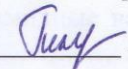


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Медико-профилактический факультет с отделением биологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ
Заведующий кафедры
фундаментальной и
прикладной микробиологии

К. М. Н.,

И.А.Гимранова  2023 г.

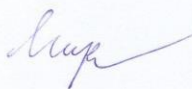
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА МАГИСТРАНТА

На тему: «РАЗРАБОТКА ЭТАПА БИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕКУЛЬТИВАЦИИ
ЗЕМЛИ С ПРЕВЫШЕНИЕ ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫХ
КОНЦЕНТРАЦИЙ ФЕНОЛА И ХЛОРФЕНОЛА»

Направление 06.04.01 Биология



Научный руководитель
д. б. н., профессор
Ан. Х. Баймиев



Автор работы
студент группы
МБ-201 Н. К. Миронов

Уфа 2023

Оглавление

Актуальность исследования.....	3-5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6

1.1. Сельскохозяйственные культуры и влияние на их урожайность сорняков.....	6-10
1.2. Гербициды: виды, механизмы действия.....	10-17
1.3. Использование полезных микроорганизмов в сельском хозяйстве.....	17-21
1.4. Гербицидустойчивые бактерии и перспективы их использования.....	21-32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	32
2.1 Объекты исследования, бактериальные штаммы и плазмидные векторы.....	32-33
2.2 Среды и условия культивирования	33
2.3 Методы исследований.....	33
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	35
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	43
ВЫВОДЫ.....	45
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	47

Актуальность исследования

Развитие современного сельского хозяйства сопровождается широким использованием гербицидов для борьбы с сорняками и увеличения урожайности. Однако, такой подход к ведению сельского хозяйства может привести к накоплению вредных остатков в почве и воде, что может повредить ее качество и уменьшить урожайность. Современные технологии,

включая биологические методы исследований, позволяют разработать и реализовать меры по борьбе с негативными последствиями применения химических веществ в земледелии.

Одной из наиболее актуальных задач является оценка устойчивости перспективных для сельского хозяйства штаммов бактерий к действию химических компонентов, образующихся при разложении гербицидов, в частности к фенолу и хлорфенолу. Фенол и хлорфенол - это высокотоксичные соединения, которые могут находиться в почве и переходить в растительный материал и животных, вызывая у них болезни, недоразвитость и смерть.

Одним из решений данной проблемы является разработка этапа биологической рекультивации почвы с превышением предельно допустимых концентраций фенола и хлорфенола. Биорекультивация - это процесс восстановления земель, загрязненных химическими веществами, к природному состоянию. Биорекультивация основана на использовании живых организмов, которые способны разлагать и уничтожать вредные компоненты в почве. Бактерии являются основными участниками биорекультивации почвы и поэтому оценка их устойчивости к действию различных химических соединений является важной задачей.

Среди штаммов бактерий, которые выступают в роли биорекультиваторов могут быть отобраны те, которые обладают способностью выделять определенные ферменты, которые могут ускорить процесс разложения вредных веществ. Также отбор перспективных бактериальных штаммов связан с анализом их свойств и характеристик, изучением механизмов их действия на токсичные соединения и прочими аспектами.

Все вышеупомянутые задачи осуществляются в рамках данной темы, с целью:

- Проведения подробного и всестороннего анализа свойств и характеристик бактериальных штаммов, имеющих перспективу использования в сельском хозяйстве.
- Оценки устойчивости штаммов к действию ряда химических соединений (фенол и т.д.).
- Определения минимальной ингибирующей концентрации оцениваемых веществ.

Разработка этапа биологической рекультивации почвы с превышением предельно допустимых концентраций фенола и хлорфенола имеет несколько основных преимуществ:

- снижение уровня загрязнения почвы и воды за счет быстрого разложения и уничтожения вредных веществ бактериальными штаммами. Таким образом, почва становится более продуктивной, что способствует росту растений и повышению урожайности;
- снижение расходов на борьбу с сорняками и увеличения урожайности за счет исключения применения химических средств;

- увеличение устойчивости окружающей среды, что способствует сохранению биологического разнообразия и повышению качества жизни людей.

Проведение исследований по данной теме имеет актуальность не только для сельского хозяйства, но и для других отраслей промышленности, а также для здоровья человека. Оценка устойчивости бактериальных штаммов к действию химических компонентов имеет большое значение для создания биорекультивационных средств для всех видов загрязнения среды. В результате проведения таких исследований будут разработаны практические методы биологической рекультивации земли, которые будут применяться как в сельском хозяйстве, так и в других отраслях промышленности, и будут способствовать улучшению экологической ситуации в регионах, где используются гербициды и другие химические вещества.

В заключение, разработка этапа биологической рекультивации земли с превышением предельно допустимых концентраций фенола и хлорфенола имеет большое значение для экологии и здоровья человека. Она позволяет снизить уровень загрязнения почвы и воды, а также сократить использование химических веществ и увеличить урожайность. Проведение исследований по данной теме является актуальной задачей для улучшения экологической ситуации в регионах, которые сталкиваются с проблемой загрязнения почвы различными химическими веществами. Именно разработка практических методов биологической рекультивации земли, позволит сократить проблемы экологии и стать одним из приоритетных направлений развития современного сельского хозяйства.

Цель исследования. Оценка устойчивости перспективных для сельского хозяйства штаммов бактерий к действию компонентов, образующихся при разложении гербицидов.

Задачи исследования.

1. Охарактеризовать взятые в анализ бактериальные штаммы, имеющие перспективу для использования в сельском хозяйстве
2. Подобрать состав питательных сред для культивирования бактериальных культур.
3. Оценить устойчивость штаммов к действию фенола
4. Оценить минимальную ингибирующую концентрацию оцениваемых веществ на рост исследуемых микроорганизмов.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Сельскохозяйственные культуры и влияние на их урожайность сорняков

Сорные растения являются главными конкурентами сельскохозяйственных культур в борьбе за свет, влагу, питательные вещества и тепло. Присутствие сорняков приводит к снижению урожайности зерна, овощных и кормовых культур на 20-30% и 38-40%, соответственно, а также к снижению содержания белка в зерне на 2–3%, клейковины — на 7%, сахаров в сахарной свекле — на 2,5–3,0%. Нужно отметить, что на полях с высоким уровнем засоренности урожайность может снижаться в 1,5-2,0 раза [68, 94]. Вмешательство сорняков в выращивание сои в Северной Америке с 2007 по 2013 год привело к потере урожая в среднем на 52,1%, что составляет около 17,2 млрд долларов США в год [46]; у кукурузы это привело к потере урожая на 52%, что равнялось 28 миллиардам долларов США ежегодно [47]. Было подсчитано, что сорняки на пастбищных угодьях ежегодно наносят ущерб в размере 2 млрд долларов США за счет снижения урожайности и качества кормов, создания помех для выпаса скота, отравления животных, увеличения затрат на содержание и производство скота и снижения стоимости земли [48]. Средняя потеря урожая сухих бобов из-за неконтролируемых сорняков составляет 71,4% в Северной Америке, что представляет собой экономический ущерб в размере 722 млн долларов США в год [12].

Сорняки способствуют иссушению корнеобитаемого слоя почвы, поскольку выносят питательные вещества, поступающие с удобрениями, и осложняют уборку урожая, увеличивая затраты на очистку и сушку зерна. Сорные растения участвуют в распространении болезней и вредителей сельскохозяйственных культур. Сильно засорённые участки являются местом обитания для грызунов, которые могут распространять семена на другие территории. В полевых условиях сорняки встречаются с определенными культурами, к жизненному циклу которых они лучше приспособлены. Для сорных растений характерен быстрый рост и термоустойчивость, поскольку они менее требовательны к условиям климата, в отличие от культурных растений. В большинстве случаев сорные сообщества состоят из генетически более разнородных популяций, которые не так поражаются вредителями и болезнями, как селекционные сорта культурных растений.

Анализ потенциальной засоренности пахотного слоя почвы в степных сельскохозяйственных районах показал, что запасы семян сорняков в нем достигают 1,1–1,9 млрд шт./га и в течение вегетационного периода при благоприятных условиях с посевного слоя почвы на 1 м² поля способны прорасти 2,5–3,0 тыс. шт. растений сорняков [71, 75, 76, 77, 78].

Виды сорных растений находятся во многих семействах, но более двух третей их в умеренной зоне относятся к 8-11 семействам, а именно: астровым или сложноцветным (Asteraceae Dumort. или Compositae Giseke), бобовым или мотыльковым (Fabaceae Lindl. или Papilionaceae Giseke), гвоздичным (Caryophyllaceae Juss.), гречишным (Polygonaceae Juss.), губоцветным (Lamiaceae Lindl.), маревым (Chenopodiaceae Vent.), капустным или крестоцветным (Brassicaceae Burnett или Cruciferae Juss.), лютиковым (Ranunculaceae Juss.), мятликовым или злаковым (Poaceae (R. Br.) Barnhart или Gramineae Juss.), норичниковым (Scrophulariaceae Juss.), сельдерейным или зонтичным (Apiaceae Lindl. или Umbelliferae Juss.).

Сорные растения, относящиеся к разным семействам, обладают сходными признаками, например, особенности размножения, способы питания, продолжительность жизни, время появления всходов, требования к состоянию почвы, потребности к факторам жизни и элементами минерального питания.

Стоит отметить, что отношение сорных растений к количеству азота в почве неоднозначно. К нитрофильным сорнякам на всех почвах относятся, например, марь белая (*Chenopodium album* L.), пастушья сумка (*Capsella bursa-pastoris* L.), подмаренник цепкий (*Galium aparine* L.), горец почечуйный (*Polygonum persicaria* L.), крестовник обыкновенный (*Senecio vulgaris* L.), звездчатка средняя (*Stellaria media* L.).

Нитрофильные виды на плодородных почвах - дымянкa аптечная (*Fumaria officinalis* L.), осот овощной (*Sonchus oleraceus* L.), осот шероховатый (*Sonchus asper* L.), ярутка полевая (*Thlaspi arvense* L.), лебеда обыкновенная (*Atriplex patula* L.), яснотка пурпурная (*Lamium purpureum* L.) и яснотка стеблеобъемлющая (*Lamium amplexicaule* L.).

На почвах с внесенным навозом распространены щирица запрокинутая (*Amaranthus retroflexus* L.), пролесник однолетний (*Mercurialis annua* L.), щетинник зеленый (*Setaria viridis* L.), крапива жгучая (*Urtica urens* L.), галинсога мелколистная (*Galinsoga parviflora* Cav.), просо куриное (*Echinochloa crusgalli* L.) и паслен черный (*Solanum niger* L.) [81].

1.1.1. Методы борьбы с сорными растениями

Проблема борьбы с сорняками, всегда стоявшая перед земледельцами, в последние годы в России ещё более обострилась. В современных условиях потенциальные потери урожая от сорных растений выше, чем суммарные потери от болезней и вредителей [90, 93]. Претерпевает изменения видовой состав сорняков. Возрастает засорённость злостными и трудноискоренимыми видами: осотом, бодяком, пыреем и другими [63, 66, 67]. Наличие

сорной растительности в посевах усложняет проведение всех сельскохозяйственных работ, начиная с обработки почвы и заканчивая уборкой. Поэтому борьба с засоренностью полей — является одной из главных задач в земледелии [57].

В агрономической практике для организации эффективной борьбы с сорной растительностью важно знать их биологические особенности, поведение по отношению к культурным растениям, а также степень вредного действия на агроценоз.

Для определения доминирующих видов сорняков важно учитывать климатические условия региона распространения и технологию возделывания той или иной сельскохозяйственной культуры.

Основным современным методом борьбы с сорной растительностью является комплексное использование системных приемов, направленных на обработку почвы. В суммарном противосорняковом эффекте удельная масса ее достигает 60%, допосевной — 30%, послепосевной — 10% [92].

Считается, что применение мелкой или безотвальной почвозащитной системы обработки почвы вызывает резкое увеличение засоренности полей и изменение видового состава сорняков в сторону увеличения доли многолетних сорняков [79, 82, 83]. Другие исследователи напротив считают, что при безотвальной или мелкой обработке почвы семена сорняков консервируются в глубоких слоях почвы и теряют жизнеспособность, создавая условия для очистки почвы от семян сорняков [69, 70, 86]. Однако большинство этих выводов базируется на основе кратковременных опытов с одной культурой или звеном севооборота, что не дает четкого представления о засоренности посевов за счет систем основной обработки почвы в севообороте. В то же время ряд исследователей склоняются к мнению, что при обработке плоскорезными и комбинированными орудиями запасы семян сорняков располагаются в верхнем слое почвы, всходы которых при активной борьбе с ними легко уничтожить и в последующем засоренность посевов снижается [64, 89].

Эффективная борьба с сорняками возможна лишь при правильном использовании системы взаимосвязанных приемов на основе интегрированного комплекса организационных, предупредительных, агротехнических и химических мероприятий [73, 88]. Из агротехнических средств, в снижении численности сорных растений до безвредного уровня решающая роль принадлежит, прежде всего, обработке почвы.

Начиная с 1950-х годов в мировом и отечественном сельскохозяйственном производстве широкое применение получил химический метод борьбы с двудольными сорняками, а именно использование гербицидов.

Существующая противоречивость в оценке эффективности различных способов основной обработки почвы, наблюдающаяся при анализе литературных источников, свидетельствует, что их использование не может быть повсеместным, независимым от типа почвы, предшественников, условий погоды, возделываемой культуры, характера предыдущей обработки почвы, наличия той или иной техники, удобрений, гербицидов. Вышеизложенное, показывает актуальность данной проблемы и обуславливает необходимость дальнейшего изучения и совершенствования как отдельных приёмов, снижающих засорённость посевов, так и их сочетаний, и систем, с учётом общих тенденций развития систем земледелия [74].

1.2. Гербициды: виды, механизмы действия

Гербициды – весьма обширный класс соединений, задача которых не допустить возможность развития растений определенного вида.

По форме взаимодействия с растениями они подразделяются на две группы:

- 1) неизбирательного (сплошного) действия, то есть действующие на все растения, которые оказались на обработанной территории;
- 2) селективного (избирательного) действия, то есть уничтожающие только определённые виды растений.

Современное сельское хозяйство в значительной степени зависит от гербицидов для борьбы с сорняками и получения максимальной урожайности сельскохозяйственных культур. Эти соединения обладают экономическими преимуществами для поддержания растущего населения земного шара.

По данным Американского общества борьбы с сорняками, гербициды были классифицированы на 29 различных классов в зависимости от механизма действия. Способы применения гербицидов обычно включают внесение (на лист), почвенное нанесение (при контакте с почвой), контакт со всей площадью и точечное (контакт с определенной площадью). Обычно используемые гербициды включают: клодинафоп пропаргил (CF), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-D), атразин, метолахлор, диурон, глифосат (GP), имазапир, пендиметалин и паракват (PQ).

Применение гербицидов предполагает, что через некоторое время, после уничтожения нежелательной растительности, препарат самопроизвольно разрушится, а продукты его разложения будут безвредны, а иногда и полезны. Однако, в большинстве случаев, гербициды

являются трудно разложимыми соединениями, у которых по назначению используется только от 4 – 5 % внесённого вещества, а остальная масса сохраняется в почве, переходя из неё в другие системы (траву, природные источники воды), создавая экологические проблемы [65, 84, 91]. Продолжительность сохранности гербицида в почве зависит от разных факторов:

1) состава гербицида, по которому они подразделяются на малостойкие, сохраняющиеся в почве до 12 недель; среднестойкие, сохраняющиеся в почве до 18 месяцев, и устойчивые, сохраняющиеся в почве 2 года и более;

2) характера почвы, её структуры, влажности, кислотности [65, 80, 85].

