

31. Канев, В. В. Трансформация свойств подзолистых почв подзоны средней тайги при освоении и окультуривании / В. В. Канев, В. В. Мокиев // Почвоведение. – 2008. – № 3. – С. 349–359.

DYNAMICS OF THE GRANULOMETRIC COMPOSITION OF SOILS IN BELARUS (ACCORDING TO LARGE-SCALE SOIL SURVEYS AND LAND ASSESSMENT WORKS OF AGRICULTURAL LAND)

**T. N. Azarenok, L. I. Shibut, S. V. Dydyshka,
O. V. Matychenkova, E. D. Ananka**

Summary

The article presents the characteristics of the granulometric composition of soils of arable lands in Belarus as one of the main factors of soil fertility, shows the relative fertility of soils of different granulometric composition according to the modern scale of soil assessment points, analyzes the dynamics of the granulometric composition of soils based on the materials of various rounds of large-scale soil survey (I–III round) and cadastral assessment (I–II round), both in the context of regions, and in the country as a whole, and identified trends and reasons for its change.

Поступила 20.10.21

УДК 579.67:632.15

СКРИНИНГ ЗОНАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ *PSEUDOMONAS* SP. ПО УСТОЙЧИВОСТИ К ГЛИФОСАТУ И ЕГО УТИЛИЗАЦИИ КАК ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДА И ФОСФОРА

Н. А. Михайловская, Т. Б. Барашенко, Т. В. Погирницкая, С. В. Дюсова

*Институт почвоведения и агрохимии,
г. Минск, Беларусь*

ВВЕДЕНИЕ

Основную группу фосфатрастворяющих бактерий составляют представители родов *Pseudomonas*, *Bacillus* и *Rhizobium* [1–3, 6]. Бактерии *Pseudomonas* sp. считаются наиболее эффективными [1, 2], основной фактор их действия на растворимость почвенных фосфатов – образование кислых метаболитов [1, 3, 7, 9]. Как правило, основная цель применения фосфатрастворяющих инокулянтов – это увеличение подвижности труднорастворимых почвенных фосфатов. Фосфор – второй по значимости элемент питания растений, регулирующий формирование урожая и его качество [4, 5], а доступные для питания растений формы фосфора составляют 1–5 % от его общего содержания в почве [2].

Ценным свойством представителей рода *Pseudomonas* sp. является их высокая антагонистическая активность по отношению к корневым фитопатогенам. Инокулянты на основе *Pseudomonas* sp. действуют как эффективные биофунгици-

ды и оказывают значимое фунгистатическое действие на корневые гнили [10–12, 16]. Механизмы биологического контроля *Pseudomonas* sp. хорошо исследованы, идентифицированы основные антибиотики, ответственные за их антагонистическое действие [10–15].

Представители рода *Pseudomonas* оказывают гормональный эффект на растения. Применение зональных изолятов в качестве инокулянтов способствует увеличению объема корней на 14–30 %, массы корней – на 11–32 %, надземной части растения – на 6–19 % на ранних этапах онтогенеза [7, 8, 9].

Благодаря сочетанию перечисленных полезных свойств и разностороннему действию на состояние растений, фосфатрастворяющие ризобактерии *Pseudomonas* sp. востребованы как микробные инокулянты. Коммерческие микробные инокулянты, содержащие фосфатрастворяющие *Pseudomonas* sp., применяются в ряде стран Европы и Азии [1–3, 6].

Принимая во внимание богатый метаболический потенциал ризобактерий *Pseudomonas* sp., актуально изучение их взаимодействия с гербицидами. Глифосат (N-фосфонометилглицин) представляет особый интерес из-за глобального применения под разными коммерческими названиями, что привело к практически повсеместному присутствию его остатков в окружающей среде [18, 19, 29].

Известно, что химические и физические способы детоксикации недостаточно эффективны из-за высокой устойчивости ковалентной связи C–P в молекуле глифосата. Анализ научной литературы свидетельствует, что наиболее перспективны микробные методы детоксикации, которые могут обеспечить разложение глифосата до безопасных соединений [18, 20, 22–24, 26–29, 35]. Биологическая ремедиация экологически приемлема, эффективна и не требует высоких экономических затрат.

К настоящему времени наибольшее число глифосат-утилизирующих микроорганизмов обнаружено среди представителей бактерий следующих родов: *Pseudomonas* [21, 22, 27, 29, 35], *Arthrobacter* [20, 26, 29], *Bacillus* sp. [18, 29], *Achromobacter* sp. [18, 29], *Flavobacterium* sp. [29], *Rhizobium* sp. [23, 24, 29] и некоторых других. При этом существуют значительные различия по эффективности утилизации глифосата в зависимости от родовой принадлежности бактерий. Установлено также, что среди представителей одного рода высокую активность в отношении биодegradации глифосата проявляют лишь отдельные штаммы. Эффективность процесса детоксикации будет существенно зависеть от способности бактерий использовать глифосат в качестве источника основных элементов питания – углерода, фосфора или азота для осуществления собственного метаболизма.

Актуальны поиски деструкторов глифосата среди ризосферных бактерий, применяемых в качестве микробных инокулянтов. Основное внимание целесообразно уделять зональным ризобактериям, приспособленным к местным экологическим условиям. В этом отношении интерес для скрининга представляет наша коллекция зональных ризобактерий, содержащая ряд изолятов фосфатрастворяющих *Pseudomonas* sp., потенциал которых недостаточно исследован.

Цель исследований – скрининг зональных изолятов фосфатрастворяющих ризобактерий *Pseudomonas* sp. по устойчивости к глифосату и способности метаболизировать этот гербицид как источник углерода или фосфора.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами скрининга являются зональные изоляты фосфатрастворяющих ризобактерий *Pseudomonas* sp. собственной коллекции.

