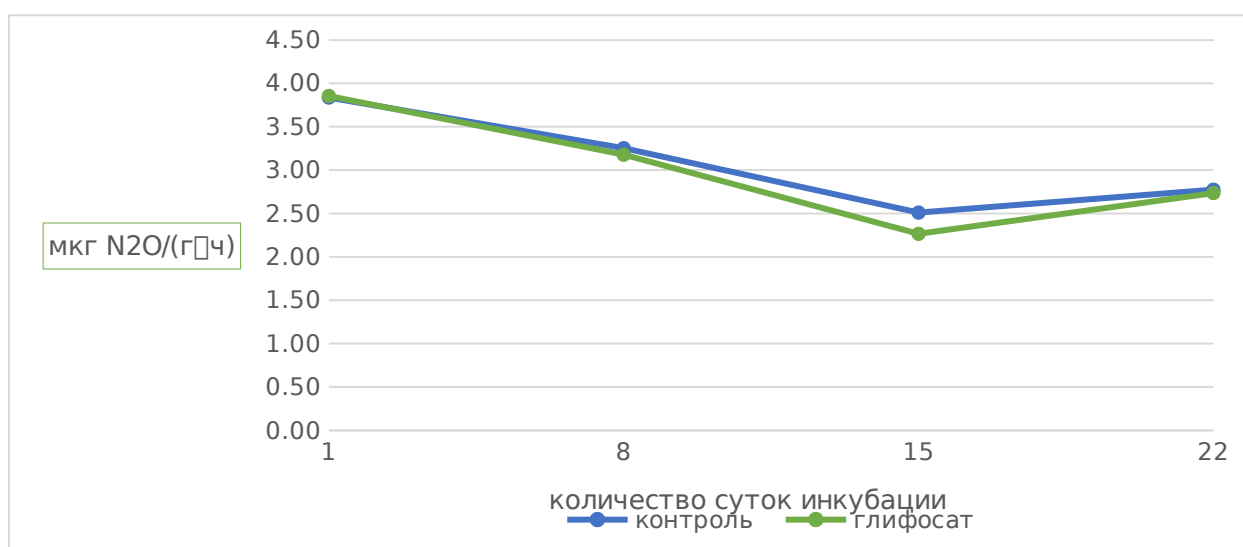


Рисунок 8. Динамика потенциальной денитрификации в дерново-подзолистой почве в условиях модельного эксперимента. Планки погрешности на графике отражают стандартное отклонение ($n = 3$).

Таблица 4. Влияние глифосата на потенциальную денитрификацию дерново-подзолистой почвы в условиях

модельного эксперимента при различном времени инкубирования. Среднее \pm стандартное отклонение (n = 3).

Время после внесения глифосата, сут.	Потенциальная денитрификация, мкг N ₂ O / (г×ч)	
	Контроль	Глифосат
1	3,84±0,29	3,85±0,16
8	3,25±0,21	3,18±0,18
15	2,51±0,32	2,27±0,14
22	2,77±0,32	2,74±0,26

* – значимое отличие от контроля

Потенциальная денитрификация также достигает максимума на 15-е сутки и стабилизируется при увеличении продолжительности инкубирования, что также свидетельствует об изначальной бедности почвы и последующей активации микроорганизмов. В отличие от актуальной денитрификации, на 22-е сутки нет различий между контрольным образцом и почвой, содержащей глифосат. Это может быть объяснено тем, что при оценке потенциальной денитрификации в почву вносили легкодоступный субстрат глюкозу, и глифосат уже не влияет на денитрифицирующую активность в качестве потребляемого субстрата.

Для сравнения в статье (Куав & Toyota 2007) был поставлен эксперимент с глифосатом и измерена актуальная денитрификация. В данной статье влажность выше, чем в нашем эксперименте и составляет 80% также имело место внесение удобрений, однако в результате инкубации 40 дней не было выявлено значительных изменений, значение на 15 сутки в почве возле станции Miura (0-10 см пахотного слоя

Японии тяжёлый суглинок) 44.1 мкг. N₂O/(г×ч), в почве возле станции Tuarkone 29.3 мкг. N₂O/(г×ч) (средний суглинок 0-10 см пахотного слоя). В нашем эксперименте денитрифицирующая активность находится на очень низком уровне, достоверных отличий не обнаружено, что соответствует литературным данным.

В статье (Stratton & Stewart, 1991) из 12 опытов изменения наблюдались в 5; в 3 из них денитрификация была значительно ингибирована, в то время как денитрифицирующая активность стимулировалась в других 2-х опытах. Хотя в остальных системах (7 из 12 сравнений) достоверных различий между денитрификацией в собранных образцах не выявлено. Сравнивая наш эксперимент с литературными данными можно сказать, что отличия наблюдаются при небольшой продолжительности инкубирования, это связано с тем, что глифосат может выступать в качестве субстрата для микроорганизмов и в продолжительном эксперименте этот эффект перестает влиять на денитрифицирующую активность.

Таким образом, полученные результаты указывают, что влияние глифосата на денитрифицирующую активность почв может быть зафиксировано только при непродолжительных сроках инкубирования, не превышающих 1 месяц после внесения гербицида.

3.3 Влияние глифосата на нитрифицирующую активность дерново-подзолистой почвы

Данные по влиянию глифосата на нитрифицирующую активность почвы представлены в табл. 4 и 5, а также рисунках 9 и 10.