На территории Российской Федерации в свободной продаже находятся гербициды, основным компонентом которых является глифосфат («Ураган», «Торнадо»), используемый для борьбы с однолетними и многолетними сорняками. Стойкость глифосата может изменяться в широких пределах, достоверной информации о времени сохранения препарата в почве нет. В зависимости от типа почвы, периоды полураспада указываются в широких пределах: от 3 до 140 дней [72, 87].

1.2.1. Клодинафоп пропаргил

Клодинафоп пропаргил, CF (проп-2-инил (R)-2-[(5-хлор-3-фтор-2-пиридилокси) фенокси]пропаноат) - арилоксифеноксипропионатный гербицид, используемый для послевсходовой борьбы с однолетними травами в зерновых культурах. Широкое использование CF привело к выбросу больших количеств этого соединения в окружающую среду, которые в конечном итоге достигают биосферы. CF поглощается листьями и быстро переносится в точки роста листьев и стеблей, что препятствует выработке жирных кислот, необходимых для роста растений у восприимчивых травянистых сорняков. CF действует на фермент ацетилкоэнзим-А-карбоксилазу, необходимый для биосинтеза липидов.

Исследования, посвященные экотоксичности этого гербицида, ограничены, что может быть связано с его низкой стойкостью и периодом полураспада в почве, который, как сообщается, составляет 5 дней, в зависимости от типа почвы и pH [43]. Однако немногие исследования продемонстрировали, что CF и его производные токсичны и канцерогенны для человека и других живых организмов [21, 28].

1.2.2. 2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота

2,4-D - является одним из наиболее широко используемых в мире хлорированных кислых феноксигербицидов и является аналогом гормона роста ауксина. 2,4-D был впервые синтезирован и зарегистрирован для использования в Соединенных Штатах в 1941 году. На протяжении последних десятилетий он обеспечивал экономичную, избирательную и эффективную борьбу с широколиственными сорняками на пастбищах и в лесах. Гербицид используется как в сельском хозяйстве, так и внутри страны для послевсходовой борьбы с широколиственными сорняками. В растениях 2,4-D функционирует путем поддержания высокого уровня растительного гормона ауксина, что приводит к чрезмерной стимуляции роста растений и, в конечном счете, к гибели. 2,4-D также индуцирует выработку этилена и, следовательно, действует как дефолиант. 2,4-D легко усваивается листьями и корнями, а затем распределяется по всем частям растения, однако точный механизм, с помощью которого этот гербицид воздействует на клетки, до конца не изучен. Сообщалось, что 2,4-D является пролифератором пероксисом, и особенно в растительных клетках гербицид индуцирует митотические и мейотические нарушения как *in vivo*, так и *in vitro* [20, 32]. Период полураспада 2,4-D составляет от 20 до 200 дней. Вайнтрауб и соавторы (1954) сообщили об относительно длительной персистенции соединения в растениях фасоли, проведя эксперименты с C14-меченым 2,4-D в тканях покоящихся растений [58].

2,4-D классифицирован ВОЗ как гормональный гербицид II уровня токсичности. Воздействие на людей может происходить при вдыхании, контакте с кожей или проглатывании. 2,4-D легко адсорбируется в организме человека из пищеварительного тракта и кожи, впоследствии выводится с мочой практически в неизмененном виде. Соединение было обнаружено в желудке, крови, головном мозге и почках четырехдневных новорожденных крыс, подвергшиеся воздействию 2,4-D [7, 51]. Было показано, что 2,4-D оказывает канцерогенное, нейротоксическое, иммуносупрессивное, цитотоксическое и гепатотоксическое действие как на животных, так и на человека. В клетках млекопитающих 2,4-D ингибирует рост клеток и синтез белка, воздействуя на ДНК [20].

1.2.3. Атразин

Атразин, [2-хлор-4-(этиламино)-6-(изопропиламино)-s-триазин] – селективный гербицид, относящийся к семейству стриaziнов. Атразин обладает высокой подвижностью в почве и ввиду широкомасштабного применения часто обнаруживается в поверхностных и подземных водах в концентрациях, значительно превышающих допустимые пределы [44]. Растворимость

в воде (33 мг/л при 20 °C) и низкий коэффициент сорбционного разделения почвы ($K_d \approx 3,7$ л/кг) являются ключевыми факторами, влияющими на потенциальное загрязнение грунтовых вод гербицидом, поскольку он обычно просачивается в грунтовые воды или реки путем инфильтрации [45]. Атразин ингибирует фотосинтез и связанное с ним нециклическое фотофосфорилирование у высших растений [41]. Все высшие растения, вероятно, метаболизируют атразин путем N-деалкилирования, а некоторые виды, такие как кукуруза и пшеница, которые содержат бензоксаинон, также используют гидроксилирование.

Основной мишенью атразина у людей и животных является эндокринная система. Одно из исследований показало присутствие ^{14}C -меченого атразина в почве спустя 22 года после последнего внесения, что доказывает относительно высокую токсичность гербицида [26]. Атразин является канцерогеном, который поражает центральную нервную систему, репродуктивную, иммунную и сердечно-сосудистую системы. Из-за высокой токсичности, биоремедиация загрязненных атразином почвы и воды необходима, и ей уделяется много внимания во всем мире [44].

1.2.4. Метолахлор

Метолахлор, (2-хлор-N-(2-этил-6-метилфенил)-N-(метоксипроп-2-ил)ацетамид) - селективный хлорацетамидный гербицид, используемый для борьбы с широколиственными и однолетними злаковыми сорняками в кукурузе (*Zea mays* L.), сое (*Glycine max* L. Merr.), арахисе (*Arachis hypogaea* L.) и картофеле (*Solanum tuberosum* L.) [52]. На сельскохозяйственных полях в Соединенных Штатах, особенно на Среднем Западе, где выращивается большая часть кукурузы и сои применяются большие количества метолахлора (22 млн кг).

Метолахлор относится к химическому семейству хлорацетанилидных гербицидов. Гербицид всасывается через корни и побеги, действует как ингибитор роста и подавляет синтез хлорофилла, белков, жирных кислот и липидов, изопреноидов (включая гиббереллины) и флавоноидов (включая антоцианы).

Исследования показали, что метолахлор влияет на рост клеток, а его низкие уровни вызывают цитотоксические эффекты в лимфоцитах наряду со значительным снижением митотического индекса. Исследования с клетками HepG2 (иммortalизованной линией клеток печени человека) подвергнутыми воздействию метолахлора в течение 24 ч, показали на 21% меньшее количество клеток по сравнению с необработанными контрольными клетками [44].

1.2.5. Диурон

Диурон, (3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина) – гербицид широкого спектра действия, используемый для борьбы с сорняками на сельскохозяйственных культурах и незасеянных территориях [6, 50]. К незасеянным участкам относятся: участки вдоль линий ограждения, трубопроводов, линий электропередач, железнодорожных линий, дорог, пешеходных дорожек; на лесозаготовительных и складских площадках, а также вокруг коммерческих, промышленных и фермерских зданий, электрических подстанций и резервуаров для хранения нефтепродуктов. Диурон используется в декоративных прудах, фонтанах и аквариумах для уничтожения водных растений, а также в качестве средства от плесени в красках. Диурон часто используется либо отдельно, либо в комбинации с другими гербицидами, такими как бромацил, гексазион, PQ, тиadiaзурон, имазапир, мононатрий, хлорат натрия, метаборат натрия и сульфат меди.

Диурон считается токсичным для водных организмов. Группой ученых выявлено, что LC50 (48 ч) значения диурона в рыбе варьируются от 4,3 до 42 мг/л, от 1 до 2,5 мг/л для водных беспозвоночных организмов. Остатки диурона были обнаружены в молоке, жировом теле, мышцах, печени и почках коров, которых кормили очень низкими дозами диурона в их рационе [44].

1.2.6. Имазапир

Имазапир [2-(4,5-дигидро-4-метил-4-(1-метилэтил)-5-оксо-1H-имидазол-2-ил)-3-пиридинкарбоновая кислота] - неселективный системный гербицид широкого спектра действия, используемый для борьбы с однолетними и многолетними травами, широколиственными, осоковыми сорняками, различными кустарниками и лиственными деревьями. Впервые он был зарегистрирован в Соединенных Штатах в 1984 году. Имазапир поглощается листьями и корнями, переносится в ксилему и флоэму, а затем в меристематические области, где он накапливается и вызывает нарушение синтеза ДНК и белка, препятствуя росту клеток. Результатом воздействия является отмирание новых листьев. Имазапир выпускается в двух формах: слабая кислота и соль изопропиламина (49%-ный водный раствор), хотя коммерческие продукты представляют собой почти исключительно форму соли изопропиламин. Период полураспада гербицида составляет 17 месяцев.

Имазапир считается нетоксичным для животных, однако он раздражает глаза и может вызвать сыпь, покраснение и отек в месте воздействия [44].

1.2.7. Пендиметалин

Пендиметалин, (N-(1-этилпропил)-3,4-диметил-2,6-динитробензененамин, динитроанилиновый гербицид) - является как допосевным, так и ранним послевсходовым гербицидом, используемым для борьбы с большинством однолетних трав и многими однолетними широколиственными сорняками на полях сельскохозяйственных культур. Пендиметалин был впервые зарегистрирован в качестве пестицида в Соединенных Штатах в 1972 году. Пендиметалин относительно долго сохраняется в почве из-за иммобилизации с низким потенциалом выщелачивания или из-за гидрофобной природы. В анаэробной почве он разлагается быстрее, чем в аэробных условиях [34]. Способ действия гербицида заключается в ингибировании митотического деления клеток в развивающихся корневых системах. USEPA классифицировало пендиметалин как стойкий токсичный для биоаккумуляции гербицид, который обладает низкой острой токсичностью, но вызывает фолликулярно-клеточную аденому щитовидной железы. Пендиметалин очень токсичен для рыб и водных беспозвоночных [44].

1.2.8. Паракват

Паракват, PQ (1,1-диметил-4,4-бипиридиний) - гербицид с четвертичным азотом, широко используемый для борьбы с широколиственными сорняками. Это неселективное соединение, которое разрушает зеленые ткани растений при контакте, нарушая фотосинтез и разрывая клеточные мембраны, что приводит к быстрому высыханию листьев.

PQ токсичен для живых организмов, включая людей, поскольку он легко всасывается практически всеми путями, включая желудочно-кишечный тракт, кожу, слизистые оболочки и легкие [23]. В исследованиях токсичности с использованием лабораторных животных было показано, что PQ высокотоксичен при вдыхании и отнесен к I категории токсичности. Болдуин с соавторами изучали токсичность PQ и сообщили, что PQ вызывает ухудшение состояния легких [2].

1.3. Использование полезных микроорганизмов в сельском хозяйстве

По прогнозам, к 2050 году население мира увеличится почти до 10 миллиардов человек [14, 15, 24]; следовательно, спрос на продовольствие возрастет. Различные прогнозы показывают, что для того, чтобы накормить это население мира, потребуется увеличить общее производство продуктов питания на 25–70 процентов в период до 2050 года [15] — некоторые авторы доходят до 100% [53]. Для производства такого количества продовольственных и других непродовольственных сельскохозяйственных товаров необходимо интенсифицировать и расширять сельскохозяйственное производство. Эта практика привела ко многим экологическим проблемам, таким как деградация природных ресурсов, таких как почва и вода, утрата разнообразия микробиома, распространение новых фитопатогенов, вредителей и сорняков, а также снижение плодородия агроэкосистемы и изменение климата [8, 25, 53]. Увеличение сельскохозяйственного производства без вреда окружающей среде и/или здоровью человека, по-прежнему остается серьезной проблемой.

Устойчивая интенсификация сельскохозяйственного производства необходима для удовлетворения спроса на продовольствие при сохранении функционирующих и здоровых экосистем. В настоящее время биотехнологические инструменты используются в дополнение к традиционному управлению растениеводством; среди них все большее значение в этом вопросе приобретает использование биопрепаратов, содержащих полезные микроорганизмы, также известных как микробные инокулянты или биоинокулянты [33, 40]. Fortune Business Insights опубликовала отчет, в котором говорится, что объем мирового рынка сельскохозяйственных биоинокулянтов в 2019 г. составил 4,27 млрд долл. США, а к 2027 г., по прогнозам, достигнет 11,81 млрд долл. США с годовым темпом роста 14,27% [16]. Биоинокулянты — это экологически безопасные и устойчивые биопродукты, содержащие полезные микроорганизмы, которые при нанесении на семена, поверхности растений или почву способны стимулировать рост растений, увеличивая поступление или доступность питательных веществ для растения-хозяина или защищая их от биотических и/или абиотических стрессов [11, 30, 40]. Полезные микроорганизмы, используемые в биоинокулянтах, можно разделить на микроорганизмы, стимулирующие рост растений (PGPM), или агенты биологической борьбы (BCA) [35] (рис.1).

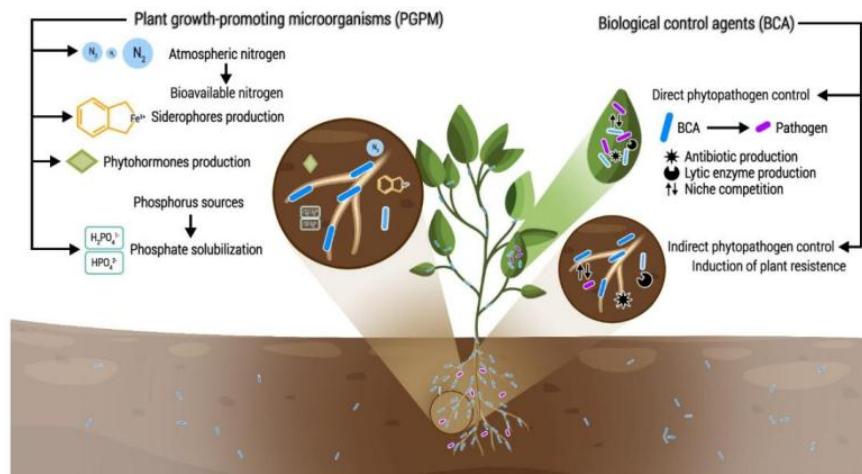


Рис. 1. Примеры механизмов действия полезных микроорганизмов при взаимодействии с растениями [35]

По механизму действия их также можно классифицировать как азотфиксаторы, солибилизаторы фосфатов, фитостимуляторы, индукторы устойчивости растений и антагонисты фитопатогенов. Наиболее изученными ризобактериями являются *Aminobacter*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Gluconoacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Rhiseudobacillus*, *Serratia*, *Sphingomonas* и *Xanthomonas*. Однако чаще всего для приготовления биоудобрений используются бактерии *Azospirillum*, *Bacillus* и *Pseudomonas*, а также некоторые эндоэктомикоризные грибы, такие как *Gigaspora margarita*, *Pisolithus tinctorius* и *Scleroderma citrinum* [1, 29, 36, 38].

PGPR для улучшения приспособленности растений-хозяев могут действовать двумя способами - прямо или косвенно (рис. 2). К числу прямых механизмов относятся те, которые способствуют росту растений, в том числе, производство гормонов, таких как ауксины, цитокинины и гиббереллины, а также фиксация азота и солибилизация фосфора. Косвенные механизмы связаны с ингибированием функции одного или нескольких фитопатогенов [3]. Этими основными механизмами являются продукция антибиотиков, ферментов, разрушающих клеточную стенку, ингибирование кворума патогенов, индуцированная системная резистентность и секвестрация железа бактериальными сидерофорами.