Исследования способности зональных ризобактерий метаболизировать гликофосат проведены путем постановки *in vitro* экспериментов на твердых средах (Муромцева, КА, DN) и в жидкой питательной среде Дворкина-Фостера [25].

Состав среды Муромцева (г/л): глюкоза – 10,0; аспарагин – 1,0; K_2SO_4 – 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,4; дрожжевой автолизат – 0,5; агар – 17,0; вода дистиллированная – до 1 л с добавлением $Ca_3(PO_4)_2$ непосредственно перед использованием.

Картофельный агар (КА): 200 г очищенного картофеля варят в 1 л дистиллированной воды 30 мин. Отвар охлаждают и фильтруют через ватный фильтр, (оптимальный уровень pH фильтрата – 6,8), вносят агар 20,0 г/л и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 20 мин (давление 1 атм).

Состав среды DN (г/л): KH_2PO_4 – 0,4; K_2HPO_4 – 0,1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; NaCl – 0,1; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,02; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ – 0,01; $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$ – 0,002; яблочная кислота – 3,6; дрожжевой экстракт – 0,05; спиртовой р-р бромтимолового синего (0,5 %) – 5,0 мл; агар – 20,0; 1000 мл воды; NaOH – для доведения pH до оптимального уровня 6,8–7,0.

Состав среды Дворкина-Фостера (г/л): глюкоза – 1,0 г/л; $(NH_4)_2SO_4$ – 0,375; $MgSO_4$ – 0,075; $CaCO_3$ – 0,03; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,001; H_3BO_3 – 0,000001; $MnSO_4$ – 0,000001; $NaHPO_4$ – 6,0; K_2HPO_4 – 2,0; дрожжевой экстракт – 0,0053 (121 °С, 1,5 атм., 15 мин). При изучении гликофосата в качестве источника углерода состав среды Дворкина-Фостера следующий (г/л): $(NH_4)_2SO_4$ – 0,375; $MgSO_4$ – 0,075; $CaCO_3$ – 0,03; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,001; H_3BO_3 – 0,000001; $MnSO_4$ – 0,000001; $NaHPO_4$ – 6,0; K_2HPO_4 – 2,0.

В микробиологических *in vitro* экспериментах использован гербицид Торнадо-500: в.р., 500 г/л гликофосата кислоты (изопропиламинная соль). Изготовитель: АО Фирма «Август», Россия (Ф-л «Вурнарский завод смесевых препаратов») ТУ 20.20.12-071-18015953-2017 г.

Для стерилизации химических реактивов и посуды используются стерилизатор паровой ГК-100-3 (Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов, № 669, 2004 г.), стерилизатор паровой ГК-10-1 (Тюмень-медико, № 1089) и облучатели ультрафиолетовые УГД-2, УГД-3.

Для культивирования бактерий применяются: Экрос (№ 6410), шейкер орбитальный KS-501 digital IKA WERKE (GmbH & Co.KG), перемешивающее устройство ЛАБ-ПУ-01 (2007 г.), термостат ТПС-1. Учет микроорганизмов проводится с помощью прибора для счета бактерий ПСБ (№ 33, 1991 г.). Оптическую плотность (OD) бактериальных суспензий определяли на фотоэлектроколориметре КФК-2-УХЛ-4,2.

Тестирование устойчивости ризобактерий к гербициду гликофосат (N-фосфометилглицин) на твердых питательных средах. Для первичного тестирования толерантности к гликофосату использованы двухсуточные культуры коллекционных фосфатрастворяющих ризобактерий, выращенные на картофельном агаре (28 °С). При соблюдении правил асептики в конические колбы (объем 300 мл) вносили стерильный (110 °С, 20 мин) раствор гербицида Торнадо-500 различных концентраций, затем приливали по 100 мл расплавленной питательной

среды (КА, DN, Муромцева), тщательно перемешивали и разливали в чашки Петри (20 мл в каждую). Концентрации глифосата в питательных средах составили (мг/мл): 0, 0,25 (С₁), 0,50 (С₂), 0,75 (С₃), 1,0 (С₄), 2,0 (С₅) и 3,0 (С₆). После застывания питательной среды чашки Петри подсушивали. Культуры бактерий высевали методом штриха и инкубировали в термостате (28 °С). Периодичность визуального мониторинга активности роста ризобактерий – каждые 2–3 суток. Повторность в опытах пятикратная.

Скрининг способности ризобактерий *Pseudomonas* sp., развиваться на питательных средах с разными источниками углерода. Первый этап скрининга выполнен на твердой питательной среде DN, в состав которой входили разные источники углерода (глифосат, глифосат + яблочная кислота, яблочная кислота). Исследования проведены при содержании глифосата в среде 3,0 мг/мл.

Следующий этап скрининга был проведен в жидкой минеральной среде (MSM) Дворкина-Фостера [25]. В ходе экспериментов в конические колбы объемом 1000 мл, содержащие 450 мл жидкой питательной среды Дворкина-Фостера (без источника углерода), вносили 5 мл инокулюма исследуемой двухсуточной бактериальной культуры. Начальные титры бактериальных суспензий определяли по оптической плотности на фотоэлектроколориметре КФК-2-УХЛ-4,2 ($\lambda = 590$ нм, кювета 10 мм, контроль – питательная среда) в соответствии с калибровочными графиками, построенными для бактерий разных таксонов.

Стерильный 50%-й раствор гербицида Торнадо (110 °С, 20 мин.) и стерильный 10%-й раствор глюкозы (110 °С, 1,0 атм) готовили отдельно для использования в качестве источников углерода. Бактериальные культуры тестировали по следующей схеме:

- 1) среда Дворкина-Фостера с глюкозой (ГЛ)
- 2) среда с глифосатом (ГФ)
- 3) среда с глифосатом и глюкозой (ГЛ + ГФ).