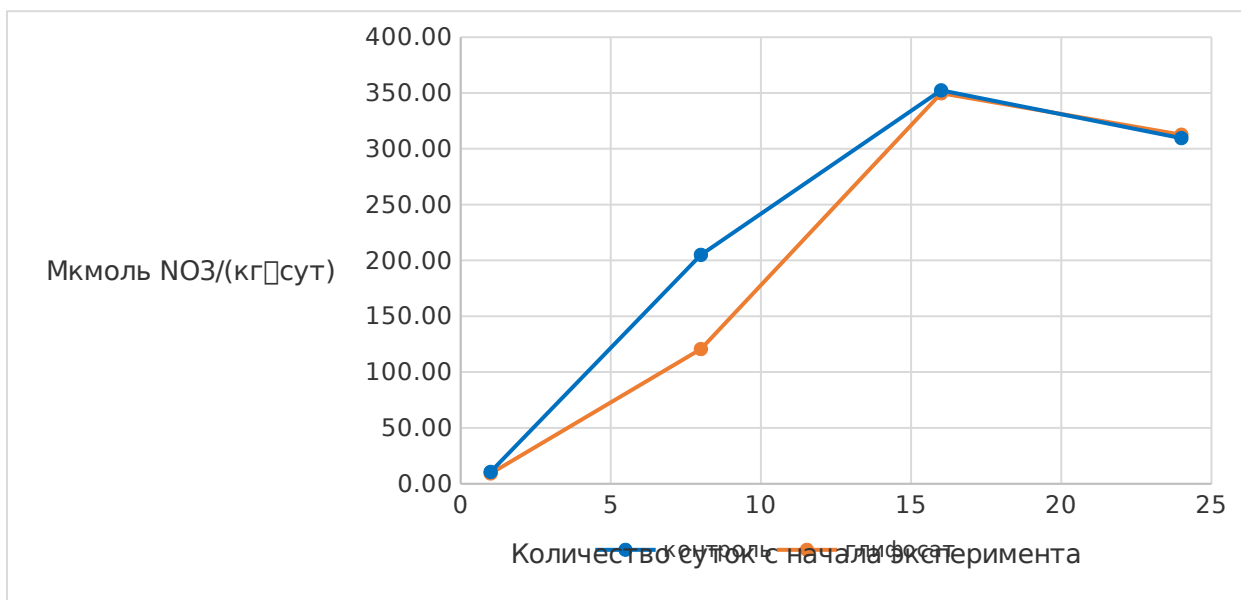


Рисунок 9. Динамика изменения актуальной нитрифицирующей способности дерново-подзолистой почвы в условиях модельного эксперимента. Планки погрешности на графике отражают стандартное отклонение ($n = 3$).

Таблица 5. Влияние глифосата на актуальную нитрифицирующую способность дерново-подзолистой почвы в условиях модельного эксперимента при различном времени инкубирования. Среднее \pm стандартное отклонение ($n = 3$)

Время после внесения глифосата, сут.	Актуальная нитрификация, мкмоль NO ₃ / (кг × сут)	
	Контроль	Глифосат
1	10,56 ± 0,01	0,16 ± 0,17
8	205 ± 7	121* ± 6
15	352 ± 8	349 ± 1
22	309 ± 2	312,6 ± 0,7

* – значимое отличие от контроля

В ходе эксперимента актуальная нитрифицирующая активность росла на 8-е и 15-е сутки, как в почве контрольного варианта, так и в почве с внесенным

глифосатом; после этого наблюдали небольшое снижение этого показателя. На 8-е сутки почва с глифосатом имела более низкую нитрифицирующую активность по сравнению с контрольной (59% от контроля).

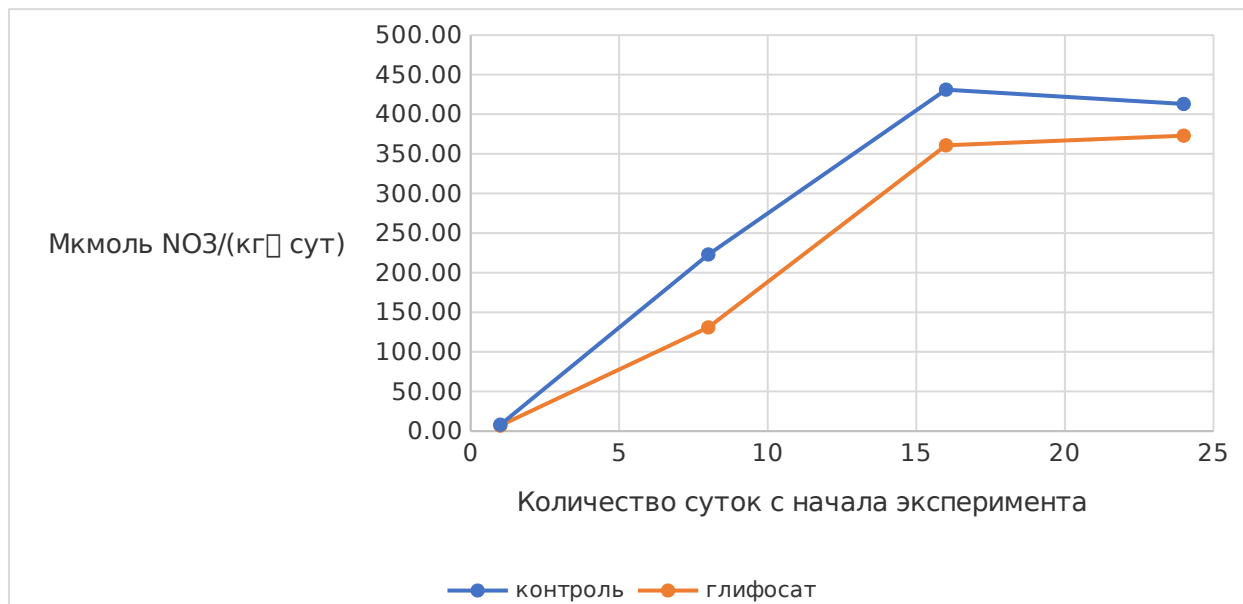


Рисунок 10. Динамика изменения потенциальной нитрифицирующей способности дерново-подзолистой почвы в условиях модельного эксперимента.

Таблица 6. Влияние глифосата на потенциальную нитрифицирующую способность дерново-подзолистой почвы в условиях модельного эксперимента при различном времени инкубирования. Среднее ± стандартное отклонение (n = 3)

Время после внесения глифосата, сут.	Потенциальная нитрификация, мкмоль NO ₃ / (кг×сут)	
	контроль	глифосат
1	8,1±0,9	6,9±0,5
8	223±39	131*±52
15	431±25	361*±31
22	413±43	373±28

* – значимое отличие от контроля

Статистически значимое снижение активности потенциальной нитрификации в присутствии глифосата наблюдали на 8-е (58% от контроля) и 15-е (84% от контроля) сутки. На 22-е сутки снижение потенциальной нитрификации под действием глифосата было статистически незначимым. Отмеченное ингибирование нитрификации в присутствии глифосата противоречит наблюдениям Нивелли с соавторами (Nivelle et al., 2017), продемонстрировавшими стимулирующее влияние гербицида на нитрифицирующую способность. Было показано, что в почве с глифосатом нитрификация составляет до 126% от контрольных значений. По-видимому, наблюдаемое противоречие объясняется низким содержанием фосфора в использованной почве, в этом случае глифосат может служить источником фосфора для микроорганизмов. В нашей работе для проведения эксперимента была использована пахотная почва, характеризующаяся высоким содержанием неорганического фосфора. В этих условиях микроорганизмы, как правило, не используют органический фосфор, так как его утилизация требует энергозатратного синтеза С-Р лиаз.