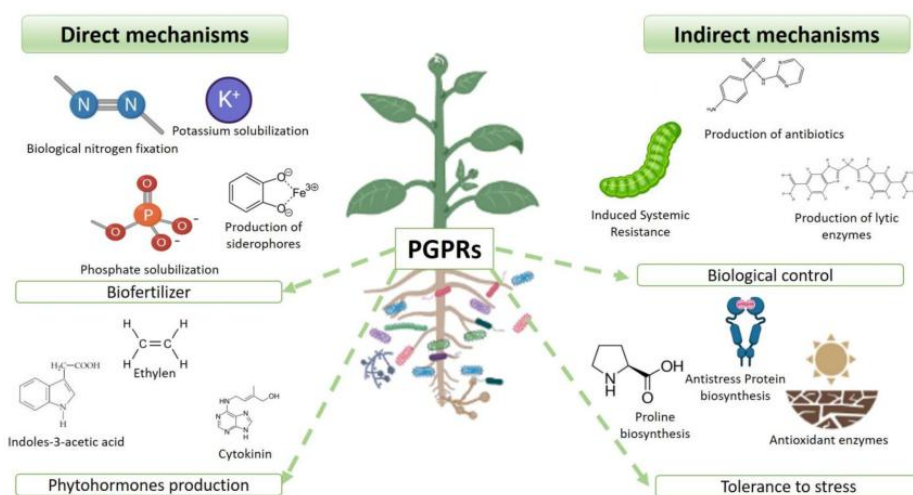


Рис. 2. Прямые и косвенные механизмы PGPR [19]

Производство ауксинов является одним из наиболее часто упоминаемых способов стимулирования роста растений: было обнаружено, что 80% микроорганизмов, колонизирующих ризосферу, могут продуцировать этот метаболит. На протяжении десятилетий сообщалось об

увеличении количества корневых волосков и боковых корней, а также об уменьшении длины корней при инокуляции растений PGPR.

Азот является одним из наиболее важных макроэлементов для роста растений. Содержание азота в атмосфере составляет около 78%, и растения не могут его усваивать. Было идентифицировано много PGPR, которые могут осуществлять биологическую фиксацию азота свободно или в симбиотических ассоциациях с бобовыми. Некоторыми примерами симбиотических азотфиксаторов являются *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia* и *Herbaspirillum* [36, 54]. Цианобактерии (например, *Nostoc* и *Anabaena*), *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Herbaspirillum* и *Pseudomonas* могут быть свободноживущими азотфиксаторами или вступать в ассоциации с растениями в качестве эндофитов [4, 10].

Многие работы, связанные с PGPR, были опубликованы за более чем 50 лет, кроме того, появились различные компании, производящие биологические препараты и прикладные исследования с использованием PGPR показали увеличение урожайности. Однако влияние применения PGPR на урожайность различных культур было различным; в некоторых случаях при использовании бактерий в сочетании с арбускулярными микоризными грибами было обнаружено увеличение длины корня, повышение урожайности зерна.

Знание о взаимодействии растений и микробов с использованием молекулярных инструментов может помочь улучшить эти взаимодействия и сделать растения устойчивыми к изменениям окружающей среды из-за глобального потепления. Изучение микробного разнообразия, связанного с дикими родственниками сельскохозяйственных культур, также является альтернативой для обнаружения PGPR с лучшими фитостимулирующими характеристиками. С другой стороны, секвенирование генома PGPR позволяет идентифицировать факторы вирулентности, чтобы гарантировать, что они не представляют угрозы для здоровья человека или окружающей среды в результате их высвобождения [19].

Использование взаимодействий полезных микроорганизмов с растениями в растениеводстве является перспективным решением проблем сельскохозяйственного производства. Однако применение биоинокулянтов тесно связано с научными исследованиями и агробiotехнологическими инновациями в данной области.

1.4. Гербицидустойчивые бактерии и перспективы их использования

Гербициды остаются наиболее эффективным и экономичным способом борьбы с сорняками, и их рынок продолжает расти, несмотря на обилие универсальных препаратов. Увеличение масштабов применения гербицидов во всем мире привело к серьезному загрязнению окружающей среды. В настоящее время разрабатываются стратегии для очистки этих веществ экономичным и экологичным способами.

Выведение устойчивых к гербицидам растений также привело к неожиданному повышению устойчивости сорняков, что побуждает фермеров использовать более широкий ассортимент и большее количество гербицидов для борьбы с ними. Введение растений, устойчивых к гербицидам, сначала снизило использование гербицидов, но впоследствии увеличило их применение [9].

Сообщается, что большинство гербицидов составляют от 40 до 60% пестицидов, используемых в сельскохозяйственных целях.

Чрезмерное использование гербицидов может стать серьезной угрозой для окружающей среды. Повышенное содержание гербицидов в корнеобитаемых слоях почвы и воде [27], может привести к снижению разнообразия видов, уничтожению почвенных денитрифицирующих бактерий и грибов [49]. Экологическая судьба гербицидов – это вопрос, вызывающий озабоченность в последнее время, при условии, что лишь небольшая часть химических веществ достигает целевых организмов [37], что приводит к серьезному

воздействию остаточных гербицидов в почве и воде на здоровье людей, животных и сельскохозяйственных культур. Основным источником загрязнения гербицидами, скорее всего, является их неконтролируемое использование на фермах. Химические свойства, количественное содержание определяют токсичность гербицидов и период полураспада в окружающей среде. Их взаимодействие с целевыми и нецелевыми организмами нанесло значительный ущерб экосистеме [43].

1.4.1. Биodeградация клодинафоп пропаргила

Деградация CF аэробными бактериями связана с активностью фермента эстеразы, под действием которого образуются фенолы (рис. 3) [43]. Хоу с соавторами впервые описали штамм микроорганизмов *Rhodococcus* sp. T1, который способен использовать CF в качестве источника энергии [22]. Они сообщили о деградации CF на 97,9% без идентификации его метаболитов.

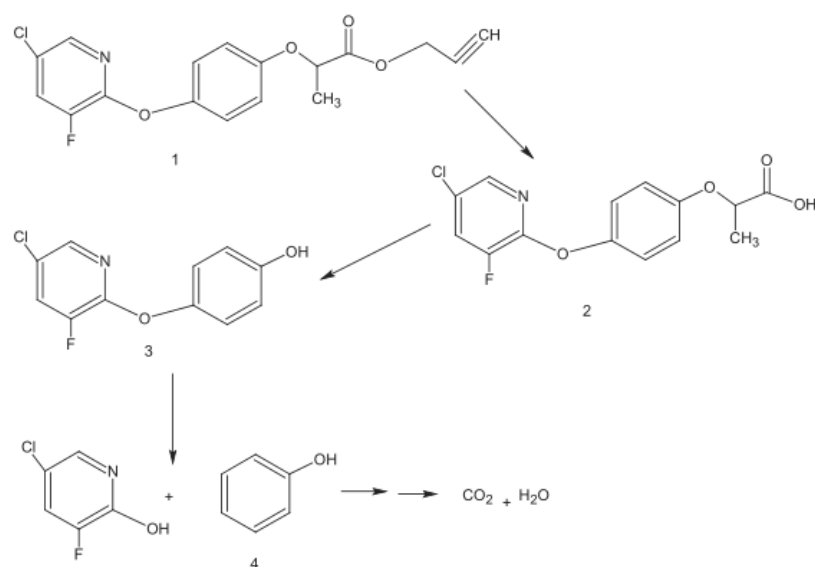


Рис. 3. Деградация CF бактериями: 1 – CF; 2 - клодинафоповая кислота; 3 - 4-(4-хлоро-2-фторфенокси)-фенол; 4 – фенол [44]

Сингх с соавторами выделили штамм *Pseudomonas* sp. B2 из почвы посевного поля и обнаружили, что 87,14% CF деградировало по сравнению с исходными 80 мг/л. Два метаболита - клодинафоповая кислота и 4-(4-хлоро-2-фторфенокси)-фенол обнаруживаются в течение 9 ч после инкубации [43]. Помимо описанных исследований, никаких других отчетов о биodeградации CF не имеется, что может быть связано с его низкой стойкостью и периодом полураспада в почве.

1.4.2. Биodeградация 2,4-Дихлорфеноксиуксусной кислоты

Было описано несколько штаммов бактерий, которые способны использовать 2,4-D в качестве единственного источника углерода и энергии [32]. Наиболее часто упоминаемыми 2,4-D деградирующими родами являются *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Delftia*, *Arthrobacter* и *Burkholderia*. Деградация 2,4-D осуществляется путем окислительного расщепления эфирной связи с последующими реакциями гидроксилирования хлорфенола и модифицированного пути орто-расщепления хлоркатехинов (рис. 4).

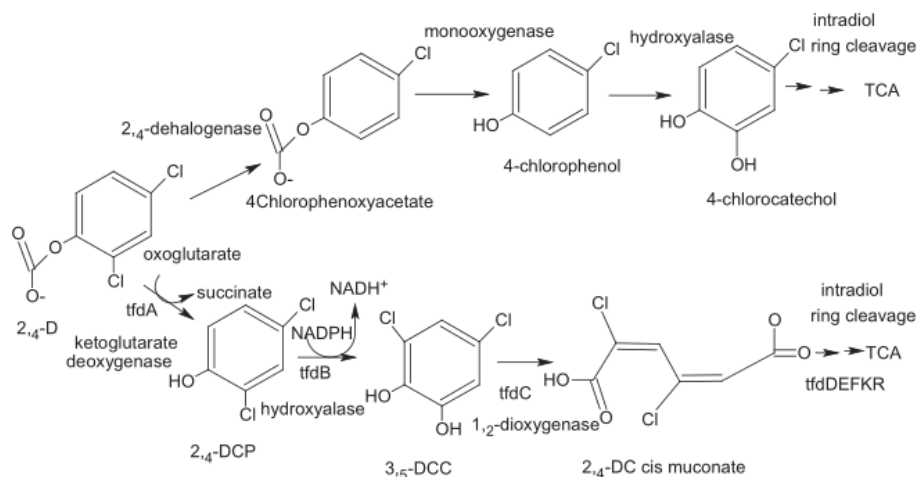


Рис. 4. Деградация 2,4-D микроорганизмами: 2,4-DCP (2,4-дихлорфенол), 3,5-DCC (3,5-дихлоркатехин) [44]

Электронные эффекты, пространственная ориентация и гидрофобный эффект групп-заместителей оказывают очевидное влияние на путь их деградации. Эванс с соавторами выделили два штамма *Pseudomonas* sp., способных разлагать 2,4-D, а также предложили путь биodeградации 2,4-D [13]. Об участии плазмиды в деградации 2,4-D впервые сообщили Фишер и соавторы. (1978). Стоит отметить, что способность к деградации 2,4-D кодируется 58-мегатонной конъюгированной плазмидой rJP1. Гены, кодирующие деградацию 2,4-D, часто расположены на конъюгативных плаزمидях, rEMT1 и rJP4, но было обнаружено, что они также хромосомно расположены у *Burkholderia* spp [44].

1.4.3. Биodeградация атразина

Основой биodeградации атразина в почве является микробная диссоциация. Выделены микроорганизмы с различной разложения атразина и характеристиками роста. Одной из хорошо известных бактерий, разлагающих атразин, является штамм *Pseudomonas* sp. ADP,

который может разлагать атразин до NH_3 и CO_2 с помощью некоторых ферментов, кодируемых шестью генами *atzABCDEF* [45]. Другим наиболее хорошо охарактеризованным штаммом является *Arthrobacter aurescens* TC-1, метаболический путь которого отличается от штамма ADP *Pseudomonas* sp. Штамм может метаболизировать атразин до циануровой кислоты при участии ферментов, кодируемых *TrzN*, *AtzB* и *AtzC* (рис. 5).

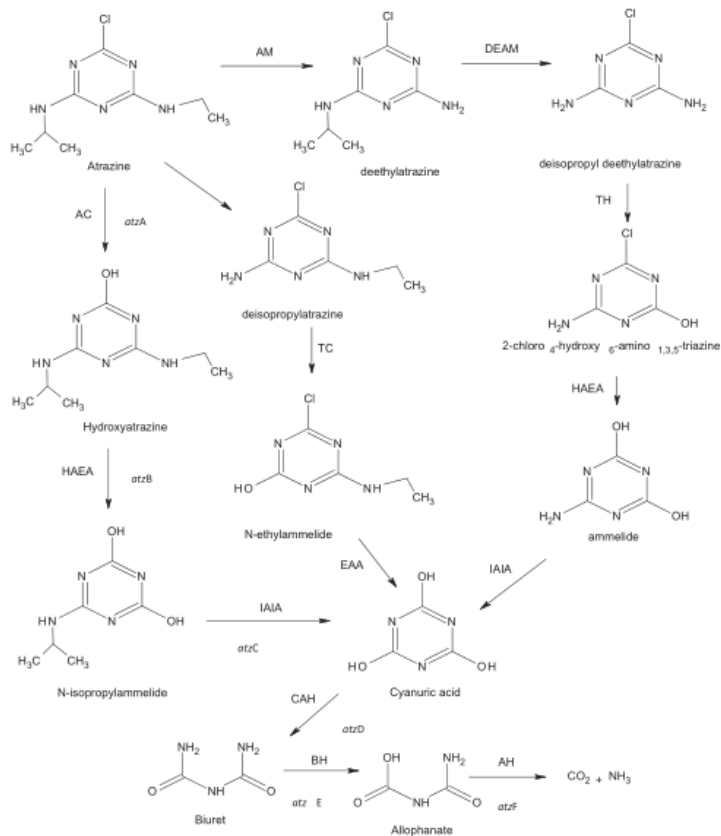


Рис. 5. Биодegradация атразина вместе с генами и ферментами, участвующими в путях деградации [44]

Кроме того, некоторые исследователи сообщили о гибридных путях, включающих комбинации генов *trzDN* или *atzABCDEF*, обнаруженных в штаммах или консорциумах, разрушающих атразин. На сегодняшний день известными генами, кодирующими ферменты для гидролиза атразина, являются *atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE*, *atzF*, *trzD* и *trzN*. Хотя эти гены обладают своей собственной субстратной специфичностью и содержатся в различных бактериях, разлагающих атразин, выделенные гены, как правило, высококонсервативны и переносятся плазмидой. Кроме того, связываясь с транспозоном, некоторые из генов могут широко распространяться между бактериями независимо от их родов. Это может позволить большому количеству микробов или консорциумов мобилизовать атразин и задействовать некоторые новые катаболические пути. Дегradация атразина происходит преимущественно в результате биологических процессов, включая N-деалкилирование, дехлорирование. Биодegradация атразина может быть инициирована N-деалкилированием боковых цепей этила

или изопропила с образованием деэтилатразина (DEA) или деизопропилатразина (DIA). Имеются сведения, что дехлорирование является ранней стадией метаболизма атразина. У некоторых микроорганизмов было получено полное биodeградирование атразина до NH_3 и CO_2 . Сообщается о деградации атразина отдельными штаммами, такими как *Pseudomonas* sp. [31], *Rhodococcus rhodochrous*, *Acinetobacter* spp., *Agrobacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Deinococcus* sp. и *Delftia acidovorans* [55], а также видовыми консорциумами, включающими *Agrobacterium tumefaciens*, *Caulobacter* и *Pseudomonas* sp. В настоящее время ADP является наиболее известной и лучше всего охарактеризованной бактерией, разлагающей атразин [56]. Однако микроорганизмы рода *Arthrobacter*, известные своей способностью разлагать атразин, были выделены из сельскохозяйственных и сильно загрязненных почв на местах разливов и промышленных сточных вод с заводов по производству атразина [62]. Бактерии, разлагающие атразин, обычно инициируют разложение посредством гидролитического дехлорирования, катализируемого ферментом атразинхлоргидролазой (AtzA), кодируемым геном *atzA*, за которым следуют две реакции гидролитического дезаминирования, катализируемые гидроксидатразинэтиламиногидролазой (AtzB) и N-изопропиламмелидизопропиламиногидролазой (AtzC), кодируемые генами *atzB* (*trzB*) и *atzC* (*trzC*) соответственно. Данные ферменты последовательно превращают атразин в циануровую кислоту, которая затем полностью минерализуется до CO_2 и NH_3 другими тремя гидролазами. У некоторых штаммов бактерий биodeградация атразина инициируется путем N-деалкилирования боковых этильных и изопропильных цепей до DEA и DIA [44].