При соблюдении правил асептики в 9 конических колб вносили по 50 мл инокулированной питательной среды (без источника углерода). Затем в три опытные колбы (повторность в опыте трехкратная) вносили стерильную глюкозу (стандартная среда – ГЛ) из расчета конечной концентрации 1,0 г/л, в следующие три колбы вносили стерильный раствор глифосата (среда ГФ) до конечной концентрации 3,0 мг/мл, в остальные опытные колбы вносили последовательно глюкозу и глифосат (среда ГЛ+ГФ) и тщательно перемешивали. Колбы помещали в термостат при температуре 28 °С. Проводили периодическое перемешивание с помощью устройства ЛАБ-ПУ (90 об/мин).

Для мониторинга роста ризобактерий из каждой опытной колбы отбирали аликвоты по 5 мл с интервалом 8 часов при первом измерении и через каждые 24 часа – при последующих определениях. Критерием активности роста ризобактерий служили показатели оптической плотности бактериальной суспензии ($\lambda = 590$ нм, кювета 10 мм, контроль – питательная среда). Плотность популяции определяли по калибровочным графикам для р. *Pseudomonas*. Получены экспериментальные кривые роста для протестированных бактерий, характеризующие зависимость плотности популяции от источника углерода в питательной среде и длительности эксперимента.

Скрининг способности ризобактерий *Pseudomonas* sp., развиваться на питательных средах с разными источниками фосфора. Для оценки актив-

ности роста двухсуточные культуры зональных изолятов фосфатрастворяющих бактерий *Pseudomonas* sp. культивировали на твердой питательной среде с разными источниками фосфора. В первом блоке *in vitro* экспериментов оценка роста проведена на питательной среде Муромцева, содержащей $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (контроль) и ортофосфат кальция в сочетании с глифосатом в концентрациях 0,25, 0,50, 0,75 мг/мл. По аналогичной схеме проведен скрининг изолятов бактерий на среде Муромцева без ортофосфата кальция (контроль) и с разными концентрациями глифосата в качестве источника фосфора.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первичное тестирование устойчивости изолятов ризобактерий *Pseudomonas* sp. к глифосату на твердых питательных средах. Начальные этапы тестирования предполагают качественную оценку показателей роста бактерий на твердых питательных средах с возрастающими концентрациями глифосата. Для надежной оценки устойчивости ризобактерий использовали повышенные концентрации глифосата в питательных средах.

При *in vitro* тестировании на картофельном агаре с возрастающими концентрациями глифосата было отмечено, что многие представители фосфатрастворяющих бактерий способны развиваться в присутствии гербицида. Наиболее высокую активность при всех опытных концентрациях глифосата в картофельном агаре показали четыре изолята *Pseudomonas* sp. – P-6, P-12, P-16 и P-42. Их рост практически не замедлялся при увеличении концентрации глифосата до максимальной в эксперименте. Активность роста изолятов *Pseudomonas* sp. P-9, P-19, P-21, P-25 и P-28 можно охарактеризовать как среднюю. Для других протестированных изолятов отмечена меньшая активность роста в условиях *in vitro* эксперимента. По активности роста оставшиеся изоляты фосфатрастворяющих бактерий можно расположить в следующий убывающий ряд: *Pseudomonas* sp. P-1, P-15, P-10, P-11 и P-54.

По результатам первичного тестирования на картофельном агаре наиболее перспективными объектами для продолжения исследований можно считать девять зональных изолятов фосфатрастворяющих ризобактерий *Pseudomonas* sp. P-6, P-9, P-12, P-16, P-19, P-21, P-25, P-28 и P-42 (табл. 1).

Таблица 1

Показатели роста фосфатрастворяющих ризобактерий *Pseudomonas* sp. в зависимости от содержания глифосата в картофельном агаре (*in vitro*, 2021)

Изолят	Концентрация глифосата в питательной среде						
	0 (К)	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
<i>Pseudomonas</i> sp. P-1	+++	+++	+++	+	+	+	-
<i>Pseudomonas</i> sp. P-2	+++	+	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. P-6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Pseudomonas</i> sp. P-7	+++	+++	+++	+	+	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. P-9	+++	+++	+++	+	+	+	-
P-10	+++	+++	+++	+	+	+	-
<i>Pseudomonas</i> sp. P-11	+++	+++	+++	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. P-12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Изолят	Концентрация глифосата в питательной среде						
	0 (К)	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
<i>Pseudomonas</i> sp. P-15	+++	+++	+++	++	+	+	-
<i>Pseudomonas</i> sp. P-16	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
P-19	+++	+++	+++	++	++	++	+
P-21	+++	+++	+++	+++	++	++	+
P-25	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
P-28	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
<i>Pseudomonas</i> sp. P-42	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Pseudomonas</i> sp. P-54	+++	+	+	+	+	-	-

Примечание. +++ хороший рост; ++ средний рост; + слабый рост; - отсутствие роста; К - контроль.

Тестирование устойчивости фосфатрастворяющих ризобактерий *Pseudomonas* sp. к глифосату было продолжено на плотной питательной среде DN с возрастающими концентрациями глифосата. Экспериментальные данные подтвердили адекватность выбора перспективных изолятов, сделанного в предыдущем *in vitro* эксперименте. На обеих питательных средах, КА и DN, наиболее активный рост в присутствии глифосата наблюдали для следующих зональных изолятов фосфатрастворяющих бактерий *Pseudomonas* sp. P-6, P-9, P-12, P-16, P-19, P-21, P-25, P-28 и P-42 (табл. 2).