Полученные данные о том, что при продолжительном инкубировании влияния глифосата на нитрифицирующую активность почвы не обнаруживается, хорошо согласуются с ранее опубликованными результатами других авторов. Так, в сходном эксперименте Гленна с соавторами (Stratton & Stewart, 1991) через 40 дней после внесения глифосата влияния гербицида на нитрифицирующую способность почвы также не было обнаружено. Это может свидетельствовать о

том, что микробное сообщество адаптируется к глифосату на 40 сутки.

Таким образом, наши эксперименты продемонстрировали ингибирующую активность глифосата по отношению к почвенной нитрификации при небольшой продолжительности инкубирования (до двух недель).

3.4 Влияние глифосата на общую численность микроорганизмов

Общая численность микроорганизмов, посчитанная прямым методом люминесцентной микроскопии (рис. 11, табл. 7), показала, что численность бактерий значительно снижается от 1 к 22 суткам как в случае внесения глифосата, так и в контрольном варианте.

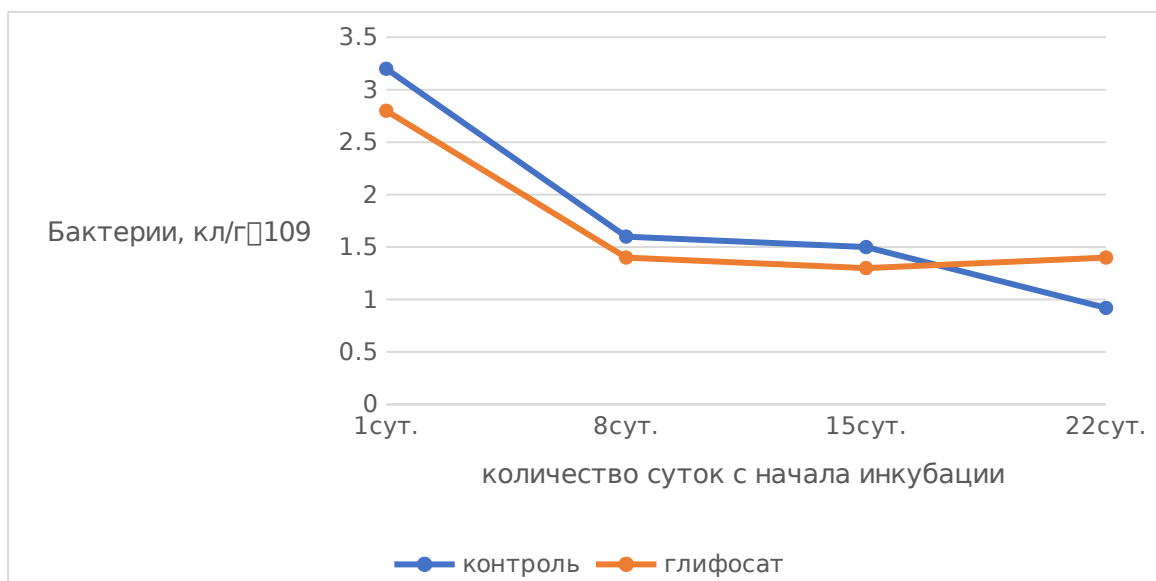


Рисунок 11. Динамика изменения общей численности бактерий в дерново-подзолистой почве, в условиях модельного эксперимента.

Таблица 7. Влияние глифосата на общую численность бактерий дерново-подзолистой почвы в условиях модельного эксперимента при различном времени инкубирования.

Время после внесения	Общая численность
----------------------	-------------------

глифосата, сут.	бактерий, кл./г ×10 ⁹	
	Контроль	Глифосат
1	3,2	2,8*
8	1,6	1,4*
16	1,5	1,3*
22	0,92	1,4*

* значимое отличие от контроля

Как видно из представленных данных, в первые две недели инкубирования почва с глифосатом обладала меньшей численностью бактерий, однако на 22-е сутки в контрольном варианте почв численность сильно снижена по сравнению с глифосатом. Максимальная численность бактерий обнаружена на 1-е сутки. В статье Железовой, (Железова и др. 2018) наблюдается рост прокариотической составляющей микробного сообщества. Различия с нашим экспериментом могут быть связаны с общей биологической активностью почвы, в нашем образце в почве уже произошли необратимые изменения по результатам мультисубстратного тестирования.

3.5 Влияние глифосата на актуальное и потенциальное почвенное дыхание

Данные по влиянию глифосата на дыхание почвы представлены в табл. 8 и 9, а также рисунках 12 и 13.