1.4.4. Биodeградация метолахлора

Основное расщепление метолахлора в почве происходит как аэробными, так и анаэробными микроорганизмами. Превращение почвенными микроорганизмами метолахлора в его первичные продукты разложения: метолахлорэтансульфоновую кислоту (ESA) и метолахлороксаниловой кислоты (OA), происходит в результате смещения атома хлора исходного соединения глутатионом (рис. 6).

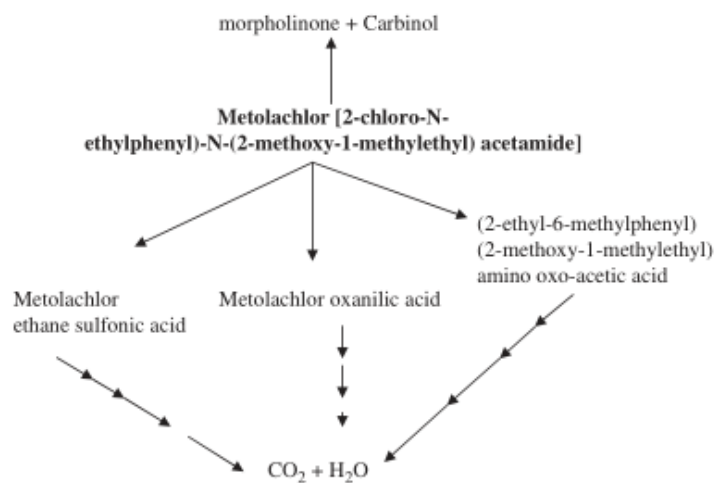


Рис. 6. Биodeградация метолахлора [44]

Разложение метолахлора в почве происходит главным образом путем микробиологического разложения [59] и фотодиссоциацией. На скорость микробной деградации влияют глубина почвы, концентрация органического углерода и растворенного кислорода, температура и размер микробных популяций. Фотодиссоциация происходит только тогда, когда метолахлор присутствует на поверхности почвы.

1.4.5. Биodeградация диурона

Диурон подвергается разложению почвенными микроорганизмами, а также обогащенными культурами водных микроорганизмов [17]. Группой ученых была изучена микробиологическая деградация диурона и экотоксикология. Количественные анализы биodeградации были проведены со штаммами грибов, которые показали, что диурон разлагался, но не полностью [5]. Была проведена серия тестов разложения диурона для выбора наиболее эффективного штамма грибов. Только четыре штамма грибов были способны трансформировать диурон в определенной степени (до 50%) после семи дней инкубации: *Beauveria bassiana*, *Caenorhabditis elegans*, *Phanerochaete chrysosporium* и *Mordellistena isabellina*. Разложение диурона штаммами грибов привело к образованию двух метаболитов, полученных в различных пропорциях в зависимости от микроорганизма. У штаммов грибов деградация диурона приводила к образованию деметилированных продуктов.

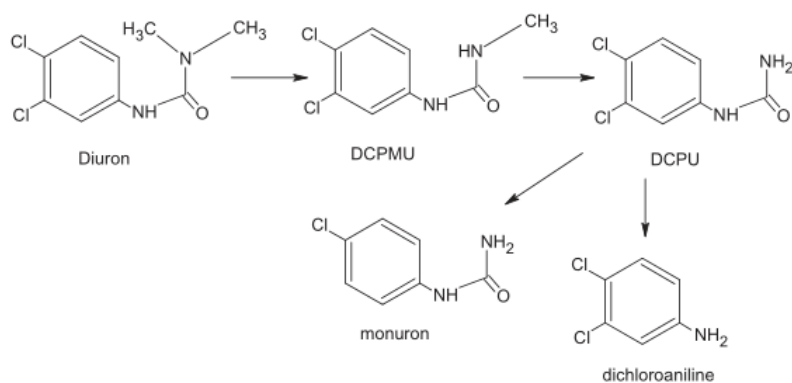


Рис. 7. Биodeградация диурина: DCPU - 1-(3,4-дихлорфенил) мочевины, DCPMU - 3-(3,4-дихлорфенил)-1-метилмочевина [44]

Далтон с соавторами сообщили, что удаление N-метильных групп устраняет гербицидную активность диурина. За разложением следует удаление группы мочевины, что приводит к образованию 3,4-дихлоранилина, аммиака и CO_2 (рис. 7) [44].

1.4.6. Биodeградация имазапира

Биodeградацию имазапира осуществляет штамм *Streptomyces* sp. PSI/5 (рис. 8.).

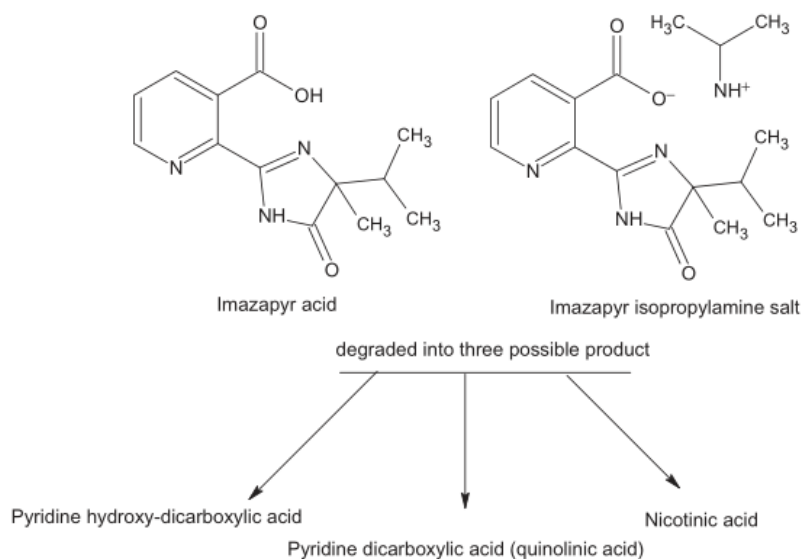


Рис. 8. Биodeградация имазапира [44]

Авторами были выделены из почвы два вида бактерий, *Pseudomonas* и *Bacillus*, которые были способны разлагать имазапир [60]. Авторы обнаружили, что скорость разложения составляет более 70% при концентрации 50 или 100 частей на миллион первоначально добавленного имазапира в культуру после 48 ч инкубации [44].

1.4.7. Биodeградация пендиметалина

Несколько исследователей сообщили о биодegradации пендиметалина в почве как в аэробных, так и в анаэробных условиях с участием бактерий и грибов в различных типах почв [61]. Были идентифицированы четыре метаболита: N-(1-этилпропил)-3,4-дикарбокси 2,6-динитробензенамин-N-оксид, N-(1-этилпропил)-3,4-диметокси-2,6-динитробензенамин и бенезимадазол-7-карбоксиальдегид (рис. 9).

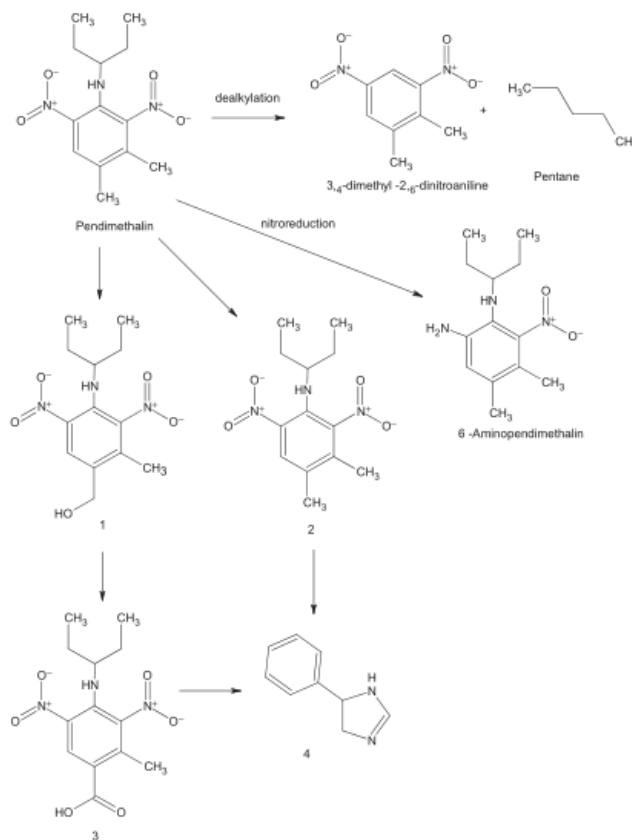


Рис. 9. Биодegradация пендиметалина [44]

Задействованные реакции представляли собой моногидролиз 2-метильных групп с последующим дигидролизом. Дальнейшее окисление аминогруппы и гидроксирование пропильных групп приводили к образованию вышеупомянутых метаболитов.

1.4.8. Биодegradация PQ

PQ считается токсичным для почвенных грибов и бактерий, вызывающим сокращение их популяции [39]. Установлен спектр бактерий и грибов, способных разлагать гербицид, например, *Corynebacterium fascians* Dows, *Lipomyces starkeyi* Loo и Rij, *Aspergillus niger* van Teigh, *Penicillium frequentans* West, *Fusarium* sp и *Pseudomonas* sp, однако в большинстве случаев было показано, что дegradация PQ чрезвычайно изменчива (рис. 10).

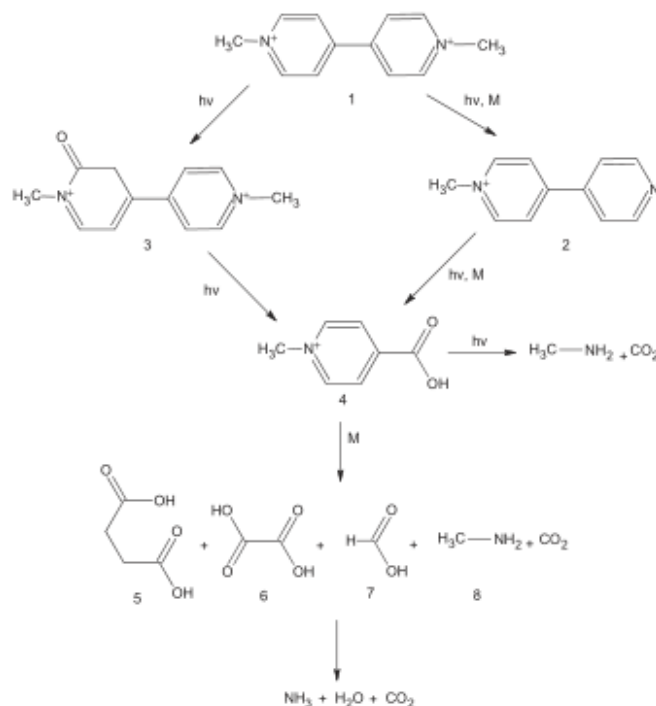


Рис. 10. Биodeградация параквата *L. starkeyi*, *Corynebacterium fascians*, *Aspergillus niger*, *Penicillium frequentans*, *Fusarium* sp, *Pseudomonas* sp. [44]

Сообщается о наличии только одного продукта деградации, отличного от CO_2 - N-метилбетаина изоникотиновой кислоты [18].

Из-за чрезмерного использования гербицидов экосистемы находятся под угрозой их загрязнения. Микроорганизмы являются основным средством восстановления гербицидов, и новые открытия, такие как новые пути биodeградации, многовидовые взаимодействия и реакции на уровне сообщества на добавление гербицидов, помогают понять, предсказать и контролировать судьбу гербицидов. Геномные, транскриптомные и мутантные исследования, проведенные с определенными совместными культурами, дают новую информацию о том, как микроорганизмы взаимодействуют и получают энергетическую выгоду за счет различных механизмов межвидового переноса электронов. Несмотря на это, существует множество проблем, связанных с неоднородностью этих экосистем и структуры гербицидов. Например, растет осведомленность о токсичности гербицидов, которые трудно разлагаются. Метаболизм микроорганизмов представляет собой процесс преобразования энергии и регулируется ферментативными механизмами, в которых промежуточные продукты реакции играют жизненно важную роль.

Поиск микроорганизмов, участвующих биodeградации гербицидов или продуцентов ферментов или ферментных систем, катализирующих данный процесс, может стать перспективным направлением. Необходима программа скрининга таких организмов и ферментов, но потребуются более универсальные единые стандарты для оценки их

способности к разложению. Текущие исследования дают понимание того, как эволюция беспорядочных ферментов и рекрутирование ферментов, доступных из метагенома, позволяет собирать пути биodeградации. Тем не менее, физико-химические ограничения, включая биодоступность и структурные вариации подобных химических веществ, ограничивают эволюцию путей биodeградации.

Фиторемедиация в сочетании с ризосферными микроорганизмами может обеспечить дешевый, быстрый, экологически чистый и эффективный процесс ризоремедиации для удаления взрывоопасных отходов из верхних слоев почвы [42]. Необходимо изучить внедрение передовых технологий, таких как протеомика и биоинформатика, чтобы получить больше знаний о ферментативных механизмах и промежуточных звеньях, участвующих в метаболической активности во время биodeградации.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования, бактериальные штаммы и плазмидные векторы

Объектами исследования в данной работе служили штаммы бактерий

из коллекции ИБГ УФИЦ РАН: *Pseudomonas putida*-36DCP, 2T *Cellulosimicrobium cellulans*. и один микроорганизм из коллекции компании ООО «ЭкоХимТех»: *Microbacterium algeriense* –B13.

Для испытания были использованы следующие химические вещества: димексид ДМСО без разведения, 2,4 D [2, 4-Дихлорфеноксиуксусная кислота], гербицид изопропиламинная соль и водный раствор фенола. Химические вещества были разведены в десятикратных концентрациях, начиная от 1 до 10 000. Концентрации химических веществ были выбраны исходя из предыдущих исследований ингибирующего действия этих веществ на микроорганизмы.

2.2. Среда и условия культивирования

Для выращивания культур бактерий рода *Pseudomonas*, *Cellulosimicrobium* и *Microbacterium* использовали следующую среду:

состав среды LB: 1% бактотриптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl, 1,5 % бактериологический агар;

Культивирование бактерий на агаризованных средах в чашках Петри осуществляли в термостате при температуре +34...+36 °C.

Для культивирования в жидкости используют среду LB без добавления бактериологического агара.

2.3. Методы исследований

Среды и условия культивирования

Для выращивания культур бактерий рода *Pseudomonas*, *Cellulosimicrobium* и *Microbacterium* использовали следующую среду: состав среды LB (Luria-Bertani): 1% бактотриптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl, 1,5 % бактериологический агар.

Культивирование бактерий на агаризованных средах в чашках Петри осуществляли в термостате при температуре +34...+36 °C.

Для культивирования в жидкости используют среду LB без добавления бактериологического агара.

2.3.2 Оценка устойчивости штаммов к действию химических соединений:

Исследование проводилось на основе сравнительного анализа роста бактериальных культур на среде, содержащей различные концентрации химических соединений: димексид ДМСО без разведения, 2,4 D[2, 4-Дихлорфеноксиуксусная кислота], гербицид изопропиламинная соль и фенол в разведениях от 1 до 10,000. Для этого были приготовлены соответствующие питательные среды с наличием каждого химического соединения.

Каждый штамм был инкубирован на соответствующей питательной среде, содержащей одно из химических соединений в различных концентрациях.