Таблица 2

Показатели роста ризобактерий *Pseudomonas* sp. в зависимости от содержания глифосата в плотной питательной среде DN (*in vitro*, 2021)

Изолят	Концентрация глифосата в питательной среде						
	0 (К)	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
<i>Pseudomonas</i> sp. P-1	+++	++	+	+	+	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. P-2	+++	+	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. P-6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Pseudomonas</i> sp. P-7	+++	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp. P-9	+++	+	+	+	+	+	+
P-10	+++	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp. P-11	+++	+	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas</i> sp. P-12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Pseudomonas</i> sp. P-15	+++	++	+	+	+	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. P-16	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
P-19	+++	+++	++	++	++	++	++
P-21	+++	+++	++	++	++	++	++
P-25	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
P-28	+++	+++	++	++	++	++	++
<i>Pseudomonas</i> sp. P-42	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
<i>Pseudomonas</i> sp. P-54	+++	+	-	-	-	-	-

Примечание. +++ хороший рост; ++ средний рост; + слабый рост; - отсутствие роста; К - контроль.

Скрининг изолятов ризобактерий *Pseudomonas* по способности использовать глифосат в качестве источника углерода для метаболизма. Скрининг включал несколько этапов. На первом этапе оценку роста ризобактерий проводили на твердой питательной среде DN, в которой источником углерода служили яблочная кислота, глифосат и яблочная кислота + глифосат. Для большинства зональных изолятов *Pseudomonas* sp. отмечено слабое развитие на среде DN, содержащей в качестве источника углерода яблочную кислоту в сочетании с глифосатом. На питательной среде DN с глифосатом в качестве единственного источника углерода рост бактерий был очень слабым или практически отсутствовал. Результаты скрининга показали, что фосфатрастворяющие бактерии нашей коллекции практически не способны использовать глифосат как единственный источник углерода для метаболизма.

Заключительный этап скрининга был проведен с использованием жидкой минеральной среды Дворкина-Фостера [25]. Сравнивали активность роста бактериальных культур в жидких средах с глюкозой (ГЛ), с глифосатом (ГФ) и с двумя источниками углерода – глюкозой и глифосатом (ГЛ + ГФ) на протяжении 9 суток. Для мониторинга роста каждые 24 часа определяли показатели оптической плотности бактериальной суспензии с последующей оценкой плотности популяции по калибровочному графику. Результаты скрининга и показатели мониторинга активности роста приведены в таблице 3. Экспериментальные данные показывают, что зональные изоляты *Pseudomonas* sp. относительно хорошо развиваются в стандартной жидкой среде Дворкина-Фостера с глюкозой (ГЛ) в качестве источника углерода. При наличии в питательной среде глифосата титры бактерий, как правило, резко снижаются. При замене стандартного источника углерода глифосатом ризобактерии *Pseudomonas* sp. практически не развиваются.

Таблица 3

Зависимость плотности популяции *Pseudomonas* sp. от источника углерода в жидкой среде Дворкина-Фостера (*in vitro*, 2021)

Изолят	Вариант	Титр · 10 ⁶ КОЕ/мл						
		исх.	0,3 сут	1 сут	2 сут	3 сут	4 сут	7 сут
P ₆	ГФ	0,33	0,36	0,39	0,79	0,72	1,09	1,17
	ГФ + ГЛ		0,54	4,24	4,54	9,54	13,2	13,2
	ГЛ		5,8	16,0	24,0	24,0	40,0	38,5
P ₇	ГФ	2,89	2,68	2,79	3,01	3,23	3,10	3,70
	ГФ + ГЛ		0,90	3,96	3,65	4,95	5,1	5,6
	ГЛ		2,13	4,2	24	66	100	130
P ₉	ГФ	0,75	0,75	0,70	0,88	0,88	1,00	0,90
	ГФ + ГЛ		0,75	0,75	0,98	0,99	1,29	1,96
	ГЛ		5,4	9,1	9,4	9,6	12,6	13,3
P ₁₀	ГФ	0,49	0,52	0,53	0,58	0,70	0,70	0,73
	ГФ + ГЛ		0,86	0,92	0,98	1,00	1,30	1,22
	ГЛ		1,85	6,0	7,5	12,0	15,0	19,9
P ₁₁	ГФ	0,41	0,48	0,66	0,90	0,98	1,03	1,09
	ГФ + ГЛ		0,53	0,96	1,0	2,0	2,3	2,06
	ГЛ		2,4	18	39	30	59	80

Изолят	Вариант	Титр · 10 ⁶ КОЕ/мл						
		исх.	0,3 сут	1 сут	2 сут	3 сут	4 сут	7 сут
P ₁₂	ГФ	0,63	0,99	1,32	2,49	2,7	2,69	2,77
	ГФ + ГЛ		1,31	8,9	9,6	22,7	34,6	54,9
	ГЛ		8,92	22,2	34,6	77,3	109,2	105,3
P ₁₆	ГФ	0,79	0,79	0,79	1,2	2,5	2,2	2,5
	ГФ + ГЛ		4,6	8,1	10,5	21,0	28,0	28,0
	ГЛ		12,0	26,4	52,0	62,0	65,0	67,0
P ₁₉	ГФ	1,15	1,16	1,40	2,29	3,50	3,77	4,25
	ГФ + ГЛ		1,06	3,0	4,92	5,05	3,88	4,15
	ГЛ		13,3	52	62,5	74,5	74,0	84,0
P ₂₁	ГФ	0,86	1,00	4,9	9,4	8,6	10,4	11,3
	ГФ + ГЛ		0,99	19	24	66	69	73
	ГЛ		18	36	99	123	420	400
P ₂₅	ГФ	0,66	0,76	0,98	2,15	3,36	3,22	3,88
	ГФ + ГЛ		4,8	9,08	9,15	13,83	15,2	15,5
	ГЛ		9,2	28	36	51	60,6	63
P ₂₈	ГФ	3,78	3,92	5,33	5,0	8,1	10,3	10,9
	ГФ + ГЛ		3,8	4,9	4,8	10,2	13	13,5
	ГЛ		17	30	40,6	82	81,5	96
P ₄₂	ГФ	0,13	0,12	0,12	0,15	0,15	0,18	0,18
	ГФ + ГЛ		0,12	0,13	0,13	0,14	0,13	0,13
	ГЛ		0,13	0,19	5,3	5,3	5,8	6,8
P ₅₄	ГФ	0,16	0,12	0,18	0,23	0,25	0,22	0,22
	ГФ + ГЛ		0,21	0,23	0,26	0,34	0,53	0,68
	ГЛ		0,33	0,54	3,38	3,99	4,3	4,2