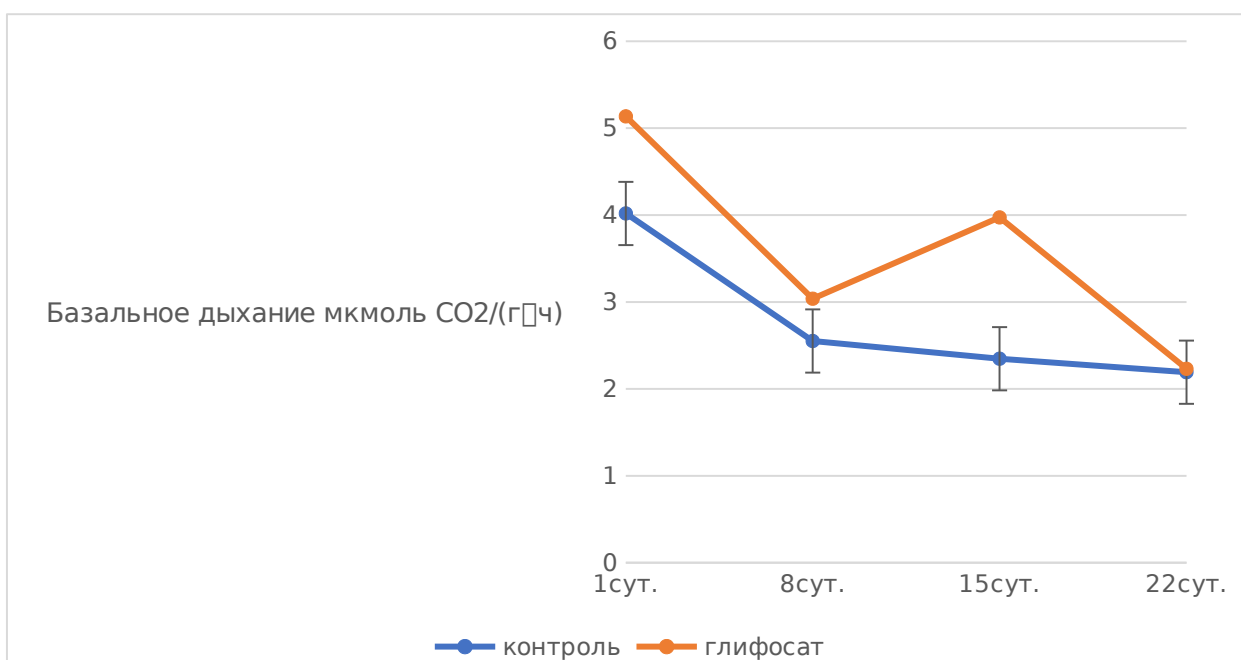


Рисунок 12. Динамика изменения актуального дыхания в дерново-подзолистой почве, в условиях модельного эксперимента. Планки погрешности соответствуют стандартному отклонению (n = 5).

Таблица 8 Влияние глифосата на актуальное дыхание дерново-подзолистой почвы в условиях модельного эксперимента при различном времени инкубирования. Среднее ± стандартное отклонение (n = 5) актуальное дыхание

Время после внесения глифосата, сут.	Контроль	Глифосат
1	4,02±3,76	5,13±10,22
8	2,55±2,02	3,03±1,98
15	2,35±1,95	3,97*±0,97
22	2,19±2,11	2,22*±0,31

* – значимое отличие от контроля

В целом динамика изменения актуального дыхания совпадает с динамикой численности микроорганизмов (рис. 11, табл. 7). Актуальное дыхание постепенно снижалось

в процессе инкубирования: в первые сутки оно составляло 4,01–5,13 мкмоль $\text{CO}_2/(\text{г}\times\text{ч})$, а к 22-м суткам снижалось до 2,19–3,32 мкмоль $\text{CO}_2/(\text{г}\times\text{ч})$. Достоверного отличия между глифосатом и контрольной почвой не наблюдали.

В отличие от базального, субстрат индуцированное дыхание характеризовалось более сложной динамикой (рис. 13, табл. 9).

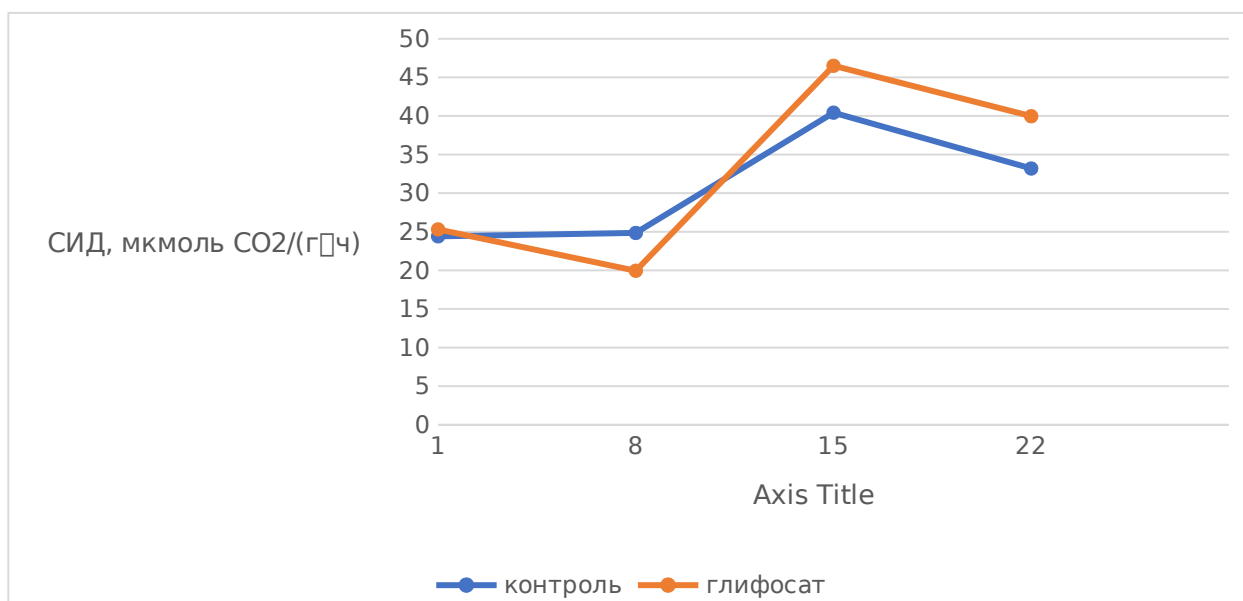


Рисунок 13. Динамика изменения потенциального дыхания в дерново-подзолистой почве, в условиях модельного эксперимента.

Таблица 9. Влияние глифосата на потенциальное дыхание дерново-подзолистой почвы в условиях модельного эксперимента при различном времени инкубирования. Среднее \pm стандартное отклонение ($n = 5$).

Время после внесения глифосата, сут.	Потенциальное дыхание, мкмоль $\text{CO}_2/(\text{г}\times\text{ч})$	
	Контроль	Глифосат
1	24,407 \pm 13,498	25,301 \pm 11,235
8	24,844 \pm 8,242	19,949 \pm 10,

		301
15	40,422±7,949	46,494±17,99
22	33,189±0,168	39,959±16,443

Потенциальное дыхание в почве увеличивалось к 15-м суткам, а к 22-м стабилизировалось. Максимальное значение 46,5 мкмоль CO₂/(г×ч) было зафиксировано на 15-е сутки в почве, подвергшейся обработке глифосатом. В отличие от актуального дыхания, нет изменений во второй пробоотбор.