Контрольные пробы без добавления химических соединений были взяты для каждого бактериального штамма для сравнения результатов.

2.3.3 Оценка минимальной ингибирующей концентрации:

Для определения минимальной ингибирующей концентрации использовался метод диск-диффузии, где диск диаметром 6 мм, на который была нанесена определенная культура бактерий, помещался на питательную среду, содержащую одно из испытуемых химических соединений разной концентрации. Для каждого штамма использовались диски, на которые было нанесено 10 мкл культуры. Контрольные пробы без добавления химических соединений были взяты для каждого бактериального штамма.

Результаты были оценены визуально по наличию зоны ингибирования на поверхности агара вокруг диска.

Все эксперименты были проведены трижды с дубликатами и результаты статистически обработаны.

2.3.4 Статистическая обработка данных:

Для оценки статистической значимости полученных результатов была использована программа Microsoft Excel. Для каждой концентрации химического вещества был произведен подсчет количества чашек с наличием/отсутствием зоны ингибирования. Затем была произведена дихотомическая классификация данных, где чашки с наличием зоны ингибирования были отнесены к группе "ингибирование", а чашки без зоны ингибирования - к группе "нет ингибирования".

Таким образом, было оценено влияние различных концентраций химических веществ на микроорганизмы, что может помочь определить возможность использования данных штаммов в этапе биорекультивации загрязненных объектов.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фенол и хлорфенол накапливаются в полях сельхоз назначения в основном из-за применения гербицидов, поскольку данные соединения являются компонентами разложения данного рода препаратов. Наличие продуктов неполного распада гербицидов вредят не только самим растениям, но и также микроорганизмам, находящимся во взаимодействии с ними. Одним из этапов рекультивации почв содержащих высокие концентрации неразложившихся гербицидов или продуктов их неполного распада является использование устойчивых к их действию микроорганизмов в качестве агентов, улучшающих урожайность растений, поскольку разложение этих ксенобиотиков происходит именно за счет микробиологической активности почв. В связи с этим нами были получены (у кого-то) три штамма бактерий, для которых была показана ростостимулирующая активность. С целью выявления их таксономической принадлежности нами были проведены массспектрометрические и молекулярно-генетические анализы образцов. Так были проведены анализы штаммов 36ДСР-1 и 2Т-3 на массспектрометре и с точностью 99,9% было выявлено, что штамм 2Т-3 относится к виду *Cellulosimicrobium cellulans*, а штамм 36ДСР-1 – к *Pseudomonas putida*.

Детали обзора VITEK® MS

Отсроченный обзор VITEK® MS > Детали обзора VITEK® MS

Информация об изоляте

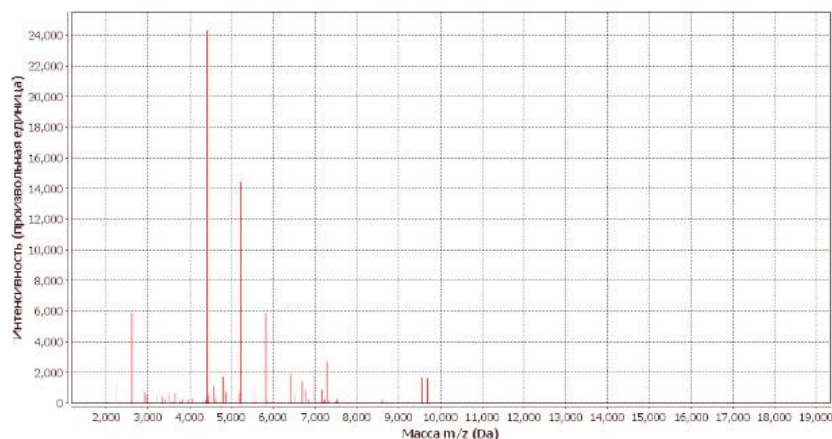
Номер анализа: 2212272T-1 Тип образца: - Уровень достоверности: 

Число идентификаций: 1

Список идентификаций

Позиция	Дата анализа	Название организма	Патогенность	Показатель достоверности	Уровень достоверности	Сбор данных/Вычисление
E1	27.12.22 11:28	Cellulosimicrobium cellulans		99.9		

Легенда: Валидировать выбор Добавить комментарий



А.

Детали обзора VITEK® MS

Отсроченный обзор VITEK® MS > Детали обзора VITEK® MS

Информация об изоляте

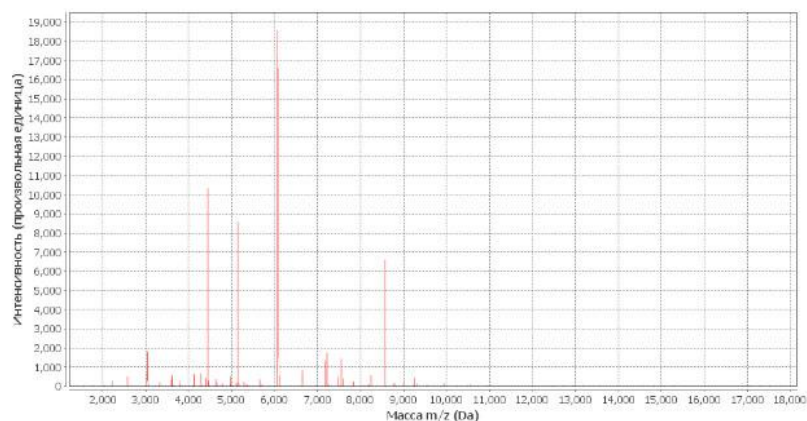
Номер анализа: 22122736DCP-1 Тип образца: - Уровень достоверности: 

Число идентификаций: 1

Список идентификаций

Позиция	Дата анализа	Название организма	Патогенность	Показатель достоверности	Уровень достоверности	Сбор данных/Вычисление
E2	27.12.22 11:28	Pseudomonas putida		99.9		

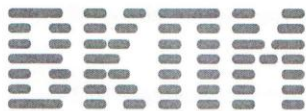
Легенда: Валидировать выбор Добавить комментарий



Б.

Рис. 11. Масс-спектры микроорганизмов А(2T *Cellulosimicrobium cellulans*) и Б(*Pseudomonas putida*-36DCP).

Идентификация другого штамма ЕМТ-В13 был проведен методом филогенетического анализа путем сравнения нуклеотидных последовательности гена 16S рРНК с аналогичными последовательностями, депонированными во всемирном банке нуклеотидных последовательностей GenBank. Данный анализ был заказан в ВКПМ (Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов).



Идентификация штамма EMT-B13 до вида с помощью анализа 16S РНК

Заказчик: ЭкоФармСервис

Вид: *Microbacterium algeriense*

Дата: 17.10.2022

Рис. 12. Сертификат определения видовой принадлежности изолята бактерии, выданный ВКПМ.

По полученным данным исследуемый штамм бактерии принадлежит к роду *Microbacterium*. Наибольшее совпадение было обнаружено с видом *algeriense* (99,66%). Но виды *maritypicum*, *liquefaciens*, *oxydans* и другие также показали схожесть выше 99%, что делает невозможным точное определение видовой принадлежности данной бактерии только методом филогенетического анализа на основании последовательности рибосомального гена.

Description	Per. Ident	Accession
Microbacterium algeriense strain G1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.66%	MK480726.1
Microbacterium maritypicum strain DSM 12512 (T) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.49%	MK424289.1
Microbacterium maritypicum strain DSM 12512 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.49%	NR_114986.1
Microbacterium maritypicum strain DSM 12512 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.49%	NR_042351.1
Microbacterium liquefaciens strain DSM 20638 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.49%	NR_026162.1
Microbacterium oxydans strain DSM 20578 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.32%	NR_044931.1
Microbacterium oxydans strain DSM 20578(T) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.32%	MH321609.1
Microbacterium marinum strain H101 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.32%	EF204420.1
Microbacterium liquefaciens strain JCM 3879 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.15%	MT760470.1
Microbacterium luteolum strain IFO 15074 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.11%	MW111248.1
Microbacterium paraoxydans strain NBRC 103076 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98.56%	MW111249.1
Microbacterium paraoxydans strain CF36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98.54%	MH281749.1
Microbacterium paraoxydans strain DSM 15019 genome assembly, chromosome: I	98.48%	LT629770.1

Рис. 13. Результаты филогенетического анализа изолята бактерии.

Для возможности успешного культивирования исследуемых штаммов бактерий было необходимо подобрать условия, при которых данные микроорганизмы показывали бы наилучший рост. Изначально бактерии культивировались на среде LB (Лурия-Бертани), где скорость роста бактерий был достаточен для сохранения и поддержания культур, но никак не подходил для промышленного культивирования исследуемых микроорганизмов. Для этого была проведена работа по подбору питательных сред для увеличения скорости роста бактерий и получения культур с наибольшим титром.

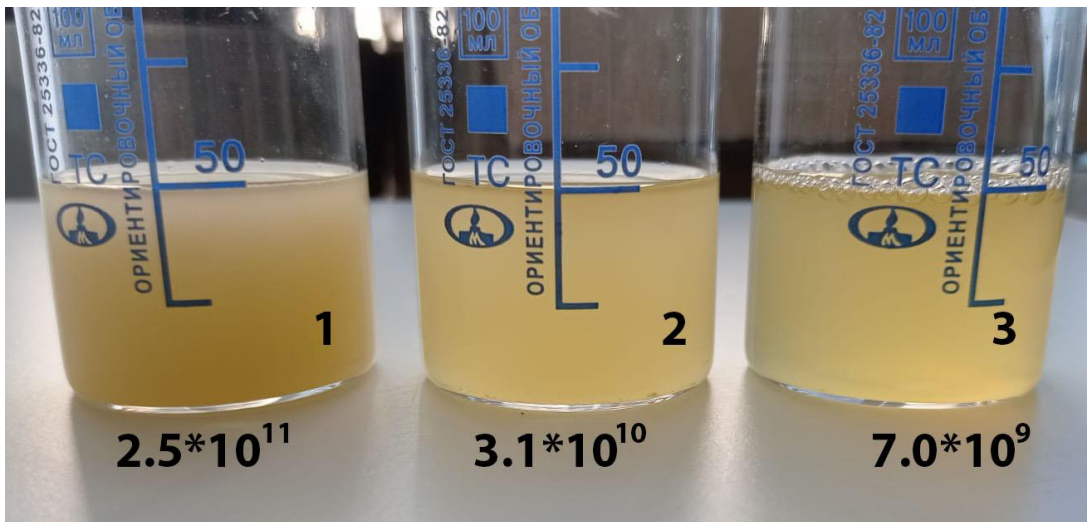


Рис. 14. Результаты испытания сред, при культивировании испытуемых микроорганизмов.

С целью удешевления расходов при масштабном культивировании было решено подобрать питательную среду, подходящую для всех трех культур. Таким образом, на первом этапе была создана питательная среда, обогащенная углеводами за счет использования глюкозы и мелассы. Скорость роста и конечный титр бактерий был улучшен, и достиг по сравнению с титром на среде LB равной $7,0 \cdot 10^9$ до $3,1 \cdot 10^{10}$ КОЕ, но этого было недостаточно для использования в производстве.

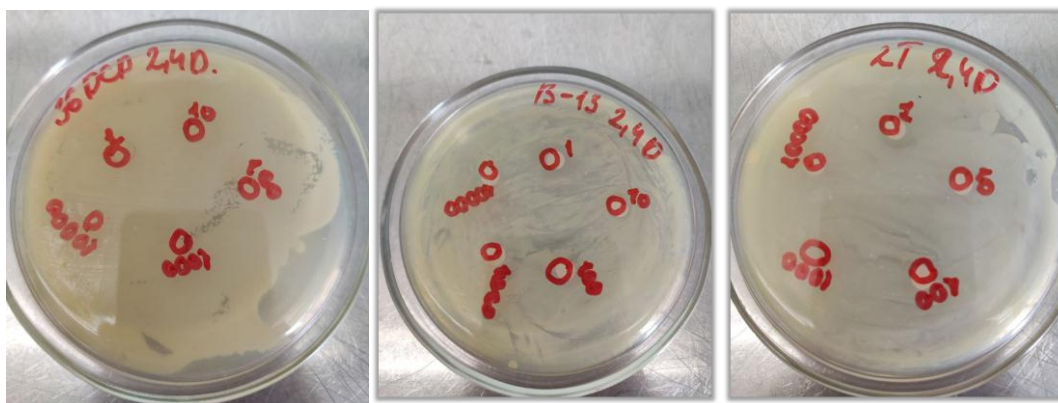
Следующая среда была разработана с увеличением минеральных составляющих. Был добавлен азотный компонент в виде нитрата аммония и исключена меласса, поскольку незначительно влияла на рост бактерий. На этой среде был достигнут конечный титр бактерий на уровне $2,5 \cdot 10^{11}$, что является уже удовлетворительным показателем для промышленного использования.

Загрязнение почв гербицидами и продуктами их первичного разложения является негативным экологическим фактором и приводит к различным нарушениям в устоявшейся экосистеме. Кроме всего прочего остатки гербицидов негативно влияют на бактериальные

компоненты биоудобрений, не позволяющие получать максимальный эффект от их применения. Одним из наиболее широко распространенных гербицидов являются производными 2,4-Дихлорфеноксиуксусной кислоты.

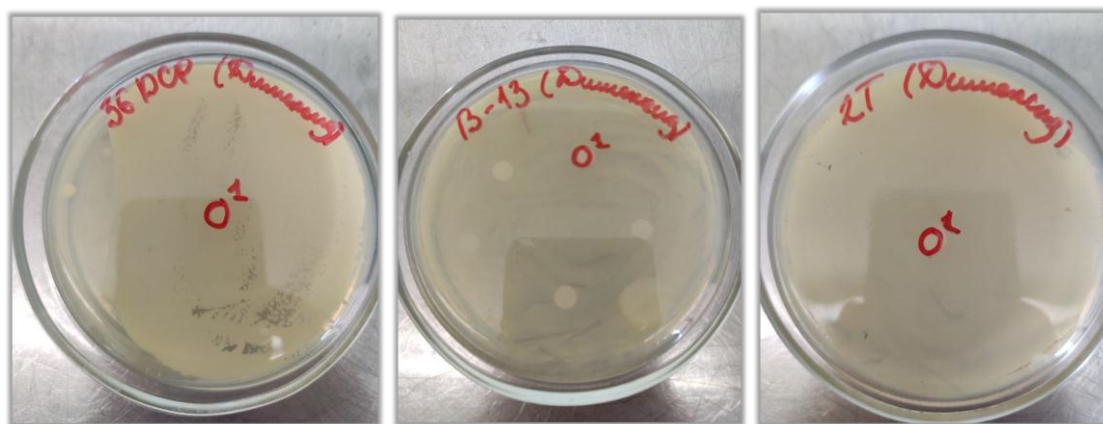
2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) принадлежит к группе синтетических ауксинов, которые с конца второй мировой войны широко используются в качестве действующих агентов селективных гербицидов. Долговременное и масштабное использование таких агрохимикатов привело к чрезмерному загрязнению этим компонентом сельскохозяйственных почв, а с другой – к адаптации и селекции бактерий, способных к их активной деградации. Например, для рода *Cellulosimicrobium* показана деструктивная активность по отношению к компонентам гербицидов.

В данной работе для исследования воздействия 2,4-Д на взятые в анализ штаммы бактерий был проведен опыт по изучению воздействия различных концентраций 2,4-Д на рост бактерий. В качестве растворителя данного компонента был использован Диметилсульфоксид (ДМСО). Выявлено, что у трех исследуемых штаммов только воздействие максимально используемой концентрации 2,4-Д вызвало ингибирование роста (рис. 15-17). Поскольку представленной максимальной концентрации в почве не встречается можно сказать о том, что данные штаммы успешно могут быть использованы при выращивании растений на загрязненных 2,4-Д почвах без потери их свойств.