По результатам экспериментов получены кривые роста, характеризующие зависимость плотности популяции микроорганизмов от источника углерода в жидкой питательной среде и длительности эксперимента. Для иллюстрации приведены кривые роста двух изолятов *Pseudomonas* sp. P-12 и P-16, которые показали лучший рост на твердой среде DN с двумя источниками углерода (глюкоза + глифосат) на фоне общего слабого развития бактерий в условиях испытаний. Характер кривых роста наглядно показывает, что зональные изоляты *Pseudomonas* sp. P-12 и P-16 хорошо развиваются только в стандартной жидкой среде Дворкина-Фостера с глюкозой (ГЛ) в качестве источника углерода. Активность роста изолятов при наличии в питательной среде глифосата в сочетании с глюкозой (ГЛ+ГФ) значительно ниже. Полная замена глюкозы на глифосат в жидкой питательной среде (ГФ) приводит к еще более существенному снижению титров ризобактерий (рис. 1).

Таким образом, результаты скрининга позволяют заключить, что большинство зональных изолятов *Pseudomonas* sp. практически не способны использовать глифосат как единственный источник углерода для метаболизма. Активность роста изолятов *Pseudomonas* sp. P-12 и P-16 в жидкой среде с глифосатом в качестве единственного источника углерода практического интереса не представляет (табл. 3, рис. 1).

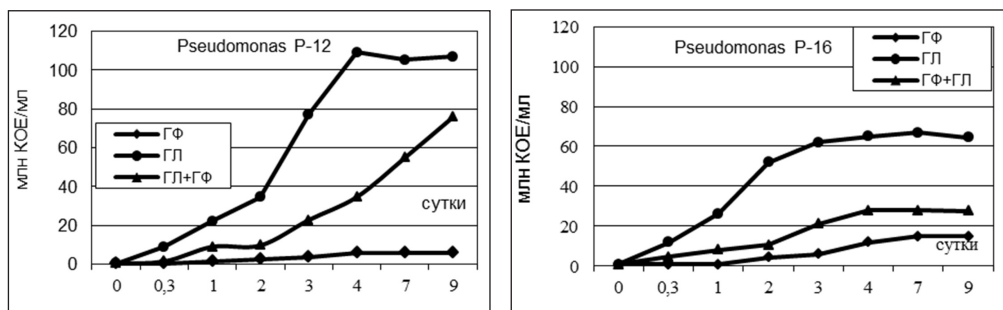


Рис. 1. Плотность популяций изолятов *Pseudomonas* sp. P-12 и P-16 в зависимости от источника углерода (глюкоза – ГЛ, глифосат – ГФ, глюкоза + глифосат – ГЛ + ГФ) в жидкой среде Дворкина-Фостера (*in vitro*, 2021)

Скрининг способности зональных ризобактерий *Pseudomonas* sp. использовать глифосат в качестве источника фосфора для метаболизма. В задачи исследований входила сравнительная оценка активности роста зональных изолятов ризобактерий рода *Pseudomonas* в зависимости от источника фосфора в питательной среде. Для этого ризобактерии культивировали на твердой питательной среде Муромцева, содержащей два источника фосфора ($Ca_3(PO_4)_2$ + глифосат), а также содержащей глифосат в качестве единственного источника фосфора.

В первом блоке экспериментов на питательной среде Муромцева, где бактерии культивировали в присутствии двух источников фосфора – глифосата и $Ca_3(PO_4)_2$, выявлены наименее устойчивые к глифосату изоляты, которые слабо развивались в этих условиях – *Pseudomonas* sp. P-1, P-7, P-11, P-15, P-54 (табл. 4).

Во втором блоке *in vitro* экспериментов на питательной среде Муромцева, где единственным источником фосфора для *Pseudomonas* sp. служил гербицид глифосат, определены изоляты, способные метаболизировать гербицид – *Pseudomonas* sp. P-6, *Pseudomonas* sp. P-9, *Pseudomonas* sp. P-12, *Pseudomonas* sp. P-16, P-19, P-21, *Pseudomonas* sp. P-25, P-28 и *Pseudomonas* sp. P-42, которые на текущем этапе выделены как перспективные для следующих этапов скрининга (табл. 4).