Аналогичный эксперимент с влиянием глифосата на дыхательную активность поставлен в статье (Железова и др., 2018). В похожем эксперименте инкубация проводилась 40 дней и отличия между глифосатом контрольным вариантом не наблюдались, достоверные различия в поставленном эксперименте не обнаружены

3.6 Изменение концентрации глифосата в почве

Данные по изменению концентрации глифосата на разных периодах инкубации почвы в табл. 10, а также рисунке 14. АМФК не была обнаружена ни в одном из исследованных образцов.

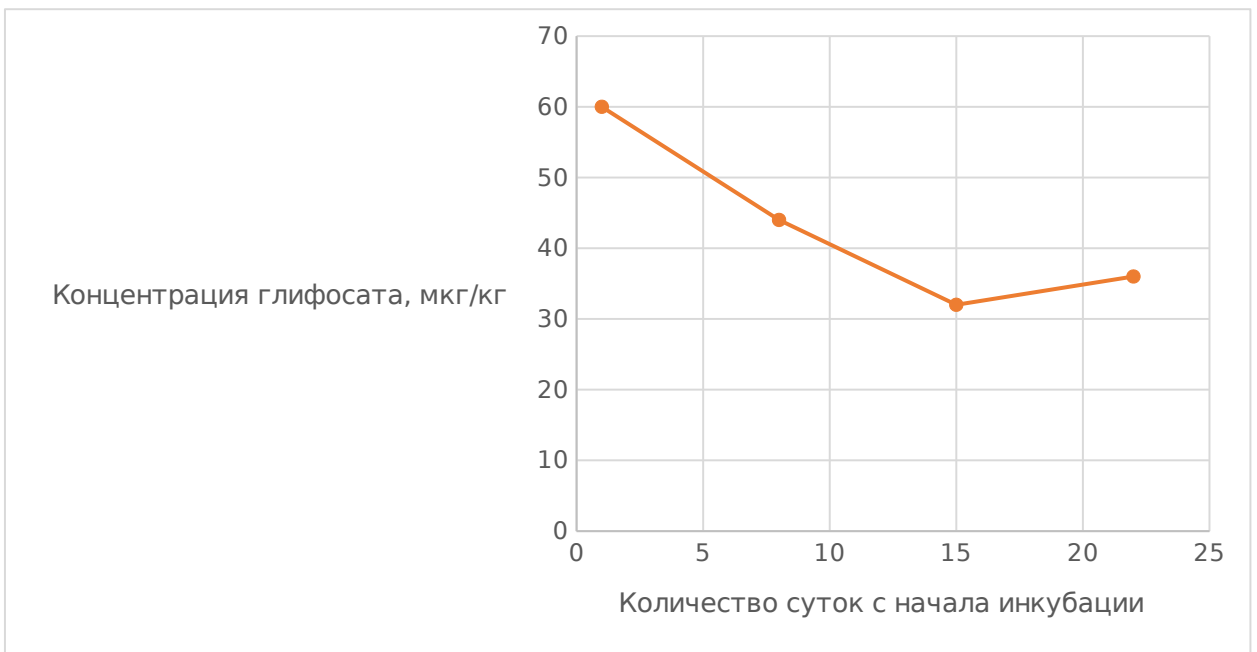


Рисунок 14. Динамика изменения концентрации глифосата в дерново-подзолистой почве, в условиях модельного эксперимента.

Таблица 10. Влияние глифосата на потенциальное дыхание дерново-подзолистой почвы в условиях модельного эксперимента при различном времени инкубирования. Среднее \pm стандартное отклонение (n = 2).

Время после внесения глифосата, сут.	Концентрация глифосата мкг/кг
1	60 \pm 9
8	44 \pm 6,6
15	32 \pm 4,8
22	36 \pm 5,4

Как видно из представленных данных, уже через сутки после внесения гербицида его содержание снизилось с 9,6 мг/кг до 60 мкг/кг. Это объясняется высокой сорбционной способностью почв по отношению к гербициду. Отсутствие АМФК в исследованных образцах может свидетельствовать либо о преимущественном разложении гербицида с расщеплением С-Р связи (саркозиновый путь), либо о том, что содержание этого метаболита было ниже предела обнаружения.

Наблюдаемое последующее дальнейшее снижение концентрации глифосата свидетельствует об использовании микроорганизмами гербицида в качестве субстрата и хорошо согласуется с ранее высказанными предположениями о причинах наблюдаемой стимулирующей активности на денитрифицирующую активность почв.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что глифосат в течение первых двух-трех недель после внесения может оказывать как ингибирующее

(азотфиксирующие и нитрифицирующие микроорганизмы), так и стимулирующее (денитрифицирующие микроорганизмы) влияние в зависимости от группы микроорганизмов. Поэтому далее проводили оценку влияния гербицида на функциональное разнообразие микроорганизмов.

3.7 Влияние глифосата на функциональное разнообразие микроорганизмов

Данные по влиянию глифосата на потребление субстратов микроорганизмами представлены в таблице 12.

Таблица 11. Влияние глифосата на функциональное разнообразие микроорганизмов, представленное результатами МСТ, в дерново-подзолистой почве, в условиях модельного эксперимента при различном времени инкубирования.

Время после внесения глифосата, сут.	d		N		W	
	К	Г	К	Г	К	Г
1	1,32 6	0,71 6	21	25	1206	1529
8	1,45 2	0,99 9	28	28	1326	1212
15	1,48 7	1,50 7	34	28	1273	1051
22	1,17 1	2,12 5	24	35	1276	726

К - контроль, Г - глифосат

Метод МСТ, позволил оценить функциональное разнообразие микроорганизмов, а также охарактеризовать устойчивость к внесению глифосата. Коэффициент d - коэффициент рангового распределения является характеристикой устойчивости микробного сообщества. Он

принимает значения от 0,01 до 2,0 и устойчивость микробного сообщества можно диагностировать по следующим диапазонам:

- 0,01-0,4 – благополучные избыточные системы,
- 0,4-0,6 – устойчивые стабильные системы,
- 0,6-0,8 – системы в угнетенном состоянии (например, при воздействии нарушающего фактора),
- 8-1,0 – системы в кризисном состоянии,
- 1,0-2,0 – необратимо нарушенные системы.