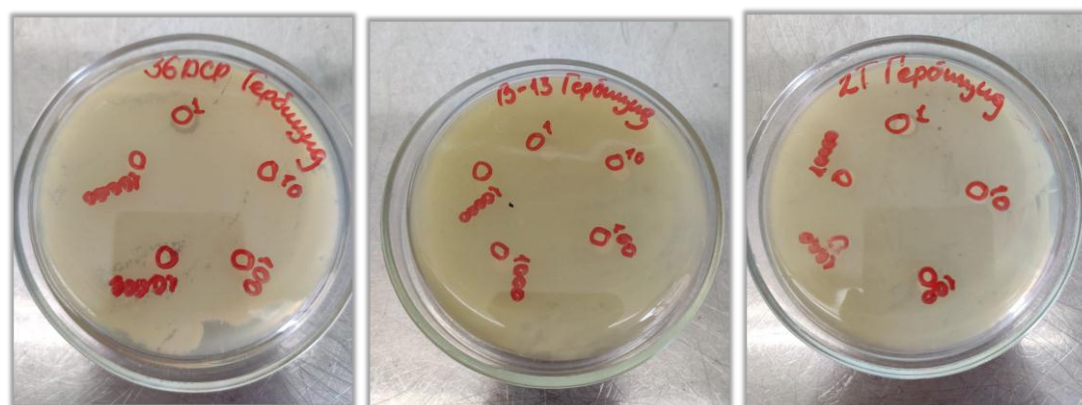
Рисунки 15-17 – Проверка ингибирующей активности разных концентраций 2,4-Дихлорфеноксиуксусной кислоты на рост штаммов *Pseudomonas putida* 36 DCP, *Microbacterium* sp. B-13 и *Cellulosimicrobium cellulans* 2T

Параллельно были поставлены опыты по выявлению ингибирующих рост бактерий свойств растворителя ДМСО. Из результатов тоже видно, что ДМСО соответственно тоже не влияет на рост исследуемых штаммов (рис).



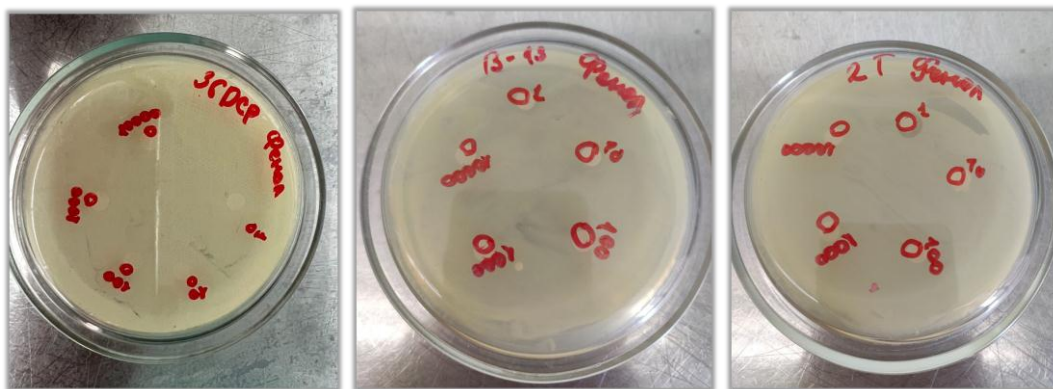
Рисунки 18-20 – Проверка активности ДМСО в отношении штаммов 36 DCP-*Pseudomonas putida*, B-13 *Microbacterium algeriense* и 2T *Cellulosimicrobium cellulans*

Далее нами было исследовано воздействие на исследуемые штаммы непосредственно готового препарата гербицида. Для этого нами был выбран гербицид «Агрокилер» фирмы «Avgust». В состав данного препарата входят активное вещество – ФОС глифосфат (500 г/л). Данный анализ также показал, что максимальная примененная концентрация данного препарата имело незначительное ингибирующее влияние на бактерии *Pseudomonas putida* 36 DCP, а на других штаммах ингибирование роста обнаружено не было. Гербициды на основе глифосата на сегодняшний день являются превалирующими препаратами, используемыми в сельском хозяйстве в борьбе с сорной растительностью. И устойчивость исследуемых штаммов к данному компоненту дает возможность утверждать, что данные микроорганизмы, как компоненты микроудобрений успешно можно применять совместно с подобными гербицидами или загрязненных ими почвах (рис. 21-23).



Рисунки 21-23 – Проверка влияния ФОС глифосата в различных концентрациях на ингибирование роста штаммов *Pseudomonas putida* 36 DCP, *Microbacterium algeriense* B-13 и *Cellulosimicrobium cellulans* 2T.

Негативное влияние на микробиом почвы оказывают не только сами гербициды, но и продукты их первичных распадов. Одним из таких компонентов является фенол, который образуется при первичном разложении таких гербицидов, которые содержат в своем составе клодинафоп пропаргил, CF (проп-2-инил (R)-2-[(5-хлор-3-фтор-2-пиридилокси) фенокси]пропаноат) в качестве активного компонента. Для исследования был взят 6% водный раствор фенола и его разведения. При воздействии на исследуемые штаммы микроорганизмов была выявлено незначительное ингибирование роста штамма *Cellulosimicrobium cellulans* 2T. На остальные два штамма негативного воздействия фенола обнаружено не было.



Рисунки 24-26 – Проверка влияния фенола в различных концентрациях на ингибирование роста штаммов *Pseudomonas putida* 36 DCP, *Microbacterium algeriense* B-13 и *Cellulosimicrobium cellulans* 2T.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе проделанной работы были выявлены видовые принадлежности взятых в анализ трех штаммов бактерий, обладающих ростостимулирующими свойствами. Они были определены как *Pseudomonas putida* обозначенный нами как штамм 36DCP, *Microbacterium* sp. Штамм B-13 и *Cellulosimicrobium cellulans* штамм 2T. Для этих бактерий был подобран состав питательных сред, позволяющий достигать плотности культур при выращивании выше 1×10^{11} КОЕ. Было показано, что исследуемые штаммы устойчивы к

воздействию 2,4-Дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), являющейся основным компонентом огромного количества различных гербицидов; устойчивы к ФОС глифосфату в составе препарата «Агрокилер», что дает возможность предположить, что бактерии устойчивы и к другим препарат на основе глифосата; а также устойчивы к компоненту распада клодинафоп пропаргил, CF – фенолу. Подытожив, можно сказать, что выбранные для исследования штаммы можно активно использовать в сельском хозяйстве в качестве ростостимулирующих микроорганизмов совместно с препаратами гербицидов, что существенно облегчит технологию их применения, а также на почвах, загрязненных гербицидами и продуктами их распада.

ВЫВОДЫ

1. Определены видовые принадлежности взятых в анализ штаммов микроорганизмов, обозначенные в дальнейшем как *Pseudomonas putida* штамм 36DCP, *Microbacterium* sp. штамм В-13 и *Cellulosimicrobium cellulans* штамм 2Т.
2. Произведен подбор состава универсальной среды для всех трех штаммов, позволяющий достигать титра 1×10^{11} КОЕ/мл при культивировании.
3. Показано, что исследуемые штаммы устойчивы к воздействию 2,4-Дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), к ФОС глифосфату в составе препарата «Агрокилер», а также устойчивы к компоненту распада клодинафоп пропаргил, CF – фенолу в концентрации 6% водного раствора.
4. Выявлено, что минимальной ингибирующей концентрацией глифосата для *Pseudomonas putida* 36 DCP является 500 г/л, минимальной ингибирующей концентрацией фенола для *Cellulosimicrobium cellulans* 2Т – 6%. Ингибирование роста бактерий в остальных случаях выявить не удалось.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andrews M., Cripps M., Edwards G., Andrews C.M. The potential of beneficial microorganisms in agricultural systems // *Ann. Appl. Biol.* – 2012. – Vol. 160. – P. 1–5.
2. Baldwin B., Bray M., Geoghegan M. The microbial decomposition of paraquat // *Biochem J.* - 1966. – Vol. 101:15.
3. Beneduzi A., Ambrosini A., Passaglia L.M.P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents // *Genet. Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 35(4). P. 1044–1051.
4. Bhattacharyya P.N., Jha D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. - Vol. 28. – P. 1327–1350.
5. Bogaerts P., Bohatier J., Bonnemoy F., et al. Fungal biodegradation of a phenylurea herbicide, diuron: structure and toxicity of metabolites // *Pest Management Sci.* – 2000. – Vol. 56. – P. 455–462.
6. Castillo M.A., Felis N., Aragon P., et al. Biodegradation of the herbicide diuron by streptomycetes isolated from soil // *Int Biodeter Biodegrad.* – 2006. – Vol. 58. – P. 196–202.
7. Cenkci S, Yldz M, Cigerci IH, et al. Evaluation of 2,4-D and dicamba genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays // *Ecotoxicol Environ Saf.* – 2010. – Vol. 73. – P. 1558–1563.
8. Chaparro-Encinas L.A., Santoyo G., Peña-Cabriaes J.J., Castro-Espinoza L., Parra-Cota F.I., de los Santos-Villalobos S. Transcriptional regulation of metabolic and cellular processes in durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum) in the face of temperature increasing // *Plants.* – 2021. - Vol. 10: 2792.
9. Cherry B. GM crops increase herbicide use in the United States. Institute of Science and Technology. 2010. Available from: <http://www.i-sis.org.uk/GMcropsIncreasedHerbicide.php>
10. Chittora D., Meena M., Barupal T., Swapnil P. Cyanobacteria as a source of biofertilizers for sustainable agriculture // *Biochem. Biophys. Rep.* – 2020. – Vol. 22: 100737.
11. de los Santos-Villalobos S., Díaz-Rodríguez A.M., Ávila-Mascareño M.F., Martínez-Vidales A.D., Parra-Cota F.I. COLMENA: A Culture Collection of Native Microorganisms for Harnessing the Agro-Biotechnological Potential in Soils and Contributing to Food Security // *Diversity.* – 2021. – Vol. 13. – P. 337.
12. DiTomaso J.M. Invasive weeds in rangelands: Species, impacts, and management // *Weed Sci.* – 2000. - Vol. 48. – P. 255–265.

13. Evans W., Smith W., Fernely H., Davis J. Bacterial metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid // *J Biochem.* – 1971. – Vol. 122. – P. 543–545.
14. FAO. How to feed the World in 2050. In Proceedings of the Expert Meeting on How to Feed the World in 2050, Rome, Italy, 12–13 October 2009.
15. FAO. The Future of Food and Agriculture—Alternative Pathways to 2050. Summary Version; FAO: Rome, Italy, 2018; p. 60, ISBN 9789251309896.
16. Fortune Business Insights, Agricultural Microbials Market Size, Share & COVID-19 Impact Analysis, by Type (Bacteria, Fungi, Virus, and Others), Formulation (Dry and Liquid), Function (Soil Amendment and Crop Protection), Application Method (Foliar Spray, Soil Treatment, Seed Treatment, and Others), Crop (Cereals, Oilseeds & Pulses, Fruits & Vegetables, and Others), and Regional Forecast, 2020–2027.
17. Fratila-Apachitei L.E., Hirst J.A., Siebel M.A., Gijzen H.J. (1999). Diuron degradation by *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 in synthetic and natural media // *Biotechnol.* – 1999. - Vol. 21: 147.
18. Funderburk H, Bozarth GA. Review of the metabolism and decomposition of diquat and paraquat // *J Agric Food Chem.* – 1967. – Vol. 15. – P. 563–568.
19. Gómez-Godínez L.J., Aguirre-Noyola J.L., Martínez-Romero E., Arteaga-Garibay R.I., Ireta-Moreno J., Ruvalcaba-Gómez J.M. A Look at Plant-Growth-Promoting Bacteria // *Plants.* – 2023. – Vol. 12: 1668.
20. Gonzalez M., Soloneski S., Reigosa M.A., Larramendy M.L. Genotoxicity of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and a commercial formulation, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt I. Evaluation of DNA damage and cytogenic endpoints in Chinese Hamster ovary (CHO) cells // *Toxicol In Vitro.* – 2005. - Vol. 19. – P. 289–297.
21. Gui W., Dong Q., Zhou S., et al. Waterborne exposure to clodinafop-propargyl disrupts the posterior and ventral development of zebrafish embryos // *Environ Toxicol Chem.* - 2011. – Vol. 30. – P. 1576–1581.
22. Hou Y., Tao J., Shen W., et al. Isolation of the fenoxaprop-ethyl (FE)-degrading bacterium *Rhodococcus* sp. T1, and cloning of FE hydrolase gene *feh* // *FEMS Microbiol Lett.* – 2011. – Vol. 323. – P. 196–203.
23. Huang C.L., Lee Y.C., Yang Y.C., et al. Minocycline prevents paraquat-induced cell death through attenuating endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction // *Toxicol Lett.* – 2012. - Vol. 209. – P. 203–210.

24. Hunter M.C., Smith R.G., Schipanski M.E., Atwood L.W., Mortensen D.A. Agriculture in 2050: Recalibrating targets for sustainable intensification // *Bioscience*. – 2017. – Vol. 67. – P. 386–391.
25. Ibarra-Villarreal A.L., Parra-Cota F.I., Yepez E.A., Gutiérrez-Coronado M.A., Valdez-Torres L.C., de los Santos-Villalobos S. Impact of a shift from conventional to organic wheat farming on soil cultivable fungal communities in the Yaqui Valley, Mexico // *Agrociencia*. – 2020. – Vol. 54. – P. 643–659.
26. Jablonowski N.D., Koeppchen S., Hofmann D., et al. Spatial distribution and characterization of long-term aged ¹⁴C-labeled atrazine residues in soil // *J Agricul Food Chem*. – 2008. - Vol. 56. – P. 9548–9554.
27. Juhler R., Sorensen S., Larsen L. Analysing transformation products of herbicide residues in environmental samples // *Water Res*. – 2001. - Vol. 35. – P. 1371–1378.
28. Kashanian S, Askari S, Ahmadi F, et al. In vitro study of DNA interaction with clodinafop-propargyl herbicide // *DNA Cell Biol*. - 2008. – Vol. 27. - P. 581–586.
29. Koskey G., Mburu S.W., Awino R., Njeru E.M., Maingi J.M. Potential Use of Beneficial Microorganisms for Soil Amelioration, Phytopathogen Biocontrol, and Sustainable Crop Production in Smallholder Agroecosystems // *Front. Sustain. Food Syst*. – 2021. – Vol. 5: 130.
30. Lugtenberg B., Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria // *Annu. Rev. Microbiol*. – 2009. – Vol. 63. P. 541–556.
31. Mandelbaum R.T., Wackett L.P., Allan D.L. Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures // *Appl Environ Microbiol*. – 1993. – Vol. 59. – P. 1695–1701.
32. Marron E, Ruiz N, Rubio C, et al. 2,4-D Degrading bacterial consortium. Isolation, kinetic characterization in batch and continuous culture and application for bioaugmenting an activated sludge microbial community // *Process Biochem*. – 2006. - Vol. 41. – P. 1521–1528.
33. Meena M., Zehra A., Swapnil P., Harish, Marwal A., Yadav G., Sonigra P. Endophytic Nanotechnology: An Approach to Study Scope and Potential Applications // *Front. Chem*. – 2021. – Vol. 9: 613343.
34. Megadi V.B., Tallur P.N., Hoskeri R.S., et al. Biodegradation of pendimethalin by *Bacillus circulans* // *Indian J Biotechnol*. - 2010. – Vol. 9. – P. 173–177.
35. Montoya-Martínez A.C., Parra-Cota F.I., de los Santos-Villalobos S. Beneficial Microorganisms in Sustainable Agriculture: Harnessing Microbes' Potential to Help Feed the World // *Plants*. - 2022. – Vol. 11: 372.