Таблица 4

Влияние источника фосфора на рост изолятов бактерий *Pseudomonas* sp. на твердой среде Муромцева (*in vitro*, 2021)

Изолят	Концентрация глифосата в питательной среде							
	с $Ca_3(PO_4)_2$				без $Ca_3(PO_4)_2$			
	0 (К)	C ₁	C ₂	C ₃	0 (К)	C ₁	C ₂	C ₃
<i>Pseudomonas</i> sp. P-1	+++	++	+	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. P-6	+++	+++	+++	+++	+	++	++	-
<i>Pseudomonas</i> sp. P-7	+++	++	+	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. P-9	+++	+++	+++	+++	+	++	++	-
P-10	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. P-11	+++	++	+	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. P-12	+++	+++	+++	+++	+	++	++	+
<i>Pseudomonas</i> sp. P-15	+++	++	+	+	-	-	-	-

Изолят	Концентрация глифосата в питательной среде							
	с $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$				без $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$			
	0 (К)	C ₁	C ₂	C ₃	0 (К)	C ₁	C ₂	C ₃
<i>Pseudomonas</i> sp. P-16	+++	+++	+++	+++	+	++	++	+
P-19	+++	+++	+++	+++	+	+	+	-
P-21	+++	+++	+++	+++	+	+	+	-
<i>Pseudomonas</i> sp. P-25	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-
P-28	+++	+++	+++	+++	+	++	+	-
<i>Pseudomonas</i> sp. P-42	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-
<i>Pseudomonas</i> sp. P-54	+++	+	+	+	-	-	-	-

Примечание. +++ хороший рост; ++ средний рост; + слабый рост; - отсутствие роста; К - контроль.

В эту группу вошли зональные фосфатрастворяющие ризобактерии, которые могут развиваться и наращивать биомассу в отсутствии стандартных источников фосфора. Факт роста на среде с глифосатом, без традиционных источников фосфора, свидетельствует о способности отобранных зональных изолятов *Pseudomonas* sp. использовать этот гербицид для собственного метаболизма.

Таким образом, по результатам скрининга в условиях культивирования на твердой питательной среде Муромцева, содержащей глифосат как единственный источник фосфора, определены перспективные целевые объекты среди зональных фосфатмобилизующих ризобактерий: *Pseudomonas* sp. P-6, *Pseudomonas* sp. P-9, *Pseudomonas* sp. P-12, *Pseudomonas* sp. P-16, P-19 и P-21, *Pseudomonas* sp. P-25, P-28 и P-42), способные метаболизировать гербицид глифосат.

Как и следовало ожидать, показатели роста фосфатмобилизующих ризобактерий в минеральной питательной среде, содержащей глифосат как единственный источник фосфора, ниже, чем в условиях роста на неорганических фосфатах, традиционно входящих в состав питательных сред. Замедление роста бактерий на минеральных средах с глифосатом согласуется с литературными данными. Внесение глифосата представляет химический стресс для микроорганизмов.

Негативное влияние глифосата на состав и активность почвенных микроорганизмов связано с принципом его действия на клеточный метаболизм. Глифосат – единственный гербицид, который ингибирует клеточный биосинтез ароматических аминокислот (тирозин, триптофан, фенилаланин) по шикиматному пути [17]. В пределах одного рода ризобактерий лишь отдельные штаммы являются устойчивыми к действию глифосата и способны его метаболизировать. По литературным данным даже для устойчивых к глифосату бактерий отмечается замедленный рост и наличие определенного латентного периода [35, 37].

Важной физиологической особенностью процесса деградации фосфонатов, и глифосата в частности, является необходимость периода адаптации микробных клеток к этому гербициду [35]. Уже на начальных этапах исследований по биодеградации ГФ было установлено замедление роста и наличие определенного латентного периода, прежде чем бактерия начинает метаболизировать глифосат [37].

Современная научная литература свидетельствует о негативном действии глифосата на состав и свойства почвенных микроорганизмов. Под действием глифосата элиминируется число культурных бактерий и грибов на загрязненных

пестицидом почвах [29, 30, 31]. В исследованиях Moneke et al. [32], Quinn et al. [33], Sannino et al. [34] установлено заметное снижение разнообразия бактерий при культивировании на твердых средах с глифосатом.

Как уже было отмечено, высокая активность растворения фосфатов представителями *Pseudomonas* sp. связана, как правило, с биосинтезом кислых метаболитов и значительным снижением уровня pH среды [1, 3, 7, 9]. При изучении свойств зональных *Pseudomonas* sp. было установлено, что для отобранных перспективных изолятов ризобактерий отмечается наиболее значительное подкисление среды: для изолята *Pseudomonas* sp. P-16 – до 2,67, для изолята *Pseudomonas* sp. P-25 – до 3,13, для *Pseudomonas* sp. P-12 – до 3,94 [7]. Наибольшее снижение уровня pH, до 2,67, было отмечено при культивировании изолята *Pseudomonas* sp. P-16. Для изолятов *Pseudomonas* sp. P-15, P-21 и P-28 отмечали менее существенное подкисление среды. Возможно, существует определенная корреляция между активностью растворения фосфатов и биodeградацией глифосата под действием представителей *Pseudomonas* sp. (табл. 5).

Таблица 5

Фосфатрастворяющая активность зональных изолятов *Pseudomonas* sp. (in vitro, 2011 г.)

Изолят	Содержание P, мг/л	pH среды
<i>Pseudomonas</i> sp. P-1	72	3,79
<i>Pseudomonas</i> sp. P-7	73	5,78
<i>Pseudomonas</i> sp. P-12	505	3,94
<i>Pseudomonas</i> sp. P-15	406	4,23
<i>Pseudomonas</i> sp. P-16	257	2,67
P-21	65	4,90
<i>Pseudomonas</i> sp. P-25	620	3,13
P-28	67	5,66
HCP ₀₅	22	

В то же время изоляты P-21 и P-28, показавшие хорошие показатели роста на питательной среде с глифосатом и отобранные в качестве перспективных объектов для дальнейших исследований, незначительно подкисляли среду. Можно предположить наличие разнообразных и специфических механизмов биodeградации гербицида под действием зональных фосфатрастворяющих бактерий.