В соответствии с этой оценкой, в первый пробоотбор микробный комплекс почвы без глифосата может считаться необратимо нарушенной, микробиом почвы с глифосатом может быть охарактеризован как микробная система, находящаяся в кризисном состоянии; эта тенденция сохраняется на 8-е сутки инкубации. Очевидно, что такие характеристики объясняются тем, что две первые недели инкубирования в нашем случае происходил процесс «оживления» почвы после ее хранения в воздушно-сухом состоянии.

На 15-е сутки эксперимента показатели стабилизируются и разницы между контрольной почвой и почвой с применением глифосата практически нет; обе системы характеризуются как необратимо нарушенные. На 22-е сутки почва с применением глифосата находится в самом худшем состоянии $d=2,125$, контрольный вариант находится в необратимом состоянии $d=1,171$, значительная разница может свидетельствовать о токсичном действии глифосата. Контрольная почва стабилизировалась к 22 суткам, это говорит о том, что в следствии долгого хранения

почвенные микроорганизмы сильно пострадали и смогли немного восстановиться только на 22-е сутки.

Функциональное биоразнообразие N показывает процент используемых субстратов от общего количества, используемых при проведении МСТ. Чем выше этот показатель, тем большее разнообразие микроорганизмов в почве. Почвы с различным временем инкубации демонстрируют различные показатели числа потребляемых субстратов (N). Через сутки после внесения глифосата микробный комплекс почвы с гербицидом демонстрирует большее функциональное разнообразие, что связано, по-видимому, с активизацией пулов микроорганизмов, способных к утилизации глифосата в качестве субстрата. На 8-е сутки инкубации разнообразие между контролем и глифосатом не различаются, на 15-е сутки почва без глифосата обладает большим разнообразием, на 22-е сутки почва с применением глифосата демонстрирует наибольшее функциональное биоразнообразие по числу потребляемых субстратов. Отмеченная тенденция, по-видимому, иллюстрирует процесс адаптации микробного сообщества почвы к гербициду. Эти данные согласуются с ранее опубликованными результатами (Железова и др. 2018).

Удельная метаболическая работа микробного сообщества W характеризует среднюю интенсивность потребления субстратов. В нашем эксперименте в почве с глифосатом этот показатель постепенно снижается с 1529 на первые сутки эксперимента до 727 на 22-е сутки, что указывает на общее снижение метаболической активности почвенным микроорганизмов. В контрольном варианте

коэффициент W не изменяется со временем. Это может свидетельствовать о сильном влиянии глифосата на скорость потребления почвенного органического вещества различными группами микроорганизмов.

Таким образом, данные МСТ продемонстрировали, что, несмотря на возрастание разнообразия функционального разнообразия микроорганизмов в почве вследствие применения глифосата, влияние гербицида на микробиологическое сообщество в целом можно охарактеризовать как негативное. На это указывает снижение устойчивости микробного сообщества d и удельной метаболической работы микробного сообщества W .

3.7 Влияние глифосата на растения пшеницы

Данные по влиянию глифосата на рост растений пшеницы представлены в табл. 13, 14 и 15.

Таблица 13. Влияние глифосата на длину проростков пшеницы на дерново-подзолистой почве в условиях модельного эксперимента при различном времени инкубирования. Среднее \pm стандартное отклонение ($n = 5$).

Время инкубирования почвы с глифосатом перед посевом, сут.	Длина растений, см	
	Контроль	Глифосат
1 сутки	8 \pm 6	12 \pm 3
8 сутки	13 \pm 3	12 \pm 4
15 сутки	13 \pm 5	15 \pm 3
22 сутки	13 \pm 3	9* \pm 4

* – значимое отличие от контроля

Достоверные изменения присутствовали в размере растений при инкубации на почве, которая инкубировалась в

течении 22-х суток. Длина растений при применении глифосата в этом случае значимо снизилась.

Таблица 14. Влияние глифосата на сырую биомассу пшеницы на дерново-подзолистой почве в условиях модельного эксперимента при различном времени инкубирования. Среднее \pm стандартное отклонение (n = 3)

Время инкубирования почвы с глифосатом перед посевом, сут.	Сырая биомасса 1 растения, г	
	Контроль	Глифосат
1 сутки	0,03 \pm 0,02	0,03 \pm 0,02
8 сутки	0,07 \pm 0,04	0,09 \pm 0,03
15 сутки	0,11 \pm 0,05	0,11 \pm 0,02
22 сутки	0,06 \pm 0,03	0,04 \pm 0,03

* – значимое отличие от контроля

Сырая биомасса растений не имела значимых различий между растениями, выросшими на почве с применением глифосата и на почве без применения глифосата.

Таблица 15 Влияние глифосата на сухую биомассу пшеницы на дерново-подзолистой почве в условиях модельного эксперимента при различном времени инкубирования. Среднее \pm стандартное отклонение (n = 3)

Время инкубирования почвы с глифосатом перед посевом, сут.	Сухая биомасса 1 растения, г	
	Контроль	Глифосат
1 сутки	0,03 \pm 0,01	0,06 \pm 0,02
8 сутки	0,066 \pm 0,001	0,055* \pm 0,006
15 сутки	0,069 \pm 0,004	0,07 \pm 0,02
22 сутки	0,067 \pm 0,004	0,054* \pm 0,004

* – значимое отличие от контроля

Негативное влияние глифосата на биомассу растений было обнаружено в почве, инкубированной 8 суток и 22 суток. Принимая во внимание, что глифосат не является гербицидом почвенного действия, полученный эффект объясняется, скорее всего, негативным влиянием гербицида на биологические свойства почвы, а не его непосредственной активностью по отношению к растениям.

Обобщая полученные данные, можно сказать, что в условиях модельного эксперимента на дерново-подзолистой почве глифосат при рекомендуемых дозах внесения оказывает краткосрочное как ингибирующее (азотфиксирующие и нитрифицирующие микроорганизмы), так и стимулирующее (денитрифицирующие микроорганизмы) воздействие на почвенные микроорганизмы в зависимости от их группы. Через три недели после внесения гербицида значимого влияния на азотфиксацию, денитрификацию, нитрификацию и почвенное дыхание не обнаруживается, что свидетельствует об адаптации почвенного микробного сообщества к гербициду. Тем не менее, данные МСТ указывают на снижение устойчивости микробного сообщества и его удельной метаболической работы, что может приводить к угнетению роста растений пшеницы.