36. Pérez-Montaña F., Alías-Villegas C., Bellogín R.A., Del Cerro P., Espuny M.R., Jiménez-Guerrero I., López-Baena F.J., Ollero F.J., Cubo T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production // *Microbiol. Res.* – 2014. – Vol. 169. - P. 325–336.
37. Pimentel D. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics // *J Agr Environ Ethic.* – 1995. - Vol. 8. – P. 17–29.
38. Ray P., Lakshmanan V., Labbé J.L., Crave, K.D. Microbe to Microbiome: A Paradigm Shift in the Application of Microorganisms for Sustainable Agriculture // *Front. Microbiol.* – 2020. – Vol. 11: 3323.
39. Sahid I., Hamzah A., Aris P.M. Effects of paraquat and alachlor on soil microorganisms in peat soil // *Pertanika.* – 1992. – Vol. 15. – P. 121–125.
40. Santoyo G., Guzmán-Guzmán P., Parra-Cota F.I., de los Santos-Villalobos S., Orozco-Mosqueda M.d.C., Glick B.R. Plant Growth Stimulation by Microbial Consortia // *Agronomy.* – 2021 – Vol. 11: 219.
41. Shelton D.R., Khader S., Karns J.S., Pogell B.M. Metabolism of twelve herbicides by *Streptomyces* // *Biodegradation.* – 1996. – Vol. 7. – P. 129–36.
42. Singh B., Kaur J., Singh K. Microbial remediation of explosive waste // *Crit Rev Microbiol.* – 2012. – Vol. 38. – P. 152–167.
43. Singh B., Kaur J., Singh K. Microbial degradation of an organophosphate pesticide, malathion // *Crit Rev Microbiol.* – 2013. - Vol. 40. – P. 146–54.
44. Singh B., Singh K. Microbial degradation of herbicides // *Crit Rev Microbiol, Early Online.* – 2016. – Vol. 42(2). – P. 1–17.
45. Siripattanakul S., Wirojanagud W., McEvoy J., et al. Atrazine degradation by stable mixed cultures enriched from agricultural soil and their characterization // *J Appl Microbiol.* – 2009. – Vol. 106. – P. 986–992.
46. Soltani N., Dille J.A., Burke I.C., Everman W.J., VanGessel M.J., Davis V.M., Sikkema P.H. Potential corn yield losses due to weeds in North America // *Weed Technol.* – 2016. – Vol. 30. – P. 979–984.
47. Soltani N., Dille J.A., Burke I.C., Everman W.J., VanGessel M.J., Davis V.M., Sikkema P.H. Perspectives on potential soybean yield losses from weeds in North America // *Weed Technol.* – 2017. – Vol. 31. – P. 148–154.

48. Soltani N., Dille J.A., Gulden R.H., Sprague C.L., Zollinger R.K., Morishita D.W., Lawrence N.C., Sbatella G.M., Kiss A.R., Jha P., et al. Potential yield loss in dry bean crops due to weeds in the United States and Canada // *Weed Technol.* – 2018. – Vol. 32. – P. 342–346.
49. Song J., Gu J., Zhai Y., et al. Biodegradation of nicosulfuron by a *Talaromyces flavus* LZM1 // *Bioresour Technol.* – 2013. – Vol. 140. – P. 243–248.
50. Stasinakis A.S., Kotsifa S., Gatidou G., Mamais D. Diuron biodegradation in activated sludge batch reactors under aerobic and anoxic conditions // *Water Res.* – 2009. – Vol. 43:1471–9.
51. Sturtz N., Evangelista De Duffard AM, Duffard R. Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4- D) residues in neonates breastfed by 2,4-D exposed dams // *Neurotoxicol.* - 2000. – Vol. 2: 147.
52. Thurman E.M., Goolsby D.A., Meyer M.T., et al. A reconnaissance study of herbicides and their metabolites in surface water of the Midwestern United States using immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry // *Environ Sci Technol.* - 1992. – Vol. 26. – P. 2440–2447.
53. Tilman D., Balzer C., Hill J., Befort B.L. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture // *Proc. Natl. Acad. Sci. - USA* 2011. – Vol. 108. – P. 20260–20264.
54. Turan M., Kıtır N., Alkaya Ü., Günes A., Tüfenkçi S., Yıldırım E., Nikerel E., Turan M., Kıtır N., Alkaya Ü., et al. Making Soil More Accessible to Plants: The Case of Plant Growth Promoting Rhizobacteria // *Plant Growth.* - 2016. – Vol. 1. – P. 61–69.
55. Vargha M., Takats Z., Maróczy K. Degradation of atrazine in a laboratory scale model system with Danube river sediment // *Water Res.* – 2005. – Vol. 39. – P. 1560–1568.
56. Wackett L.P., Sadowsky M.J., Martinez B., Shapir N. Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzymes to field studies // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2002. – Vol. 58. – P. 39–45.
57. Wang X., Gu M., Niu G., Baumann P.A. Herbicidal activity of mustard seed meal (*Sinapis alba* «IdaGold» and *Brassica juncea* «Pacific Gold») on weed emergence // *Industrial Crops and Products.* - 2015. - Vol. 77. - P. 1004–1013.
58. Weintraub RL, Reinhart JH, Scherff RA, Schisler LC. Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. III. Metabolism and persistence in dormant plant tissue // *Plant Physiol.* – 1954. – Vol. 29. - P. 303–304.
59. Xu J., Yang M., Dai J., et al. Degradation of acetochlor by four microbial communities // *Bioresource Technol.* - 2008. - Vol. 99. - P. 7797–7802.

60. Xuedong W., Huili W., Defang F. Biodegradation of imazapyr by free cells of *Pseudomonas fluorescens* biotype II and *Bacillus cereus* isolated from soil // Bull Environ Contam Toxicol. - 2005. – Vol. 74. – P. 350–355.
61. Zheng S.Q., Cooper J.E. Adsorption, desorption and degradation of three pesticides in different soils // Arch Environ Toxicol. – 1996. – Vol. 30. – P. 15–20.
62. Zhou Z.S., Song J.B., Liu Z.P., Yang H. Molecular dissection of atrazine-responsive transcriptome and gene networks in rice by high-throughput sequencing // J Hazard Mater. – 2012. – Vol. 15. – P. 57–68.
63. Баздырев Г.И., Зотов Л.И., Полин В.Д. Сорные растения и меры борьбы с ними в современном земледелии. - М.: Издательство МСХА, 2004. - 288 с.
64. Вьюгин С.М., Вьюгина Г.В. Регулирование фитосанитарного состояния агроценозов // Земледелие. – 2012. - № 1. – С. 39-41.
65. ГОСТ 12.3.041-86. Система стандартов безопасности труда. Применение пестицидов для защиты растений. требования безопасности: межгосударственный стандарт. Введ.01.01.1987. – М.: Издательство стандартов ИПК, 2001. – 66 с.
66. Дудкин И.В., Шмат З.М. Системы обработки почвы и сорняки // Защита и карантин растений. - 2010. - № 8. - С. 28-30.
67. Захаров Н.Г., Полняков М.А. Влияние основной обработки почвы на засоренность посевов яровой пшеницы / Современные системы земледелия: опыт, проблемы, перспективы: материалы международной научно-практической конференции, посвященной 80-летию со дня рождения профессора Морозова В.И. Ульяновск: Ульяновская ГСХА. - 2011. - С. 98-102.
68. Иващенко О.О. Бур'яни в агрофітоценозах. - Киев: Світ, 2001. - 235 с.
69. Исайкин И.И., Волков М.К. Плуг — сорнякам друг // Земледелие. - 2007. - № 1. - С. 23–24.
70. Картамышев Н.И., Шмат З.М., Гончаров Н.Ф. Снижать засоренность полей в почвозащитном земледелии // Земледелие. - 1992. - № 2. - С. 55–58.
71. Конопля М.І., Курдюкова О.М. Засміченість ґрунту насінням бур'янів під впливом основної обробки ґрунту // Наук. вісник Нац. універ. біоресурс. і природокорис. України. - 2011. - Вип. 162. - С. 56-61.
72. Корте Ф., Бахадир М., Клайн В., Лай Я. П. и др. Экологическая химия. – М.: Мир, 1997. – 402 с.

73. Кузина Е.В. Влияние различных способов обработки почвы на засоренность посевов в условиях лесостепи Среднего Поволжья //Пермский аграрный вестник. - 2017. - № 3 (19). - С. 80-85.
74. Кузина Е.В. Засоренность посевов горчицы в зависимости от способов основной обработки почвы // Международный сельскохозяйственный журнал. – 2022. - Т. 65. - № 2 (386). – С. 209-212.
75. Курдюкова О.М. Засміченість посівів сівозміни в залежності від обробітку ґрунту // Вісник Полтавської держ. аграр. академії. - 2011. - № 1. - С. 51–54.
76. Курдюкова О.Н., Конопля Н.И. Потенциальные запасы семян в почве в природных и антропогенно нарушенных экотопах // Агроэкологический журнал. - 2009. - С. 172–174.
77. Курдюкова О.М., Конопля М.І., Остапенко М.А. Потенційна засміченість агрофітоценозів польових та овочевих культур Степу України // Зрошуване землеробство: Зб. наук. праць. - 2010. - Вип. 54. - С. 309–314.
78. Курдюкова О.М., Конопля М.І. Бур'яни Степів України. - Луганськ: Елтон-2, 2012. - 348 с.
79. Манько Ю.П., Кобзиста Л.П. Ефективність контролю забур'яненості // Карантин і захист рослин. - 2001. - № 2. - С. 21–23.
80. Мартынов А. Н., Беляева Н. В., Григорьева О. И. Современные проблемы лесовыращивания. Химический и комплексный уход за лесом: учебное пособие. – СПб.: ЛТА, 2008. – 80 с.
81. Мельникова О.В., Ториков Е.Е., Осипов А.А. Изменение состава сорной растительности в агрофитоценозах при разных технологиях возделывания полевых культур в севообороте // Вестник Брянской государственной сельскохозяйственной академии. – 2018. - № 6(70). – С. 15-21.
82. Накльорка Ю.І. Забур'яненість посівів ячменю після різних способів і глибини основного обробітку ґрунту // Карантин і захист рослин. - 2006. - № 1. - С. 24–25.
83. Нечаев Л.А., Новиков В.М., Коротеев В.И. Состав сорняков в зернопаропропашном севообороте // Аграрная наука. - 2009. - № 3. - С. 20–21.
84. Онищенко Г. Г. Пестициды: защита для растений или отравы для окружающей среды? // Наука и жизнь. – 2003. – №3. – С.54–56.
85. Орлов Д. С., Садовникова Л. К., Лозановская И. Н. Экология и охрана биосферы при химическом загрязнении: учебное пособие. – М.: Высшая школа, 2002. – 334 с.

86. Ровенко В.В. Способы обработки почвы и размещение семян сорняков в слоях почвы // Вестник аграрной науки. - 1997. - № 8(532). - С. 5–7.
87. Рогозин М. Ю., Бекетова Е. А. Экологические последствия применения пестицидов в сельском хозяйстве // Молодой учёный, 2018. – № 25 (211). – С. 39-43.
88. Ростова Е.Н. Влияние элементов технологии на засоренность и продуктивность посевов горчицы сарептской (*Brassica juncea*) // Зерновое хозяйство России. - 2021. - № 3. - С. 75-81.
89. Сабитов М.М., Науметов Р.М., Шарипова Р.Б. Влияние комплексного применения средств химизации на основные заболевания и засоренность яровой пшеницы // Пермский аграрный вестник. – 2015. - № 3. С. 25-32.
90. Савоськина О.А., Чебаненко С.И., Манишкин С.Г. Влияние систем обработки почвы на сорный компонент агрофитоценоза ячменя // Плодородие. - 2011. - № 6. - С. 18-19.
91. Степанова С.А. Особенности разложения гербицида в почве // Интерэкспо ГЕО-Сибирь-2013. IX Междунар. науч. конгр.: Междунар. науч. конф. «СибОптика-2013» сб. материалов в 2 т. (Новосибирск, 15-26 апреля 2013 г.). - Новосибирск: СГГА, 2013. - Т. 1. – С. 192–194.
92. Танчик С.П., Петришина А.А., Петришин В.А. Формування бур'янового компонента агрофітоценозу гороху залежно від систем землеробства // Карантин і захист рослин. - 2010. - № 9. - С. 15–18.
93. Трофимова Т.А., Селищев Д.А. Проблемы борьбы с сорняками при минимализации обработки почвы / Экологизация адаптивно-ландшафтных систем земледелия: материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию кафедры земледелия ВГАУ. Воронеж. - 2020. - С. 170-176.
94. Циков В.С., Матюха Л.А. Сорняки: вредоносность и система защиты. - Днепропетровск: ЭНЭМ, 2006. - 86 с.

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Миронов Н. К.

Проверяющий: Кобзева Наталья Рудольфовна

Организация: Башкирский государственный медицинский университет

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» – <http://bashgmu.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 11636

Начало загрузки: 21.06.2023 08:29:17

Длительность загрузки: 00:00:28

Имя исходного файла: ВКР Миронова Никиты (1).doc

Название документа: РАЗРАБОТКА ЭТАПА БИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕКУЛЬТИВАЦИИ ЗЕМЛИ С ПРЕВЫШЕНИЕ ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ФЕНОЛА И ХЛОРФЕНОЛА

Размер текста: 77 кБ

Тип документа: Выпускная квалификационная работа
Символов в тексте: 78773
Слов в тексте: 9317

Число предложений: 1084

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

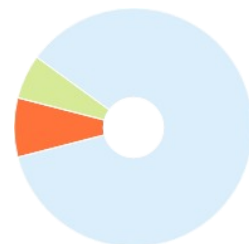
Начало проверки: 21.06.2023 08:29:46

Длительность проверки: 00:00:43

Корректировка от 21.06.2023 09:07:17
Комментарии: [Автосохраненная версия]
Поиск с учетом редактирования: да

Проверенные разделы: основная часть с. 3–45, библиография с. 46–55
Модули поиска: ИПС Адилет, Модуль поиска "БГМУ", Библиография, Сводная коллекция ЭБС, Интернет Плюс*, Сводная коллекция РГБ, Цитирование,

Переводные заимствования (RuEn), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu), Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Переводные заимствования издательства Wiley, eLIBRARY.RU, СПС ГАРАНТ: аналитика, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, Медицина, Диссертации НББ, Коллекция НБУ, Перефразирования по eLIBRARY.RU, Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика*, Перефразирования по Интернету, Перефразирования по Интернету (EN), Перефразирования по коллекции издательства Wiley, Патенты СССР, РФ, СНГ, СМИ России и СНГ, Шаблонные фразы, Кольцо вузов, Издательство Wiley, Переводные заимствования



СОВПАДЕНИЯ	САМОЦИТИРОВАНИЯ	ЦИТИРОВАНИЯ	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ
7,67%	0%	5,88%	86,45%

Совпадения — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.

Самоцитирование — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» — это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.

Цитирование — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы; библиография; фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.

Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.

Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.