В настоящее время известно несколько путей биodeградации глифосата под действием представителей *Pseudomonas* sp. В принципе, биodeградация глифосата до безопасных соединений должна включать расщепление ковалентной C–P связи с образованием саркозина, который далее метаболизируется ферментом саркозиноксидазой в глицин и формальдегид [21, 23, 27, 35]. Известно, что сложный ферментный комплекс C–P лиаза, расщепляющий эту связь, не является широко распространенным у микроорганизмов Cook et al. [36]. По данным Kishore and Jacob, 1987 [27], Pipke et al., [20, 26] и Balthazor and Hallas [28] разрыв ковалентной C–P связи не обязательно является первой стадией катаболизма.

По литературным данным более распространен у микроорганизмов фермент глифосатоксидоредуктаза, в результате действия которого глифосат трансформируется в аминометилфосфоновую кислоту (АМФК) и глиоксилат [29, 36]. Аминометилфосфоновая кислота – основной метаболит глифосата, который по-прежнему

содержит фосфоновую С–Р связь, сильно адсорбируется почвенными компонентами, медленно разлагается в большинстве почв, накапливается и не проявляет гербицидных свойств [19, 29, 36]. Для биодеградации АМФК до безопасных соединений также требуется действие ферментного комплекса С–Р лиазы.

ВЫВОДЫ

Представлены результаты исследования зональных изолятов фосфатрастворяющих ризобактерий *Pseudomonas* sp. по оценке устойчивости к глифосату на твердых питательных средах (КА, DN), поэтапного скрининга изолятов бактерий на твердой среде DN и в жидкой среде Дворкина-Фостера, содержащих разные источники углерода (глифосат, яблочная кислота, глифосат+яблочная кислота и глифосат, глюкоза, глифосат+глюкоза), а также на твердой среде Муромцева с разными источниками фосфора (глифосат, ортофосфат кальция, глифосат+ортофосфат кальция). По результатам скрининга среди зональных изолятов *Pseudomonas* sp. отобраны перспективные целевые объекты, способные метаболизировать гербицид глифосат как источник фосфора для роста. Установлено, что коллекционные фосфатрастворяющие бактерии *Pseudomonas* sp. практически не способны использовать глифосат как единственный источник углерода для метаболизма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khan, M. S. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture / M. S. Khan, A. Zaidi, P. A. Wani // *Agron. Sustain. Dev.* – 2007. – Vol. 27. – P. 29–43.
2. Novel approaches for analysis of biodiversity of phosphate-solubilizing bacteria / M.-H. Ramirez-Bahena [et al.] // *Phosphate Solubilizing Microbes for Crop Improvement* // Nova Science Publishers / eds. M. S. Khan, A. Zaidi. – 2009. – P. 15–40.
3. Gaur, A. C. Phosphate solubilizing microorganisms as biofertilizers / A. C. Gaur // New Delhi: Omega Sci. Publishers. – 1990. – 283 p.
4. Богдевич, И. М. Фосфорные удобрения в сельском хозяйстве важны и незаменимы / И. М. Богдевич, В. В. Лапа // *Земляробства і ахова раслін.* – 2004. – № 2. – С. 24–25.
5. Синягин, И. И. Превращения фосфорных и калийных удобрений в почве и повышение их усвояемости / И. И. Синягин. – М.: МСХ СССР, ВНИИТИ. – 1969. – С. 6–24.
6. Rodriguez, H. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion / H. Rodriguez, R. Fraga // *Biotechnol. Adv.* – 1999. – Vol. 17. – P. 319–339.
7. Свойства фосфатмобилизирующих бактерий и их влияние на урожайность зерновых культур на дерново-подзолистых супесчаных почвах / Н. А. Михайловская [и др.] // *Почвоведение и агрохимия.* – 2011. – № 2(47). – С. 120–129.
8. Влияние фосфатмобилизирующих бактерий на ростовые процессы, урожайность и фитосанитарное состояние посевов зерновых культур на дерново-подзолистых супесчаных почвах / Н. А. Михайловская [и др.] // *Почвоведение и агрохимия.* – 2012. – № 1(48). – С. 136–149.
9. Mikanová, O. Phosphorus Solubilizing Microorganisms and their Role in Plant Growth Promotion / O. Mikanová, J. Kubát // *Microbial Biotechnology in Agriculture*

and Aquaculture (ISBN: 1-57808-443-1) / Science Publishers // eds. R. C. Ray. – New Hampshire, USA. – 2006. – Vol. II. – P. 111–145.

10. Van Loon, L. C. Systematic resistance induced by rhizosphere bacteria / L. C. van Loon, P.A.H.M., Bakker, C. M. J. Pieterse // Annu. Rev. Phytopathol. – 1998. – Vol. 36. – P. 452–483.

11. Viscozinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. J / T. H. Nielsen [et al.] // Appl. Microbiol. – 1999. – Vol. 87. – P. 80–90.

12. Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin – a new cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. J. / T. H. Nielsen [et al.] // Appl. Microbiol. – 2000. – Vol. 89. – P. 992–1001.

13. Characterization of the pyolutcorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf5. J. / B. Nowak-Thompson [et al.] // Bacteriol. – 1999. – Vol. 181. – P. 2166–2174.

14. Banger, M. G. Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. J. / M. G. Banger, I. S. Thomashow // Bacteriol. – 1999. – Vol. 181. – P. 3155–3163.

15. Duffy, B. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain / B. Duffy, G. Defago // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – Vol. 65. – P. 2429–2438.

16. Михайловская, Н. А. Влияние ризобактерий на фитопатологическое состояние посевов яровой пшеницы / Н. А. Михайловская, Е. Г. Тарасюк, С. В. Тарасюк // Почвоведение и агрохимия. – 2005. – № 34. – С. 259–262.