ВЫВОДЫ

1. Через 15 суток после внесения в условиях дерново-подзолистой почвы глифосат снижает скорость актуальной азотфиксации на 13%; при дальнейшем инкубировании негативный эффект гербицида не обнаруживается. Внесение глифосата не оказывает влияния на активность потенциальной азотфиксации.

2. Внесение глифосата в дерново-подзолистую почву приводит к повышению денитрификации через 2 недели в 1,3 раза, а через 3 недели - в 3 раза. Глифосат не влияет на скорость потенциальной денитрификации. Снижение актуальной азотфиксации и значительное увеличение актуальной денитрификации в почве при внесении глифосата может потенциально приводить к газообразным потерям азота в этом варианте опыта.

3. Наиболее выраженное ингибирование нитрифицирующей активности глифосата в дерново-подзолистой почве наблюдается через 8 сут. после внесения гербицида. Для актуальной и потенциальной нитрификации оно составляет 41% и 48% соответственно. Далее ингибирование становится менее выраженным, и через три недели почва варианта с внесением глифосата не отличается от контрольной по этому показателю.

4. Потенциальная и актуальная эмиссия углекислого газа значимо не отличалась между почвой с применением глифосата и без.

5. Установлено снижение общей численности бактерий в контроле в ходе эксперимента; внесение глифосата приводило к снижению численности бактерий в первые 2

недели по сравнению с контролем, но к 22 суткам эксперимента отмечено значительное увеличение этого показателя.

6. Данные мультисубстратного тестирования (МСТ) свидетельствуют, что, несмотря на возрастание функционального разнообразия микроорганизмов в почве вследствие применения глифосата, влияние гербицида на микробное сообщество в целом можно охарактеризовать как негативное. На это указывает снижение устойчивости микробного сообщества d и удельной метаболической работы микробного сообщества W .

7. Глифосат активно сорбируется дерново-подзолистой почвой и уже через сутки после внесения количество обнаруживаемого глифосата не превышает 1% от внесенного. Дальнейшая деградация гербицида наиболее активно протекает в первые две недели после внесения.

8. Внесение глифосата приводит к снижению роста и накопления сухой биомассы растениями пшеницы мягкой в дерново-подзолистой почве при предварительном инкубировании почвы в течение 3 недель, но не оказывает отрицательного влияния на рост растений при меньшей продолжительности инкубирования. По-видимому, наблюдаемый эффект объясняется не непосредственным действием гербицида на растения, а ухудшением в его присутствии биологических свойств почвы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агрономический портал Эксперт агро - <http://www.expert-agro.com>
2. Агрономический портал AgroPages - <http://news.agropages.com>
3. Сайт Свободная энциклопедия Википедия - <https://ru.wikipedia.org/wiki/Глифосат>
4. Агентство по охране окружающей среды США (United States Environmental Protection Agency; EPA) - <https://www.epa.gov/>
5. Поисковая система Web of Science - <http://web-of-science.com>
6. Новостная газета Вести - <https://www.vesti.ru/>
7. Сайт Россельхоз центра - <https://rosselhoccenter.com/>
8. Гербициды, 1990. / Ред. Захаренко В.А. М.: Агропромиздат. 240 с.
9. Голованова, И. Л., Аминов, А. И. 2013. Влияние гербицида Раундап на активность гликозидаз молодых рыб и их кормовых объектов при различных значениях температуры и pH. // Вест. Астраханского гос. Тех. Унив. С.: Рыб. Хоз., т. 1, с. 129-134.
10. Горленко М.В. Методика выполнения измерений интенсивности потребления тест субстратов микробными сообществами почв и почвоподобных объектов фотометрическим методом. / М., 2010.
11. Горленко М.В., Кожевин П.А. Мульти-субстратное тестирование природных микробных сообществ / М., 2005. 88 с.
12. Горленко М.В., Якименко О.С., Голиченков М.В., Костина Н.В., 2012 Функциональное биоразнообразие почвенных микробных сообществ при внесении органических субстратов различной природы // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 17. Почвоведение. № 2. С. 20-27.
13. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешённых к применению на территории Российской Федерации. – Ч. 1. Пестициды. – М., 2020. – Вып. 1(177) – С. 132-137.
14. Железова А.Д., Манучарова Н.А., Горленко М.В., 2018. Структурные и функциональные характеристики

- прокариотного комплекса дерново-подзолистой почвы под воздействием гербицида глифосата // Вестн. Моск. ун-та. сер. 17. Почвоведение. № 2. С. 48-54.
15. Методы почвенной микробиологии и биохимии. 1991. / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: МГУ, 303 с.
 16. Применение гербицидов в интенсивном земледелии, 1988 / Безуглов В.Г. М.: Росагропромиздат. 205 с.
 17. Применение гербицидов и арборицидов в лесовыращивании. Справочник / Шутов И.В., Бельков В.П. и др. М.: Агропромиздат, 1989. 223 с.
 18. Свиридов А.В., Шушкова Т.В., Ермакова И.Т., Иванова Е.В., Эпиктетов Д.О., Леонтьевский А.А. 2015. Микробная деградация гербицида глифосата (обзор) // Прикл. биохим. и микробиол. Т 31, №2, с. 183-190.
 19. Степанов А.Л., Лысак Л.В. 2002 Методы газовой хроматографии в почвенной микробиологии. / М.: МАКС Пресс, 88 с.
 20. Bonny, S., 2008. Genetically modified glyphosate-tolerant soybean in the USA: adoption factors, impacts and prospects. // A review. Agron. Sustain. Dev. V. 28, P. 21-32.
 21. Bott, S., Tesfamariam, T., Kania, A. Angelika K., Birceyudum E., Nergiz A., Volker R. Günter N., 2011. Phytotoxicity of glyphosate soil residues re-mobilised by phosphate fertilisation. // Plant Soil V. 342. P. 249-263.
 22. Bronstad J.O., Friestad H.O., 1985. Behaviour of glyphosate in the aquatic environment // The herbicide glyphosate. Grossbard E. and Atkinson D. (eds.). Butterworths: London, U.K. P. 206
 23. Cao G, Liu Y, Zhang S, Yang X, Chen R, Zhang Y, Lu W, Liu Y, Wang J, Lin M, Wang G. 2012. A novel 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase shows high glyphosate tolerance in Escherichia coli and tobacco plants. // PLoS One. V.;7 e38718.
 24. Catão J. L. and López-Castillo A., 2018. On the degradation pathway of glyphosate and glycine // Environ. Sci. V. 20. P. 1148-1157.
 25. Chen M.X., Cao Z.Y., Jiang Y., Zhu Z.W., 2013. Direct determination of glyphosate and its major metabolite, aminomethylphosphonic acid, in fruits and vegetables by

- mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion-exchange liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. V. 1272. P. 90–99.
26. Cox C., 1998. Glyphosate (Roundup) // *J. Pest Reform* V.18 P. 3-17
 27. Druart C., Delhomme O., de Vaufleury A., Ntcho E., Millet M. 2011. Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. V. 399. P. 1725–1732.
 28. Duke, S. O., 2017. The history and current status of glyphosate // *J. Pest Manag. Sci.* V.74 P. 1027-1034.
 29. Folmar L. C., Sanders H. O., Julin A. M. 1979. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates // *Arch. Environ. Contam. Toxicology*. V. 8. P. 269–278.
 30. Franz J.E., Mao M.K., Sikorski J.A., 1997. Glyphosphate's molecular mode of action. In *Glyphosate: A Unique Global Herbicide* / American Chemical Society, Washington, DC, P. 521–642.
 31. Glass R.L. 1987. Phosphate adsorption by soil and clay minerals // *Journal of Agricultural Food Chemistry*. V. 35(4). P. 497-500.
 32. Glyphosate and AMPA in Drinking-water. — Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality 2005. / WHO. P. 10.
 33. Glyphosate. Herbicide Fact Sheet 2000. / U.S. Department of Energy Bonneville Power Administration. March. P. 11.
 34. Hance R.J. 1976. Adsorption of glyphosate by soil // *Pestic. Sci.* V. 7. P. 363-366.
 35. Jenkins M, Locke M, Reddy K, McChesney DS, Steinriede R., 2018. Glyphosate Applications, Glyphosate Resistant Corn, and Tillage on Nitrification Rates and Distribution of Nitrifying Microbial Communities//*J. Soil Sci Soc Am J.* V. 81 P. 1371–1380.
 36. Jenkins, M.B., Locke, M.A., Reddy, K.N., McChesney, D.S. and Steinriede, R.W., 2017. Impact of glyphosate-resistant corn, glyphosate applications and tillage on soil

- nutrient ratios, exoenzyme activities and nutrient acquisition ratios. *Pest. Manag. Sci.*, V. 73 P. 78-86.
37. Kyaw K.M., Toyota K., 2007. Suppression of nitrous oxide production by the herbicides glyphosate and propanil in soils supplied with organic matter//*J. Soil. Sci. Plant. Nutr* V. 53 P. 441-447.
 38. Lund-Hoie K., Friestad H.O., 1986. Photodegradation of the herbicide glyphosate in water // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* V. 36. P. 723-729.
 39. Milošević NA., Govedarica MM., 2002. Effect of herbicides on microbiological properties of soil. // *Proc. for Natur. Sci.* V.102. P. 5-21.
 40. Milosevic, N.; Govedarica, M., 2002. Effect of herbicides on microbiological properties of soil // *Matica Srp. Proc. Nat. Sci.*, V. 102 P. 5-21.
 41. Müller, M.M., Rosenberg, C., Siltanen, H., Wartiovaara, 1981. Fate of glyphosate and its influence on nitrogen-cycling in two finnish agriculture soils // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* V. 27, P. 724-730.
 42. Nardi S., Pizzeghello D., Gessa C., Ferrarese L., Trainotti L., Casadoro G. 2000. A low molecular weight humic fraction on nitrate uptake and protein synthesis in maize seedlings // *Soil Biology & Biochemistry* V. 32. P. 415-419.
 43. Nivelles E., Verzeaux J., Chabot A., Roger D., Spicher F., Lacoux J., Nava-Saucedo JE., Catterou M., Tétu T., 2017. Does nitrogen fertilization history affects short-term microbial responses and chemical properties of soils submitted to different glyphosate concentrations // *J. PLoS One* V. 12 e0178342.
 44. Nomura N.S., Hilton H.W. 1977. The adsorption and degradation of glyphosate in five Hawaiian sugarcane soils// *We. Res.* V. 17. P 113-121.
 45. Ravanel P., Liegeois M.H., Chevallier D., Tissut M. 1999. Soil thinlayer chromatography and pesticide mobility through soil microstructures: New technical approach. // *J. of chromatography* V. 864. P. 145-154.
 46. Rose, M. T., Ng, E. L., Weng, Z., Wood, R., Rose, T. J., and Van Zwieten, L. 2018. Minor effects of herbicides on microbial activity in agricultural soils are detected by N-

- transformation but not enzyme activity assays. // *Eur. J. Soil Biol.* V.87, P. 72-79.
47. Siehl DL 1997. Inhibitors of EPSPS synthase, glutamine synthetase and histidine synthesis. In: Roe RM, Burton JD, Kuhr RJ (eds) // *Herb. Acti. toxicolgy, bio. and mole bio.* IOS Press, Amsterdam, P. 37-67.
 48. Stratton G.W., Stewart K.E., 1991. Effects of the herbicide glyphosate on nitrogen cycling in an acid forest soil. // *Water, Air & Soil Pollut.* V. 60. P. 231- 247.
 49. Stratton G.W., Stewart K.E., 1992. Glyphosate effects on microbial biomass in a coniferous forest soil // *J. Environ Toxicol Water Qual* V.7. P.223-236.
 50. Tate T. M., Spurlock J. O., Christian F. A. 1997. Effect of Glyphosate on the Development of *Pseudosuccinea columella* Snails // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* V. 33, N 3. P. 286-289.
 51. Tsui M. T. K., Chu L. M. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors // *Chemosphere.* V. 52, N 7. P. 1189-1197.
 52. Tu, Mandy; Hurd, Callie; Randall, John M.; and The Nature Conservancy, 2001. *Weed Control Methods Handbook: Tools & Techniques for Use in Natural Areas / All U.S. Government Documents (Utah Regional Depository).* Paper 533.
 53. Van Bruggen, A. H. C., He, M.M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., Morris J.R., 2018. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. // *Sci. Total Environ.*V.102, P. 616-617, 255-268.