Оригинальный текст — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

«Совпадения», «Цитирования», «Самоцитирования», «Оригинальность» являются отдельными показателями, отображаются в процентах и в сумме дают 100%, что соответствует полному тексту проверяемого документа.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые совпадения проверяемого документа с проиндексированными в системе источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности совпадений или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте	Комментарии
[01]	23,51%	0%	не указано	29 Сен 2022	Библиография	0	1	
[02]	6,88%	0,67%	Microbial degradation of herbicides https://doi.org	21 Июнь 2023	Интернет Плюс*	8	75	
[03]	4,65%	1,25%	ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА СОРНОЙ РАСТ...					
[04]	4,65%	0%	http://elibrary.ru					
[05]	4,01%	0,41%	ИЗМЕНЕНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА СО...					
[06]	3,47%	0%	http://elibrary.ru					

[10]	3,35%	0%	ИЗМЕНЕНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА СО... http://elibrary.ru	24 Янв 2020	eLIBRARY.RU	0	7	"совпадение" на "цитирование". Причина: Весь текст из источника использован правомерно.
[11]	3,23%	0%	ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦ... https://cyberleninka.ru	25 Июн 2021	Интернет Плюс*	0	15	
[12]	3,16%	0%	Изменение состава сорной раститель... https://cyberleninka.ru	08 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	10	
[13]	3,08%	0%	Изменение видового состава сорной ... https://cyberleninka.ru	08 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	9	
[14]	3,07%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachment/pl... https://mdpi-res.com	21 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	14	
[15]	2,84%	0%	Система основной обработки почвы ... https://cyberleninka.ru	30 Дек 2019	Интернет Плюс*	0	23	
[16]	2,78%	0%	https://www.ijset.net/journal/2551.pdf https://ijset.net	21 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	33	
[17]	2,72%	2,54%	ЗАСОРЕННОСТЬ ПОСЕВОВ ГОРЧИЦЫ ... https://elibrary.ru	16 Июл 2022	eLIBRARY.RU	5	6	Тип источника изменен с "совпадение" на "цитирование". Причина: Весь текст из источника использован правомерно.
[18]	2,58%	0%	Система основной обработки почвы ...	13 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	11	
[19]	2,58%	0%	Система основной обработки почвы ...	13 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	11	
[20]	2,27%	1,63%	https://cyberleninka.ru Система основной обработки почвы ... http://elibrary.ru	05 Авг 2016	Перефразирования по eLIBRARY.RU	2	3	
[21]	2,05%	2,05%	ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦ... http://elibrary.ru	12 Окт 2020	eLIBRARY.RU	3	3	
[22]	1,1%	1,1%	Сарварова, Елена Рафисовна Поиск н... http://dlib.rsl.ru	08 Ноя 2022	Сводная коллекция РГБ	5	5	
[23]	1,08%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachment/pl... https://mdpi-res.com	21 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	12	
[24]	1,06%	0%	3(19) (19) PDF https://docplayer.ru	18 Apr 2019	Интернет Плюс*	0	8	
[25]	1,06%	0%	3(19) (19) PDF. Скачать Бесплатно... https://docplayer.ru	11 Мар 2020	Издательство Wiley	0	4	
[27]	0,89%	0%	Agrobacterium and emm101-mediated... https://doi.org	31 Мая 2010	Издательство Wiley	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[26]	0,97%	0%	Purple corn-associated rhizobacteria wi... https://doi.org					
[28]	0,88%	0%	http://www.voprosy.ru/wp-content/upl... http://dlib.rsl.ru	28 Дек 2021	Сводная коллекция РГБ	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[31]	0,85%	0%	Диссертация на тему «Научное обосн... https://dissercat.com	08 Сен 2022 21 Дек 2022	Интернет Плюс* Интернет Плюс*	0 0	5 3	
[29]	0,85%	0%	Диссертация на тему «Научное обосн... https://dissercat.com	21 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	3	
[30]	0,85%	0%	Диссертация на тему «Научное обосн... https://dissercat.com					
[35]	0,65%	0%	Влияние зяблевой обработки почвы ... https://moluch.ru	30 Дек 2020	Интернет Плюс*	0	7	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[32]	0,65%	0%	Влияние зяблевой обработки почвы ... https://moluch.ru	17 Фев 2021	Интернет Плюс*	0	7	
[36]	0,72%	0%	Влияние зяблевой обработки почвы ... https://moluch.ru	21 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	7	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[33]	0,71%	0%	Влияние зяблевой обработки почвы ... https://moluch.ru	03 Фев 2013	Сводная коллекция РГБ	0	2	
[37]	0,71%	0%	Влияние зяблевой обработки почвы ... https://moluch.ru	12 Фев 2019	Коллекция НБУ	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[34]	0,69%	0%	Зарафшон воҳаси ғаллазорларида та... http://diss.natlib.uz	раньше 2011	Издательство Wiley	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[38]	0,69%	0%	Зарафшон воҳаси ғаллазорларида та... не указано	29 Сен 2022	Шаблонные фразы	0	13	Источник исключен.
[40]				0,58%				

Источник исключен.

[46]	0,51%	0%	Frontiers Microbial Inoculants for Imp... https://frontiersin.org	03 Ноя 2020	Интернет Плюс*	0	4	Причина: Маленький процент пересечения.
[47]	0,5%	0%	Автореферат/Автореферат докт. дис. ... http://oldvak.ed.gov.ru	05 янв 2017	Интернету	0	1	
[49]	0,49%	0%	Diplom_Begliev_fazrpp_350304_2022	30 Авг 2022	Кольцо вузов	0	1	
[54]	0,45%	0%	Макаров, Армен Александрович Усов... http://dlib.rsl.ru	28 Дек 2021	Сводная коллекция РГБ	0	1	
[57]	0,42%	0%	Co-inoculation of Bacillus sp. and Pseu... https://doi.org	31 Июл 2019	Издательство Wiley	0	1	
[58]	0,42%	0%	Microbial inoculation to improve plant ... https://doi.org	15 Фев 2022	Издательство Wiley	0	1	
[59]	0,41%	0%	The role of root-associated microbes in ... https://doi.org	15 Авг 2021	Издательство Wiley	0	1	
[60]	0,4%	0%	Никульчев, Константин Анатольевич ... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	1	
[64]	0,37%	0%	Цинцадзе, Оксана Евгеньевна Совер... http://dlib.rsl.ru	22 Авг 2019	Сводная коллекция РГБ	0	1	
[65]	0,35%	0%	Ресурсосберегающие способы и срок... http://dslib.net	29 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	0	1	
[71]	0,3%	0%	Toxic Effects of Copper-Based and Synt... https://doi.org	31 Янв 2012	Издательство Wiley	0	1	
[72]	0,3%	0%	3 Toxicology Veterans and Agent Oran... https://nap.edu	09 Янв 2018	Перефразирования по Интернету (EN)	0	1	Источник исключен.
[73]	0,29%	0%	Diplom_Borisov_fazrpp_350404_2023	24 Апр 2023	Кольцо вузов	0	1	

	Пр а т у д а в а: Ма ле нь ко й пр о ц е н т п е р е с е ч е н и я. ...								
[48]	0,57%	0%	https://www.permsc.ru/images/docs/di... https://permsc.ru	25 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[50]	0,49%	0%	Диссертация на тему «Технология бо...» https://dissercat.com	29 Апр 2021	Интернет Плюс*	0	6	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[51]	0,47%	0%	Unraveling the Transcriptional Basis of T... https://frontiersin.org	19 Авг 2020	СМИ России и СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[52]	Источ ник исклю	0%	New Food Crop Domestication in the A... https://frontiersin.org	11 Июн 2020	СМИ России и СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[53]	чен 0,48%	0%	http://kurganniish.ru/sites/default/files/... http://kurganniish.ru	29 Окт 2020	Интернет Плюс*	0	4		
[74]	0,29%	0%	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[75]	0,43%	0%	77242 Крылова, Татьяна Сергеевна Соверш... http://dlib.rsl.ru	10 Мар 2016 08 Ноя 2022	Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция РГБ	0 0	1 3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[56]	0,42%	0%	Диссертация на тему «Влияние фито...» http://bioasia.asu.ru	27 Июн 2022	Диссертации НББ	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[76]	0,26%	0%	http://dep.nlb.by						
[77]	0,26%	0%	Мельникова, Ольга Владимировна ди... http://dlib.rsl.ru	26 Янв 2011	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[61]	0,39%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachment/ag... https://mdpi-res.com	21 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[62]	0,39%	0%	https://www.kurganniish.ru/sites/defau... https://kurganniish.ru	13 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[63]	0,38%	0%	Evaluating Management Factor Contrib... https://doi.org	31 Мар 2015	Издательство Wiley	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[66]	0,34%	0%	Микробиологическая деградация сто... http://diss.natlib.uz	26 Июл 2021	Коллекция НБУ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[67]	0,34%	0%	Получение и характеристика штамма... http://dep.nlb.by	06 Дек 2018	Диссертации НББ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[68]	0,34%	0%	Nanofertilizers: A Cutting-Edge Approac... https://frontiersin.org	19 Мар 2021	СМИ России и СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[69]	0,32%	0%	Ханадеева, Марина Алексеевна Анали... http://dlib.rsl.ru	22 Авг 2019	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.	
[70]	0,31%	0%	45365	09 Мар 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	2	Источник исключен.	

[78]	0,26%	0%	Теоретические основы формирования... http://elibrary.ru	раньше 2011	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[79]	0,25%	0%	https://www.cbd.int/doc/publications/c...					Источник исключен.
[80]	0,24%	0%	https://cbd.int	21 Мар 2023	Интернет Плюс*	0	3	Причина: Маленький процент пересечения.
[81]	0,24%	0%	Маркушева, Татьяна Вячеславовна д... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[82]	0,24%	0%	Frontiers Elucidating Mechanisms of E... https://frontiersin.org	10 Апр 2022	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[83]	0,24%	0%	Г. И. Баздырев Защита сельскохозяйс... http://dlib.rsl.ru	11 Июл 2017	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[84]	0,23%	0%	Biodegradation of Simazine and Diuron ... https://doi.org	30 Июн 2014	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[85]	0,23%	0%	ФОРМУЛЫ ПАРАКСИАЛЬНОЙ ОПТИК...	26 Дек 2016	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[86]	0,23%	0%	http://elibrary.ru					Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[87]	0,22%	0%	СРАВНЕНИЕ ВИЗУАЛЬНЫХ ПАРАМЕТР... https://science-education.ru	21 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[88]	0,22%	0%	Влияние предшественников и удобре... https://cyberleninka.ru	30 Мар 2023	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[89]	0,22%	0%	Колупаев, Алексей Вячеславович дисс...	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[90]	0,22%	0%	http://dlib.rsl.ru					Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[91]	0,22%	0%	Сырнева, Александра Сергеевна Опти... http://dlib.rsl.ru	21 Сен 2021	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[92]	0,22%	0%	Degradation of S-metolachlor in soil as ... http://scielo.cl	06 Янв 2018	Перефразирования по Интернету (EN)	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[93]	0,22%	0%	Moving through the Stressed Genome: ...					Источник исключен.
[94]	0,22%	0%	https://frontiersin.org	22 Мая 2020	СМИ России и СНГ	0	1	Причина: Маленький процент пересечения.
[95]	0,21%	0%	Горбатова, Ольга Николаевна Деград... http://dlib.rsl.ru	10 Авг 2019	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[96]	0,21%	0%	ОБ ОСТАВЛЕНИИ НА КОРНЮ ФАУТН... http://elibrary.ru	раньше 2011	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[97]	0,21%	0%	Biodegradation, Biotransformation, and... https://aem.asm.org	31 Окт 2021	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[98]	0,21%	0%	ПОВЕДЕНИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В С... http://cyberleninka.ru	05 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[99]	0,2%	0%	http://ib.anrb.ru/ebt2021/ecobiotech20...					Источник исключен.
[100]	0,19%	0%	http://ib.anrb.ru	14 Апр 2022	Интернет Плюс*	0	1	Причина: Маленький процент пересечения.
[101]	0,19%	0%	Котат, Мохамед Хафез Абдель Фаттах ... http://dlib.rsl.ru	27 Июн 2022	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[102]	0,18%	0%	Борьба с молочаем лозным на паров... http://elibrary.ru	05 Авг 2016	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[103]	0,18%	0%	Principles, Applications, and Biosafety o...					Источник исключен.
[104]	0,17%	0%	https://frontiersin.org	03 Фев 2021	СМИ России и СНГ	0	1	
[105]	0,17%	0%	The use of comet assay in plant toxicolo... https://frontiersin.org	13 Янв 2021	СМИ России и СНГ	0	1	

	onal, Transdisciplinary, and Eco...	05 Фев 2021	СМИ России и СНГ	0	1	Причина: Маленький процент пересечения.
	https://frontiersin.org					
	Global agriculture and carbon trade-offs	04 Июн 2020	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
	https://ncbi.nlm.nih.gov					
	Positive Effects of Crop Diversity on Pro...	15 Апр 2021	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
	https://frontiersin.org					
	Performance of the Two-Source Energy ...	16 Апр 2021	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
	https://frontiersin.org					
	49524	09 Мар 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
	http://e.lanbook.com					
	СПОСОБ БОРЬБЫ С АМБРОЗИЕЙ ПОЛ...	01 Янв 2015	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
	http://elibrary.ru					

			Актуальные проблемы современной ...	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[106]	0,17%	0%	http://bibliorossica.com					
[107]	0,17%	0%	Безопасность производства и труда н... http://studentlibrary.ru	19 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[108]	0,16%	0%	ПРИМЕНЕНИЕ ГЕРБИЦИДОВ ПРИ ВЫ... https://e.lanbook.com	22 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[109]	0,16%	0%	Full article: Bioengineered microbes for ...	13 Апр 2022	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[110]	0,16%	0%	https://tandfonline.com					
[111]	0,16%	0%	№ 7 http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[112]	0,16%	0%	Путеводитель по охране труда: Систе... http://ivo.garant.ru	24 Янв 2015	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[113]	0,16%	0%	Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 5...	23 Ноя 2021	СПС ГАРАНТ:			Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[114]	0,15%	0%	http://ivo.garant.ru		нормативно-правовая	0	1	
[115]	0,15%	0%	Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 5... http://ivo.garant.ru	24 Апр 2010	документация СПС ГАРАНТ:			Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[116]	0,15%	0%	Терентьев, Виктор Петрович диссерт...		нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен.
[117]	0,15%	0%						
[118]	0,15%	0%						
[119]	0,15%	0%						
[120]	0,14%	0%						
[121]	0,14%	0%						
[122]	0,13%	0%						
[123]	0,13%	0%						
[124]	0,12%	0%						
[125]	0,12%	0%						
[126]	0,1%	0%						

	http://dlib.rsl.ru	25 Дек 2015	Сводная коллекция РГБ	0	1
	Pre-treatment With Fasudil Prevents Ne... https://frontiersin.org	12 Окт 2020	СМИ России и СНГ	0	1
	Обоснование мероприятий по сниже... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	0	1
	Оптимизация приемов возделывания... http://dep.nlb.by	04 Июл 2017	Диссертации НББ	0	1
	Fenton-Mediated Biodegradation of Chl... https://frontiersin.org	29 Окт 2020	СМИ России и СНГ	0	1
	Revival of Traditional Cascade Tanks for ... https://frontiersin.org	02 Фев 2022	СМИ России и СНГ	0	1
	Rhizospheric Organic Acids as Biostimul... https://frontiersin.org	29 Мая 2020	СМИ России и СНГ	0	1
	Юсупова, Юлия Рашитовна Поиск, из... http://dlib.rsl.ru	09 Ноя 2022	Сводная коллекция РГБ	0	1
	ОбзорЛИТ	03 Июн 2022	Кольцо вузов	0	1
	Мировой рынок ЦБП к 2027 г. достиг... http://distpress.ru	24 Авг 2020	СМИ России и СНГ	0	1
	87968 http://e.lanbook.com	10 Мар 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1
	The Value of Native Plants and Local Pr... https://frontiersin.org	23 Окт 2020	СМИ России и СНГ	0	1
	Гудков, Денис Андреевич диссертаци... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	1

Причина: Маленький процент пересечения.

Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

Источник исключен. Причина: Маленький процент пересе