17. Haslam, E. The shikimate pathway: biosynthesis of natural products series. Elsevier, New York. 2014. Hui Zhan, Yanmei Feng, Xinghui Fan, Shaohua Chen. Recent advances in glyphosate biodegradation / E. Haslam // Applied Microbiol. Biotech. – 2018. – Vol. 102. – P. 5033–5043.

18. Microbial degradation of glyphosate herbicides (review) / A.V. Sviridov [et al.] // Appl Biochem Microbiol. – 2015. – Vol. 51(2). – P. 188–195.

19. Bai, S. H. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination / S. H. Bai, S. M. Ogbourne // Environ Sci Pollut Res. – 2016. – Vol. 23(19). – P. 18988–19001.

20. Pipke, R. Degradation of the Phosphonate Herbicide Glyphosate by *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752 / R. Pipke, N. Amrhein // Appl. Environ. Microbiol. – 1988. – P. 1293–1296.

21. Kishore, G. M. Degradation of glyphosate by *Pseudomonas* sp. PG2982 via a sarcosine intermediate / G. M. Kishore, G. S. Jacob // J. Biol. Chem. – 1987. – Vol. 262(25). – P. 2164–2168.

22. Zboinska, E. Organophosphonate Utilization by the Wild-Type Strain of *Pseudomonas fluorescens* / E. Zboinska, B. Lejczak, P. Kafarski // Appl. Environ. Microbiol. – 1992. – Vol. 58(9). – P. 2993–2998.

23. Degradation of the Herbicide Glyphosate by Members of the Family *Rhizobiaceae* / C. M. Liu [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1991. – Vol. 57. – P. 1799–1800.

24. Zablutowicz, R. M. Impact of Glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* Symbiosis with Glyphosate-Resistant Transgenic Soybean / R. M. Zablutowicz, K. N. Reddy // A. Minireview. J. Environ. Qual. – 2004. – Vol. 33. – P. 825–831.

25. *Dworkin, M.* Experiments with some microorganisms which utilized methane and hydrogen / M. Dworkin, J. W. Foster // J. Bacteriol. – 1958. – Vol. 75. – P. 592–603.
26. *Pipke, R.* Uptake of Glyphosate by an *Arthrobacter* sp. / R. Pipke, A. Schulz., N. Amrhein // Appl. Environ. Microbiol. – 1987. – P. 974–978.
27. *Kishore, G. M.* Degradation of glyphosate by *Pseudomonas* sp. PG2982 via a sarcosine intermediate / G. M. Kishore, G. S. Jacob // J. Biol. Chem. – 1987. – Vol. 262(25). – P. 2164–2168.
28. *Balthazor, T. M.* Glyphosat-degrading microorganisms from industrial activated sludge / T. M. Balthazor, L. E. Hallas // Appl. Environ. Microbiol. – 1986. – Vol. 51. – P. 432–434.
29. *Hui, Zhan.* Recent advances in glyphosate biodegradation / Zhan Hui // Applied Microbiol. Biotech. – 2018. – Vol. – 102. – P. 5033–5043.
30. *Ratcliff, A. W.* Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forests soils / A. W. Ratcliff, M. Busse, C. J. Shestak // Appl. Soil Ecol. – 2006. – Vol. 34 – P. 114–124.
31. *Busse, M.* Glyphosate toxicity and the effects of long term vegetation control on soil microbial communities / M. Busse [et al.] // Soil Biol. Biochem. – 2001. – Vol. 33. – P. 1777–1789.
32. *Moneke, A. N.* Biodegradation of glyphosate herbicide in vitro using bacterial isolates from four rice fields / A. N. Moneke, G. N. Okpala, C. U. Anyanwu // Afr. J. Biotechnol. – 2010. – Vol. 9(26). – P. 4067–4074.
33. *Quinn, J. P.* Glyphosat tolerance and utilization by the microflora of soils treated with the herbicide / J. P. Quinn, J. M. M. Peden, R. E. Dick // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1988. – Vol. 29. – P. 511–516.
34. *Sannino, F.* Pesticide influence on soil enzymatic activities (J) / F. Sannino, Gianfreda, L. Chemosphere. – 2001. – Vol. 45. – P. 417–445.
35. *Кононова, С. В.* Фосфонаты и их деградация микроорганизмами / С. В. Кононова, М. А. Несмеянова // Биохимия. – 2002. – Т. 67. – Вып. 2. – С. 220–233.
36. *Cook, A. M.* Phosphonate utilization by bacteria / A. M. Cook, C. K. Daughton, M. Alexander // J. Bact. – 1978. – Vol. 133. – P. 85–89.
37. *Quinn, J. P.* Carbon-phosphorus bond cleavage by Gram-positive and Gram-negative soil bacteria / J. P. Quinn, J. M. Peden, R. E. Dick // Appl Microbiol Biotechnol. – 1989. – Vol. 31(3). – P. 283–287

SCREENING OF ZONAL ISOLATES *PSEUDOMONAS* SP. TOLERANCE TO GLYPHOSATE AND ITS UTILIZATION AS A SOURCE OF CARBON AND PHOSPHORUS

N. A. Mikhailouskaya, T. B. Barashenko, T. V. Pogirnikskaya, S. V. Dyusova

Summary

Screening of zonal isolates *Pseudomonas* sp. by cultivation on solid and liquid nutrient media with different sources of carbon and phosphorus at background of increasing concentrations of glyphosate resulted in the determination of perspective target objects, which are capable of metabolization herbicide glyphosate as a sole P-source. Screening showed that phosphorus solubilizing rhizobacteria *Pseudomonas* sp. virtually not capable of glyphosate utilization as sole carbon source for metabolism.

Поступила 29.10.21